

Pupylierung in *Corynebacterium glutamicum*

Andreas Küberl

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

Pupylisierung in *Corynebacterium glutamicum*

Andreas Küberl

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 74

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-969-0

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek.
The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche
Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the
Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Publisher and
Distributor: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek
52425 Jülich
Tel: +49 2461 61-5368
Fax: +49 2461 61-6103
Email: zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Cover Design: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Printer: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2014

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health, Band / Volume 74

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2014)

ISSN 1866-1785
ISBN 978-3-89336-969-0

The complete volume is freely available on the Internet on the Jülicher Open Access Server (JUWEL)
at www.fz-juelich.de/zb/juwel

Neither this book nor any part of it may be reproduced or transmitted in any form or by any
means, electronic or mechanical, including photocopying, microfilming, and recording, or by any
information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

Folgende Publikation wurde im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht:

Küberl A., Fränzel B., Eggeling L., Polen T., Wolters D.A., Bott M., (2014) Pupylated proteins in *Corynebacterium glutamicum* revealed by MudPIT analysis. *Proteomics*, doi: 10.1002/pmic.201300531

NIHIL SINE CAUSA

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
A	Adenin
abs.	absolut
Amp ^R	Ampicillinresistenz
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
C-Terminus	carboxyterminales Ende von Peptiden/Proteinen
Da	Dalton
DIGE	Differenz-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (englisch <i>double-strand</i> DNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
h	Stunde(n)
dH ₂ O	bidestilliertes Wasser
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo- (10 ³)
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kbp	Kilobasenpaar(e)
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

l	Liter
m	Milli- (10^{-3}) oder Masse
M	Molar (mol/l)
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis (<i>m</i> = atomare Masse, <i>z</i> = Ladungsnummer des Ions)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
max.	maximal
min	Minute
mind.	mindestens
MOPS	Morpholinopropan-sulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	Nano- (10^{-9})
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NNI	Natriumphosphat-NaCl-Imidazol Puffer
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
N-Terminus	aminotermiales Ende von Peptiden/Proteinen
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen
p	Pico- (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
ppm	Teilchen pro Million
RBS	Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds/revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

sec	Sekunde
ssDNA	einzelsträngige DNA (englisch <i>single-strand</i> DNA)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tabakätzvirus (englisch <i>Tabacco etch virus</i>)
T _m	Schmelztemperatur der DNA
TOF	Flugzeit (<i>Time of Flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZM	Trockenzellmasse
U	Uracil oder Unit (1 Unit = 1 µmol/min)
UV	ultraviolett
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
VK	Vorkultur
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)
Δ	Delta/Deletion
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)
Ω	Ohm

Drei- und Ein-Buchstabencode der Aminosäuren

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

Zusammenfassung

Die Pupylierung beschreibt eine posttranslationale, kovalente Proteinmodifikation durch das kleine (< 100 Aminosäuren) Protein Pup, welches bisher nur in Actinobakterien erforscht wurde und Proteine für die Proteolyse über das Proteasom markiert (Pup-Proteasom-System). Das zu den Actinobakterien gehörende *Corynebacterium glutamicum* besitzt die Gene, welche für die bekannten Teile der Pupylierungsmaschinerie kodieren (*pup*, *pafA*, *arc* und *dop*), aber keines für ein Proteasom. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die Pupylierung in *C. glutamicum* aktiv ist, welche Proteine pupyliert werden und welche Funktionen die Pupylierung in Abwesenheit eines Proteasoms ausübt.

In dieser Arbeit konnte über Anreicherung von Polyhistidin-getagtem Pup und MS/MS-Analysen gezeigt werden, dass in *C. glutamicum* mindestens 55 Proteine pupyliert sind, welche zu 60% Proteine des Metabolismus als auch der Translation sind. Damit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass *C. glutamicum in vivo* eine aktive Pupylierungsmaschinerie besitzt. Zusätzlich wurde ein System zur *in-vitro*-Pupylierung von Proteinen mit Pup und Pup-Ligase PafA aus *C. glutamicum* etabliert, die es in Zukunft erlaubt, einzelne Proteine auf eine Pupylierung zu untersuchen sowie weitere *in vitro*-Studien mit pupylierten Proteinen durchzuführen.

Um die physiologische Rolle der Pupylierung zu untersuchen, wurden Mutanten der Pupylierungsmaschinerie, die kein Pup (Δpup), keine Depupylase Dop (Δdop) oder AAA+-ATPase ARC zur Erkennung pupylierter Proteine (Δarc) aufwiesen, sowohl unter Standard-Kultivierungsbedingungen als auch unter Eisenmangel charakterisiert. Unter Eisenmangel zeigten alle Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ein reduziertes Wachstum. Für die Δpup -Mutante konnten außerdem Unterschiede im Transkriptom sowie im zytosolischen Proteom unter Eisenmangel im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden, welche hauptsächlich auf die Eisen-abhängigen Effekte der Transkriptionsregulatoren DtxR und RipA zurückgeführt werden kann.

Untersuchungen von Deletionsmutanten der Eisenspeicherproteine Ferritin (Δftn) und Dps (Δdps) in Kombination mit Deletionen in Genen der Pupylierungsmaschinerie zeigten, dass der Wachstumsdefekt der Δpup - und Δarc -Mutanten unter Eisenmangel durch Deletion der Eisenspeicherproteine aufgehoben werden kann. Außerdem löste der Austausch des pupylierten Lysin-Rests in Ferritin einen zur *pup*-Deletion vergleichbaren Wachstumsdefekt aus. Die Defekte der Mutanten können damit auf die defekte Pupylierung der Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps zurückgeführt werden. Die Pupylierung könnte folglich einen völlig neuartigen Mechanismus zur Eisenfreisetzung in Actinobakterien darstellen.

Abstract

Pupylation represents a post-translational, covalent protein modification by the small protein Pup. Hitherto, this mechanism has been investigated exclusively in actinobacteria, which tag certain proteins with Pup for degradation *via* the proteasome (Pup proteasome system). The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum* possesses the genes coding for the known components of the pupylation machinery (*pup*, *pafA*, *arc*, and *dop*) but not for a proteasome. In the course of the present thesis, it was investigated in *C. glutamicum* whether pupylation is active *in vivo*, which proteins are pupylation targets and which functions pupylation exhibits in the absence of a proteasome.

Enrichment of poly-histidine-tagged Pup and subsequent MS/MS analyses revealed 55 pupylated proteins in *C. glutamicum*, of which 60% belong to the categories „metabolism“ or „translation“. Thus, it could be shown for the first time that *C. glutamicum* possesses a pupylation machinery which is active *in vivo*. In addition, an assay for *in vitro* pupylation of proteins was developed using recombinant Pup and the Pup ligase PafA from *C. glutamicum*. Hereafter, this assay will provide a tool to confirm pupylation of putative targets and to perform *in vitro* assays with pupylated proteins.

The physiological role of pupylation in *C. glutamicum* was investigated by characterization of deletion mutants lacking Pup (Δpup), the depupylase Dop (Δdop) or the AAA+ ATPase ARC that recognizes pupylated proteins (Δarc) under standard growth conditions and iron starvation. All mutants exhibited reduced growth in comparison to the wild type under iron starvation. The Δpup mutant showed differences in the transcriptome and the soluble proteome in comparison the wild type under iron starvation, which can be explained by iron-dependent effects of the transcriptional regulators DtxR and RipA.

Investigations of deletion mutants lacking the iron storage proteins ferritin (Δftn) and Dps (Δdps) and genes encoding components of the pupylation machinery could show that the growth deficiency of Δpup and Δarc mutants can be complemented by the deletion of the iron storage proteins. Furthermore, the exchange of the pupylated lysine residue in ferritin resulted in a growth defect comparable to the *pup* deletion. Hence, the defects of the mutants can be explained by defective pupylation of iron storage proteins ferritin and Dps. In conclusion, pupylation could represent a novel mechanism to release iron in actinobacteria.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, Biotin-auxotrophes Bodenbakterium, das eine stäbchen- bis keulenförmige (daher der Gattungsname *Coryne*-, von griech. κορυφή (coryne) = Keule) Zellmorphologie aufweist (Abe *et al.*, 1967). *C. glutamicum* ist ein Vertreter der *Actinobacteria*. Dieses Phylum ist nicht nur eines der größten, sondern auch eines der ursprünglichsten innerhalb der Bakterien (Gupta, 2001) und umfasst Gram-positive Bakterien mit einem hohen G+C-Anteil (> 55 mol%) in ihrer genomischen DNA (Gao & Gupta, 2012). Zu den Actinobakterien gehören sowohl humanpathogene Vertreter, wie *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* oder *C. diphtheriae*, als auch pharmazeutisch bedeutsame Bakterien wie *Streptomyces* sp., die zu den wichtigsten Antibiotikaproduzenten zählen (Chater, 2006), oder biotechnologisch relevante Organismen wie *C. glutamicum*. Letzterer wurde im Jahr 1956 entdeckt, als eine Gruppe um Kinoshita *et al.* (1957) auf der Suche nach einem Mikroorganismus war, der in der Lage ist, den Geschmacksverstärker L-Glutamat auszuschcheiden (daher der Spezies-Name *glutamicum*). Im Laufe der Zeit entwickelte sich *C. glutamicum* zum einzigen bzw. wichtigsten Produzenten der Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin (ein wichtiger Zusatz von Futtermitteln), von denen im Vorjahr (2013) 2,93 bzw. 1,95 Millionen Tonnen produziert wurden (Ajinomoto Co., 2013a, Ajinomoto Co., 2013b).

Die Produktion in so hohem Maßstab ist unter anderem auf gezielte Stammentwicklung zurückzuführen (Hermann, 2003), die durch die für diesen Organismus gut entwickelten molekularbiologischen Methoden unterstützt wird (Eggeling & Bott, 2005, Burkovski, 2008, Yukawa & Inui, 2013). Vor allem auch die vollständige Sequenzierung des 3,3 Mbp großen Genoms im Jahr 2003 durch zwei unabhängige Gruppen in Deutschland und Japan bildete die Grundlage für weitergehende Stammentwicklung von *C. glutamicum* (Ikeda & Nakagawa, 2003, Kalinowski *et al.*, 2003). Wichtig für die Stammentwicklung ist unter anderem die Erforschung der regulatorischen Netzwerke in diesem Organismus. Die Regulation der Genexpression kann auf mehreren Ebenen geschehen und einige Regulationsmechanismen wurden in *C. glutamicum* bereits intensiv und erfolgreich erforscht: Dazu gehören Ein- und Zwei-Komponentensysteme (Bott & Brocker, 2012, Schröder & Tauch, 2010), die auf Ebene der Transkription die Expression von Genen kontrollieren, aber auch die Phosphorylierung (Niebisch *et al.*, 2006) oder Proteolyse (Engels *et al.*, 2004, Lüdke *et al.*, 2007), die post-translational Einfluss auf die Funktion von Proteinen nehmen. Das Wissen um die Funktion von regulatorischen Netzwerken konnte erfolgreich in der biotechnologischen Produktion eingesetzt werden, z. B. zur Verbesserung der L-Leucinproduktion (Vogt *et al.*, 2014). Durch

die Deletion des Gens für den Transkriptionsregulator des *myo*-Inositol-Stoffwechsels, *IoIR* (Klaflf *et al.*, 2013), konnte die Repression des Gens für den Transporter *IoIT1* aufgehoben werden, wodurch die Glucoseaufnahme erhöht und damit die Produktivität in einem L-Leucin-Produzenten verbessert wurde. Ein weiteres Beispiel liefert das Wissen um die Regulation des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase(ODH)-Komplexes, welcher Bestandteil des Citratzyklus ist. Das ODH-Komplex-Inhibitorprotein *Odhl*, welches durch die Serin-/Threonin-Proteinkinase G (*PknG*) phosphoryliert wird, reguliert den ODH-Komplex in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus (Niebisch *et al.*, 2006). Eine Deletion von *PknG* verhinderte die Phosphorylierung von *Odhl in vivo*, wodurch dieses an den ODH-Komplex bindet und dadurch die Umsetzung von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA inhibiert (Schultz *et al.*, 2007). Dadurch wurde der Fluss von 2-Oxoglutarat in Richtung L-Glutamat geleitet und so die Produktionsrate von L-Glutamat unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. Biotinlimitierung, um das Doppelte gesteigert.

C. glutamicum ist außerdem ein wichtiger Modellorganismus für die Erforschung der oben genannten pathogenen Actinobakterien. Der bedeutendste Vertreter ist *M. tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, einer Infektionskrankheit mit mehr als 1,3 Millionen Todesfällen pro Jahr (Weltgesundheitsorganisation, 2013). Eine Gemeinsamkeit der sogenannten *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*-Gruppe ist die einzigartige äußere Zellmembran, in der unter anderem Mycolsäuren vorkommen. Diese sind 2-Alkyl-3-Hydroxy-Fettsäuren, die über Ester an Arabinogalactan in der Zellwand verankert sind und so eine äußere Membran bilden (Lanéelle *et al.*, 2013). Da die Mycolsäurebiosynthese nur in den genannten Actinobakterien existiert, ist diese das Ziel vieler Antibiotika (z. B. Isoniazid oder Ethambutol), die gegen *M. tuberculosis* gerichtet sind. *C. glutamicum* ist ein gutes Forschungsobjekt, um die Mycolsäurebiosynthese nach neuen Angriffspunkten für Antibiotika zu untersuchen, da die Mycolsäuren zwar vorhanden, aber nicht essentiell sind (Portevin *et al.*, 2004, Tropis *et al.*, 2005).

Vor kurzem wurde zum ersten Mal in *M. tuberculosis* ein bisher in Bakterien unbekannter Mechanismus entdeckt, die sogenannte Pupylierung, die bisher ausschließlich in Actinobakterien analysiert wurde. Aufgrund seiner Einzigartigkeit stellt dieser Mechanismus nicht nur ein potentiell Ziel für Antibiotika gegen *M. tuberculosis*, sondern auch eine völlig neue Komponente im Regulationsnetzwerk von Actinobakterien dar. Die Pupylierung wird von einem Protein vermittelt, das prokaryotisches, Ubiquitin-ähnliches Protein (*Pup*, englisch *Prokaryotic ubiquitin-like protein*) genannt wurde, da es Ähnlichkeiten zu Ubiquitin (*Ub*) aus Eukaryoten aufweist.

1.2 Die Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung beschreibt eine wichtige posttranslationale Regulation mittels des kleinen, 76 Aminosäuren langen Proteins Ubiquitin (Ub), mit dem in Eukaryoten Proteine für ihren Abbau im 26S-Proteasom markiert werden. Dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) kommt im Menschen eine immense Bedeutung zu, da Störungen im Abbau von defekten oder abnormal gefalteten Proteinen über das UPS zu ernsthaften Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, führen können (Cuanalo-Contreras *et al.*, 2013). Für die Erforschung von Ub bzw. dem UPS (Ciechanover *et al.*, 2012) wurde deshalb 2004 sogar der Nobelpreis für Chemie an Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose verliehen (<http://www.nobelprize.org>). Um ein Protein zu ubiquitinieren (Abbildung 1), werden die drei Enzyme E1, E2 und E3 benötigt (Spasser & Brik, 2012, Hochstrasser, 2009). Diese sind für die Knüpfung einer Isopeptid-Bindung zwischen dem carboxyterminalen (C-terminalen) Glycin-Rest von Ub und einer Lysin-Seitenkette des Zielproteins verantwortlich. Im ersten Schritt aktiviert E1 den C-Terminus von Ub über eine Thioesterbindung an einen internen Cystein-Rest unter Hydrolyse von ATP. E2 übernimmt das aktivierte Ub von E1, ebenfalls über eine Thioesterbindung, und bringt Ub in die Nähe des zu ubiquitinierenden Proteins. E3 führt die Verknüpfung zwischen Ub und dem Zielprotein aus. Als Gegenspieler zu diesen drei Enzymen fungieren die Deubiquitinasen (DUBs), die eine Ubiquitinierung wieder lösen können.

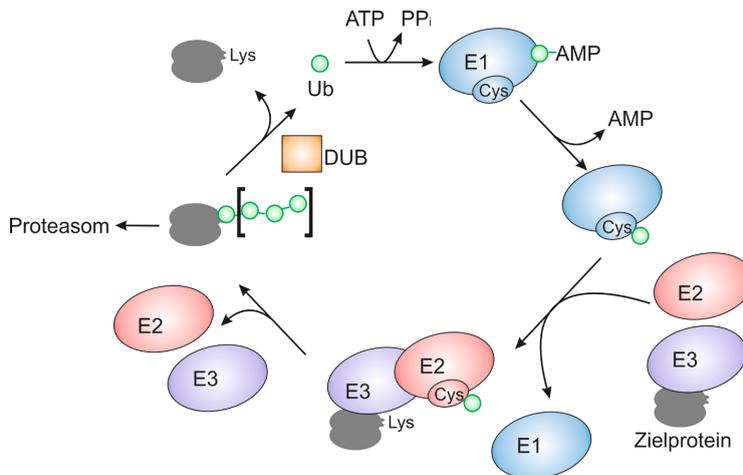


Abbildung 1. Schema der Ubiquitinierung. Die Polyubiquitinierung (= Ubiquitinkette) eines Proteins kann zum Abbau eines Proteins über das Proteasom führen. AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, DUB: Deubiquitinase, E1-3: an der Ubiquitinierung beteiligte Enzyme, PP_i: Pyrophosphat, Ub: Ubiquitin. Wichtige Aminosäuren der Proteine sind im Drei-Buchstaben-Code angeführt. (aus Hochstrasser, 2009)

Für den Abbau im Proteasom reicht jedoch nicht nur die Verknüpfung eines Moleküls Ub an ein Protein, sondern es benötigt eine ganze Kette davon (= Polyubiquitinierung), indem weitere Ub-Moleküle an den Lysin-Rest 48 in Ub angehängt werden, welche von den regulatori-

schen Untereinheiten des Proteasoms erkannt werden (Hochstrasser, 2009). Doch auch die Monoubiquitinierung, das Anhängen von nur einem Ub an ein Protein, hat eine Bedeutung, z. B. als Signal im Membrantransport oder der transkriptionellen Regulation (Spasser & Brik, 2012). Die Art der Ubiquitinierung (Poly-/Mono-) von Substraten wird von den E2-Enzymen, das Substratspektrum durch die E3-Enzyme bestimmt; aus diesem Grund haben Eukaryoten typischerweise nur zwei E1-, aber 30-40 E2- sowie mehrere hundert E3-Enzyme zur Verfügung (Spasser & Brik, 2012).

Ub selbst ist ein sehr stabiles Protein, welches bei neutralem pH-Wert von 7 eine Denaturierungstemperatur weit über 100°C besitzt (Jackson, 2006). Dies kommt von der charakteristischen β -Grasp-Faltung, die alle Ub-artigen Proteine (UBL, Ubiquitin-like proteins) auszeichnet, auch wenn sie anhand der Aminosäure-Sequenz oft nur wenig Übereinstimmungen aufweisen (Burns & Darwin, 2010). Der Name „Ubiquitin“ wurde diesem Protein ursprünglich gegeben, weil angenommen wurde, dass Ub ubiquitär in Pro- und Eukaryoten vorkommt (Spasser & Brik, 2012). Ub kommt aber nur in Eukaryoten vor, während UBL-Proteine auch in Bakterien und Archäen existieren. Allerdings besitzen nur Archäen UBL-Proteine, die eine vergleichbare Aufgabe wie Ub haben, Proteine für den Abbau im Proteasom markieren (SAMPs, Small archaeal modifier proteins) und möglicherweise den Schwefelstoffwechsel regulieren (Maupin-Furlow, 2013). Das nun in Bakterien entdeckte Pup-Protein besitzt jedoch eine analoge Funktion zu Ub.

1.3 Die Pupylierung

1.3.1 Der Ablauf der Pupylierung in *Mycobacterium* sp.

Pup ist wie Ubiquitin ein kleines, in *M. tuberculosis* 64 Aminosäuren langes Protein zur post-translationalen Modifizierung von Zielproteinen. Beiden Proteinen ist auch ein GlyGly-Motiv gemein, welches bei Ub den äußersten C-Terminus bildet, dem bei Pup jedoch entweder Glu oder Gln folgt (Darwin, 2009). Bioinformatische wie auch Circular dichroismus-Analysen zeigen, dass freies Pup ein intrinsisch ungeordnetes Protein ist (Chen *et al.*, 2009, Liao *et al.*, 2009), wodurch es sich ebenfalls von Ub unterscheidet. Es ist also kein UBL-Protein, sondern ein Analog, da die Art und Weise der kovalenten Modifizierung durch Pup, die Pupylierung, sowie der dadurch vermittelte Abbau mittels eines Proteasoms an die Ubiquitinierung erinnert. Die meisten Erkenntnisse über die entscheidenden Schritte der Pupylierung bzw. der Pup-vermittelten Proteindegradation wurden mit Proteinen aus *M. tuberculosis* oder *M. smegmatis* gewonnen (Abbildung 2).

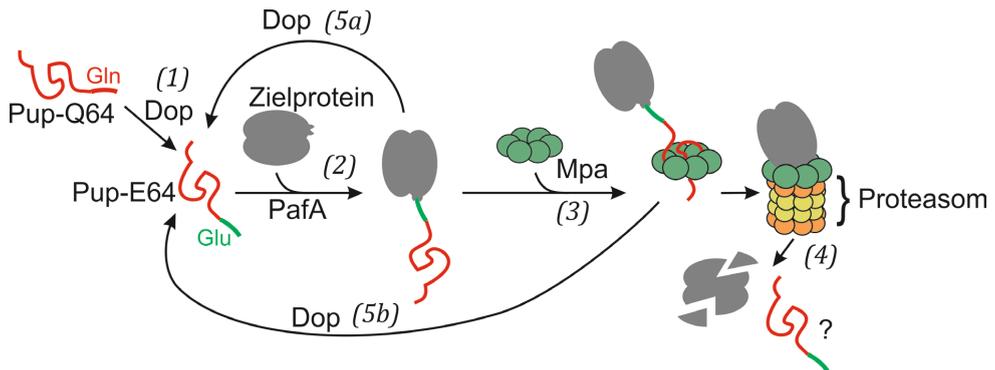


Abbildung 2. Schema der Pupylierung in *Mycobacterium* sp. (1) Aktivierung des prokaryotischen ubiquitin-artigen Proteins, Pup, durch die Desamidase von Pup, Dop. (2) Kovalente Verknüpfung von Pup an ein Zielprotein durch die Pup-Ligase, PafA. (3) Erkennung des pupylierten Proteins durch die AAA+-ATPase Mpa. (4) Abbau des pupylierten Proteins durch das Proteasom. (5a,b) Depupylierung von Proteinen durch die Depupylase-Aktivität von Dop. Das Schicksal von Pup beim proteasomalen Abbau von Proteinen ist *in vivo* unbekannt. Die Abbildung basiert auf Striebel *et al.* (2014)

Zuerst muss Pup aktiviert werden (Abbildung 2-1). Dabei wird der C-terminale Glutamin-Rest (Pup-Q64) durch die Desamidase von Pup, Dop (*Deamidase of Pup*), desamidiert, wodurch ein Glutamat-Rest (Pup-E64) entsteht (Imkamp *et al.*, 2009, Striebel *et al.*, 2009). Danach wird Pup-E64 kovalent an Zielproteine gebunden (2). Dabei verknüpft die Pup-Ligase PafA (*Proteasome accessory factor A*) die γ -Carboxyl Gruppe von E64 mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Zielprotein. Es entsteht also eine Isopeptidbindung (Striebel *et al.*, 2009, Sutter *et al.*, 2010). Im nächsten Schritt wird das pupylierte Protein erkannt (3), indem Pup von der AAA+-ATPase Mpa (*Mycobacterium proteasomal ATPase*) gebunden wird, welche pupylierte Proteine ATP-abhängig entfaltet (Striebel *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010). Außerhalb der Mycobakterien wird diese ATPase als ARC, also als AAA+-ATPase, die ringförmige Komplexe bildet (*AAA+ ATPase forming ring-shaped complexes*), bezeichnet. Die Entfaltung wird initiiert, indem der N-Terminus von Pup durch die zentrale Pore des hexameren Mpa gefädelt wird, wodurch Pup und das pupylierte Protein entfaltet werden. Da Mpa mit dem Proteasom interagiert (Striebel *et al.*, 2010), werden Pup und das Zielprotein *in vitro* dadurch dem Abbau zugeführt (4). Das Schicksal von Pup ist *in vivo* noch unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Dop auch eine Depupylierung (5a) katalysiert (Burns *et al.*, 2010a, Imkamp *et al.*, 2010). Deshalb könnte Dop wichtig sein, um Pup vor dem Abbau im Proteasom *in vivo* zu retten (5b).

1.3.1 Pupylierung und Proteasom in Actinobakterien

Das für *pup* kodierende Gen wurde bioinformatisch durch Genomsequenzvergleiche bisher in allen wichtigen Taxa von Actinobakterien sowie vereinzelt auch in Nitrospirae, δ -Proteobakterien, sowie dem Superphylum Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiaea gefunden (Iyer *et al.*, 2008). Auf Sequenzebene ist allen Pup-Homologen aber lediglich ein C-terminales G[QE]-Motiv gemein. Die Ausstattung mit Genen der Pup-Proteasom-

Maschinerie von Actinobakterien ist in Abbildung 3 gezeigt. Hier wird ersichtlich, dass die Reihenfolge der an der Pupylierung beteiligten Gene im Genom aller untersuchten Organismen konserviert ist (Barandun *et al.*, 2012). Es gibt sogar vereinzelt Actinobakterien, wie *Saccharopolyspora erythraea* oder *Salinispora tropica*, die den ganzen Gencluster doppelt besitzen.

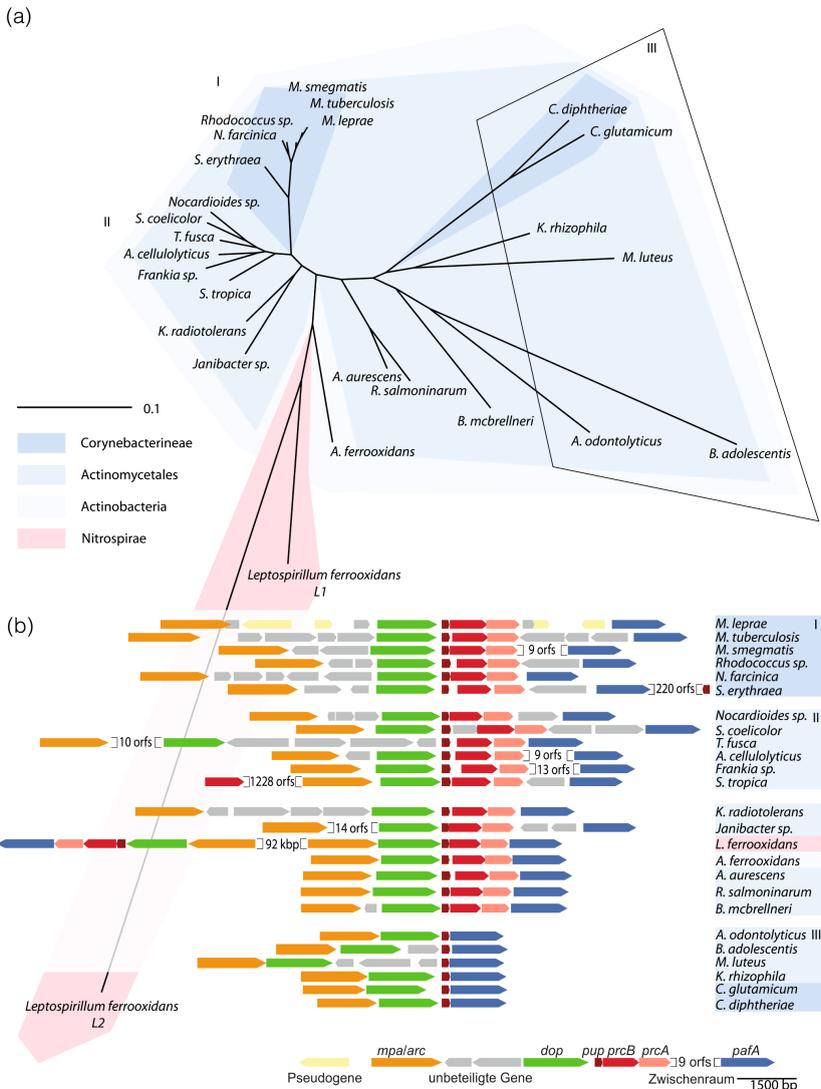


Abbildung 3. Vorkommen, genomische Organisation und Verwandtschaft des *pup*-Genlocus. (a) Phylogenetische Analyse der kombinierten Aminosäure-Sequenzen der AAA+-ATPase ARC, der Depupylase Dop, dem prokaryotischen, Ubiquitin-ähnlichen Protein Pup und der Pup-Ligase PafA. Die Untersuchung zeigte, dass die Sequenzen in Actinobakterien mit Proteasom (PrcAB) eine geringe (Cluster I und II), diejenigen ohne Proteasom eine weitaus größere Varianz aufweisen (Cluster III). (b) Genomische Organisation der Gene der für die Pupylierung relevanten Enzyme. Die Organismen sind, wie in (a) gezeigt, entgegen dem Uhrzeigersinn aufgelistet. Diese Abbildung wurde von Barandun *et al.* (2012) übernommen.

Eine wichtige Beobachtung in Bezug auf die vorhandenen Gene zeigt Abbildung 3b: Nicht alle Actinobakterien mit Genen für die Pupylierung besitzen auch die Gene für die Proteasom-Untereinheiten *prcAB*. Das Proteasom der Actinobakterien ist dem eukaryotischen ähnlich, jedoch einfacher aufgebaut. Es besteht nur aus homoheptameren und nicht aus heteroheptameren α - und β -Untereinheiten und besitzt, soweit bekannt, nur eine einzige regulatorische ATPase (ARC/Mpa) (Cerdeira-Maira & Darwin, 2009). Es wurde bisher z. B. in *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Frankia* oder *Mycobacterium* sp. beschrieben und ergänzt in diesen Organismen andere ATP-abhängige Proteasen wie ClpP, Lon oder FtsH (Darwin, 2009). Ob das Proteasom in Actinobakterien durch horizontalen Gentransfer erworben wurde oder selbst die Urform für alle Proteasomen in Archaeen und Eukaryoten darstellt, wird immer noch untersucht (Barandun *et al.*, 2012). In *M. tuberculosis* ist das Proteasom *in vivo* essentiell, in *M. smegmatis* beispielsweise nicht (Festa *et al.*, 2010).

1.3.2 Proteine der Pupylierungsmaschinerie

Pup

Auch wenn freies Pup, wie oben erwähnt, keine bestimmte Sekundär-/Tertiärstruktur ausbildet, besitzt Pup für die Funktion essentielle Sequenzbereiche (Abbildung 4).

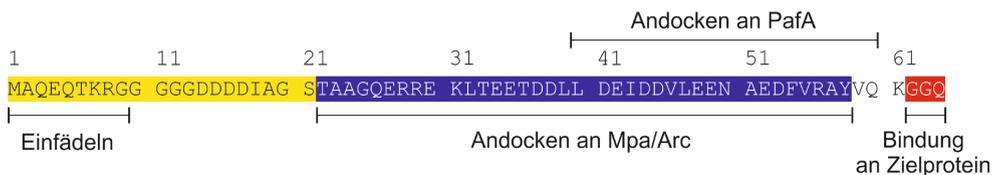


Abbildung 4. Aminosäure-Sequenz von Pup aus *M. tuberculosis* mit den funktionell relevanten Regionen. Der Bereich von Pup, der an die *Coiled-Coil*-Domäne der AAA+-ATPase Mpa/ARC bindet, ist blau markiert (Aminosäuren 22-58). Diese überlappt teilweise mit dem Bereich, über den Pup an die Pup-Ligase PafA andockt (Aminosäuren 40-60). Der unstrukturierte N-terminale Bereich, mittels dessen Pup in die Pore von Mpa/ARC eingefädelt wird, ist gelb markiert (Aminosäuren 1-21). Der flexible C-Terminus (rot) ist wichtig für die Bindung von Pup an Substrate (Aminosäuren 62-64). Übersetzt aus Striebel *et al.* (2014).

Der N-Terminus (Aminosäuren 1-21) des Pup-Proteins ist innerhalb der Actinobakterien wenig konserviert, aber wichtig für die Entfaltung der pupylierten Proteine (Burns *et al.*, 2010b, Striebel *et al.*, 2010). Ein pupyliertes Protein wird über diesen N-Terminus in die zentrale Pore der hexameren ATPase Mpa eingefädelt, damit es entfaltet und damit dem proteasomalen Abbau zugeführt werden kann (vgl. Abbildung 2). Entscheidend für das Einfädeln ist eine minimale Länge des N-Terminus und weniger die Sequenz. N-terminal um acht Aminosäuren verkürzte Pup-Varianten konnten *in vitro* keinen proteasomalen Abbau von Modellsubstraten mehr vermitteln, während der Austausch dieser acht Aminosäuren gegen andere, zufällige Aminosäuren dies immer noch zuließ (Striebel *et al.*, 2010). Daran schließt der besser konservierte C-terminale Abschnitt (Aminosäuren 22-60) an. Dieser ist einerseits beim Andocken an die Pup-Ligase PafA, zur Verknüpfung von Pup an Substrate (Barandun *et al.*,

2013, Smirnov *et al.*, 2013), und andererseits beim Andocken von pupylierten Substraten an die regulatorische ATPase Mpa wichtig. NMR-Studien zeigten, dass die Interaktion von Pup mit Mpa dazu führt, dass der C-Terminus von Pup eine α -helicale Struktur einnimmt und dass dadurch der N-Terminus von Pup in die zentrale Pore von Mpa reicht (Maldonado *et al.*, 2013). Pup bringt durch diese Struktur zwei wichtige Eigenschaften mit, einen unstrukturierten N-Terminus zur Entfaltung sowie einen C-Terminus, über den für den Abbau bestimmte Proteine durch Mpa erkannt werden (Burns *et al.*, 2010b). Die letzten drei C-terminalen Aminosäuren sind schließlich wichtig, damit Pup kovalent an seine Substrate gebunden werden kann. Die zwei Glycine geben der kovalenten Bindung von Pup an seine Zielproteine wahrscheinlich die nötige Flexibilität, obwohl sie nicht essentiell dafür sind. Die verknüpfte C-terminale Aminosäure ist in allen Pup-Homologen Glutamat (Gln wird vorher durch Dop zu Glu desamidiert). Ein Austausch gegen Asparagin oder Aspartat verhindert die Pupylierung und zeigt, dass Gln/Glu essentiell für die Funktionalität von Pup sind (Cerde-Maira *et al.*, 2010).

PafA und Dop

Interessanterweise sind die Desamidase/Depupylase Dop und die Pup-Ligase PafA in Mycobakterien auf Aminosäureebene zu 50% ähnlich und zu 32% identisch, allerdings ist Dop im Schnitt rund 50 Aminosäuren länger als PafA (Striebel *et al.*, 2009). Die Kristallstruktur von sowohl Dop als auch PafA konnte bereits aufgeklärt werden (Özcelik *et al.*, 2012). Dadurch zeigte sich, dass beide Enzyme Gemeinsamkeiten in der dreidimensionalen Struktur aufweisen, denn beide bilden eine Mulde über β -Faltblätter (Abbildung 5). Für PafA konnte mittels Kristallstrukturanalyse gezeigt werden, dass in dieser Mulde Pup gebunden wird (Barandun *et al.*, 2013). Dop besitzt einen zusätzlichen *Loop*, der möglicherweise eine Rolle bei der Interaktion mit Bindepartnern spielt. Ein wichtiger funktionaler Unterschied zwischen den beiden Enzymen ist, dass PafA desamidiertes Pup an Zielproteine konjugiert, dabei ATP hydrolysiert und das C-terminale Glutamat von Pup vor der Konjugierung am γ -Carboxylat phosphoryliert (Cerde-Maira *et al.*, 2010, Guth *et al.*, 2011, Striebel *et al.*, 2009) (Abbildung 5 rechts). In einer *pafA*-Deletionsmutante konnte in *M. tuberculosis* keine Pupylierung detektiert werden, was dafür spricht, dass Dop trotz der strukturellen und Sequenzähnlichkeiten diese Funktion nicht übernehmen kann und PafA die einzige Pup-Ligase in Actinobakterien ist (Pearce *et al.*, 2008). Im Vergleich zur Ubiquitinierung, die zahlreiche Ub-Ligasen involviert (Abbildung 1), ist auch das ein deutlicher Unterschied.

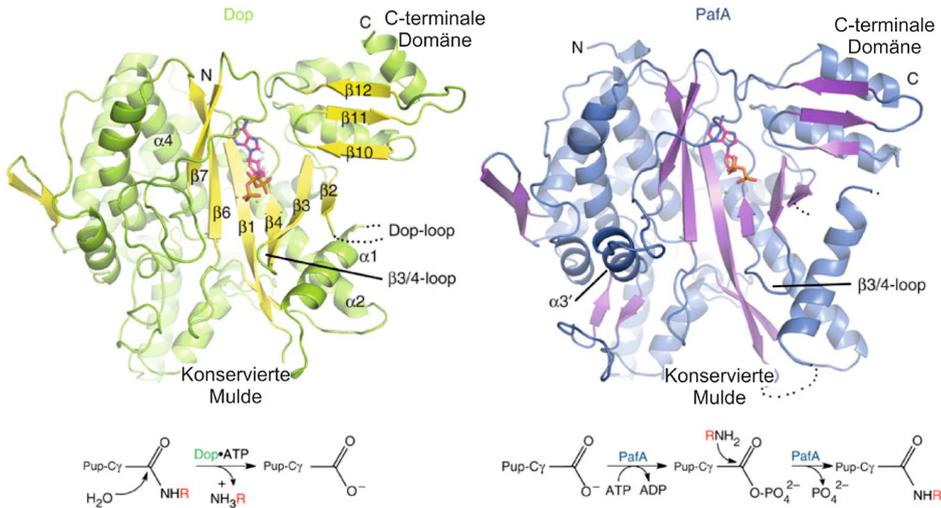


Abbildung 5. Kristallstrukturen der Desamidase/Depupylase Dop (grün) aus *Acidothermus cellulolyticus* mit ATP und der Pup-Ligase PafA (blau) aus *C. glutamicum* mit ADP. Es ist eine Frontansicht gezeigt, mit Blick auf die β -Faltblatt-Mulde (gelb für Dop, violett für PafA). Die punktierten Linien zeigen strukturell undefinierte Regionen. Ausgewählte β -Faltblätter und α -Helices sind in der Dop-Struktur markiert. Andere strukturelle Eigenschaften von Dop und PafA sind gesondert gekennzeichnet. Die katalysierten Reaktionsmechanismen von Dop und PafA sind unter den jeweiligen Strukturen gezeigt. Das rote „R“ steht für das zu pupylierende/pupylierte Protein, bei Desamidierung durch Dop auch für Wasserstoff. Aus Özcelik *et al.* (2012).

Dop führt die Desamidierung, also Umwandlung/Aktivierung von C-terminalem Glutamin in Glutamat, in Gegenwart von ATP durch, ohne dass ATP hydrolysiert wird (Abbildung 5 links), was ungewöhnlich für diese Klasse von Enzymen (Carboxylat-Amin/Ammonium-Ligasen innerhalb der Glutamin-Synthetasen) ist (Striebel *et al.*, 2009). Normalerweise katalysieren diese eine ATP-abhängige Bindung zwischen einer Carboxylgruppe eines Glutamats und der Aminogruppe einer Aminosäure (Iyer *et al.*, 2008). Wie oben erwähnt, besitzen manche Actinobakterien ein Pup-Protein mit C-terminalem Glutamat-Rest, weshalb Dop dort keine Rolle als Desamidase von Pup spielt und deshalb wahrscheinlich nur der Depupylierung dient (Imkamp *et al.*, 2010) (Abbildung 2, Schritt 5).

Mpa/ARC

Die ATPase Mpa/ARC ist ein hexameres Protein, das Ringe ausbildet und in Organismen mit Proteasom mit diesem interagiert (Burns & Darwin, 2010). Durch isotherme Titrationskalorimetrie konnte bestimmt werden, dass ein Mpa-Hexamer ein einzelnes Pup-Molekül erkennen und binden kann (Sutter *et al.*, 2009). Jedes Hexamer von Mpa bildet drei *Coiled-Coil*-Domänen aus, über die Pup erkannt sowie gebunden wird. Pup nimmt dabei, wie oben erwähnt, eine α -helikale Struktur ein (Wang *et al.*, 2010). Außerdem unterliegt Mpa interessanterweise selbst der Kontrolle durch Pupylierung (Delley *et al.*, 2012): Eine Pupylierung von Mpa führte *in vitro* zu einer Dissoziation der ATPase vom Proteasom. Außerdem wurde

durch elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie Gelfiltration gezeigt, dass pupylierte Mpa-Hexamere durch andere Mpa-Hexamere entfaltet und damit reversibel inaktiviert werden. Dies scheint also eine *Feedback*-Inhibierung der Pup-abhängigen Proteolyse in Organismen darzustellen, die mittels Pupylieung Proteine über ein Proteasom abbauen. Die in Mpa vorhandene Pupylieungsstelle (K591 in *M. tuberculosis*) ist nämlich nur in Actinobakterien konserviert, die für ein Tyrosin an der vorletzten C-terminalen Position von Mpa/ARC kodieren. Dieses Tyrosin ist wichtig für die Interaktion von Mpa/ARC mit dem Proteasom und ist deshalb nur in Actinobakterien konserviert, die auch ein Proteasom besitzen (Delley *et al.*, 2012).

1.3.3 Die physiologische Relevanz der Pupylieung

Eine Bedeutung des Pup-abhängigen Proteinabbaus im Proteasom konnte von Darwin *et al.* (2003) aufgeklärt werden. Diese Gruppe stellte einen Zusammenhang zwischen der Resistenz von *M. tuberculosis* gegenüber nitrosativem Stress und dem Vorhandensein des Proteasoms bzw. der Pupylieungskomponenten PafA und Mpa fest. Nitrosativer Stress wird in Makrophagen zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen durch reaktive Stickstoffintermediate (RNI, *Reactive Nitrogen Intermediates*) erzeugt, die einen Teil der Immunantwort darstellen (MacMicking *et al.*, 1997). RNI führen unter anderem zu einer Nitrosylierung von Thiol-Gruppen an Cysteinen. In Kombination mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*), wie dem Superoxidanion (O_2^-), werden durch das entstehende Peroxynitrit nicht nur Thiol-Gruppen, sondern auch Lipide und die DNA geschädigt. Dieser Mechanismus bildet normalerweise eine effektive Antwort des Immunsystems gegen Infektionen. Allerdings überlebt ein Teil der *M. tuberculosis*-Zellen diese Immunantwort (Hernández-Pando *et al.*, 2000). Deshalb führte die Gruppe um Darwin *et al.* (2003) ein Screening mit einer Transposon-Mutanten-Bibliothek durch. Dabei simulierten sie die Produktion von RNI durch Kultivierung von *M. tuberculosis* in Anwesenheit von Natriumnitrit bei einem sauren pH-Wert von 5,5. In diesen Versuchen erwiesen sich Transposon-Mutanten, in denen die Gene von *pafA* und *mpa* inaktiviert wurden, als besonders sensitiv. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Zugabe eines Proteasom-Inhibitors (MLN-273) unter diesen Bedingungen das Wachstum von *M. tuberculosis* deutlich hemmte. Das Pup-Proteasom-System ist wichtig für die hohe Resistenz von *M. tuberculosis* gegenüber RNI-Stress, indem vermutlich RNI-Schäden über den proteasomalen Abbau geschädigter Proteine effektiv repariert werden. Die Bedeutung der Pupylieung in *M. tuberculosis* scheint jedoch über RNI-Bekämpfung hinauszugehen, da Mäuse, die Deletionen in den Genen enthielten, die für RNI-erzeugende Enzyme kodierten, durch *pafA*- oder *mpa*-Mutanten schlechter infiziert werden konnten (Darwin *et al.*, 2003).

Um mehr über die Bedeutung der Pupylieung herauszufinden, wurde in mehreren Arbeiten das Spektrum der pupylierten Proteine, das Pupylom (pupyliertes Proteom), erforscht. Die

ersten Proteine, für die mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) Pupylierung nachgewiesen werden konnte, waren das Malonyl-Coenzym-A-Acyl-Carrier-Protein (FabD, involviert in die Fettsäurebiosynthese), die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (PanB, Pantothersäure-Biosynthese) und, wie oben bereits erwähnt, Mpa (Pearce *et al.*, 2008), sowie die *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase (Ino1) und die Superoxid-Dismutase (SodA) (Burns *et al.*, 2008). Mit Ausnahme von Mpa dienen diese seither auch als Modellsubstrate für den Pup-abhängigen Abbau über das Proteasom in *Mycobacterium* sp. Desweiteren wurden in vier verschiedenen Arbeiten über Affinitätsreinigung von getaggetem Pup-Protein pupylierte Proteine in *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* und *R. erythropolis* identifiziert (Festa *et al.*, 2010, Poulsen *et al.*, 2010, Watrous *et al.*, 2010, Yun *et al.*, 2012). Dabei suchten alle Gruppen nach einer Modifikation an Lysin-Resten der gereinigten Proteine mit einem Massenunterschied von 243,081 Da. Dies ist jene Masse, die von Pup am modifizierten Substrat zurückbleibt, wenn Trypsin Pup nach dem Lysin-Rest an Position 61 geschnitten hat (Burns *et al.*, 2008).

Festa *et al.* (2010) konnten in *M. tuberculosis* in 55 Proteinen eine gesicherte Pup-Bindestelle detektieren. Watrous *et al.* (2010) identifizierten 52 pupylierte Proteine mittels MS/MS in *M. smegmatis*. Eine interessante Entdeckung dieser Arbeit war, dass von 29 Proteinen, die in *M. tuberculosis* ein Ziel von Nitrosylierung durch RNI sind (Rhee *et al.*, 2005), 17 in dieser Studie als pupyliert gefunden wurden. Dies scheint die oben genannte Vermutung zu bestätigen, dass die Pupylierung, unter anderem, an der Beseitigung von RNI-geschädigten Proteinen beteiligt ist. Poulsen *et al.* (2010) konnten durch heterologe Expression und Reinigung von Pup aus *M. tuberculosis* ein 41 Proteine umfassendes Pupylom in *M. smegmatis* identifizieren. Das einzige Pupylom, das nicht aus *Mycobacterium* sp. stammt, wurde in *R. erythropolis* beschrieben und umfasst 31 Proteine (Yun *et al.*, 2012). Trotz dieser vielen bekannten pupylierten Proteine aus den bisherigen Studien konnte daraus noch kein Sequenzmotiv abgeleitet werden, über das zu pupylierende Lysin-Reste erkannt werden könnten. Eventuell gibt es dafür dreidimensionale Erkennungsstellen am pupylierten Protein (Watrous *et al.*, 2010). Meist scheinen Lysin-Reste in unstrukturierten Bereichen oder α -Helices pupyliert zu werden, wobei sie meist zugänglich in peripheren Bereichen (bzw. peripheren Untereinheiten) des Zielproteins liegen.

Für die ersten pupylierten Proteine, z. B. das bereits erwähnte FabD, wurde auch eine Akkumulation in pupylierungsdefizienten Stämmen gezeigt, was für einen Pup-vermittelten Abbau im Proteasom spricht (Pearce *et al.*, 2008). In der Pupylom-Studie von Festa *et al.* (2010) wurden zusätzlich 41 pupylierte Proteine rekombinant in *M. tuberculosis* exprimiert. Dabei konnte für die meisten dieser Zielproteine jedoch kein Unterschied der Proteinmenge unter den verwendeten Bedingungen in *pafA*- bzw. *mpa*-Mutanten festgestellt werden. Ein

Pup-vermittelter Abbau im Proteasom konnte eindeutig für die Isocitrat-Lyase (Icl), den *Mtb response regulator A* (MtrA), die erwähnte Ino1 und ein putatives, durch Phosphatmangel induziertes Protein (PhoH2) gezeigt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht alle pupylierten Proteine auch dem Abbau durch das Proteasom unterliegen, oder zumindest nicht unter allen Bedingungen.

1.3.4 *C. glutamicum* und die Pupylierung

Eine Möglichkeit Pupylierung unabhängig vom Proteasom zu untersuchen, sind Actinobakterien, die zwar die Pupylierungsmaschinerie besitzen, aber kein Proteasom. Dies trifft unter anderem auf *C. glutamicum* zu (Abbildung 3). Das Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 enthält die Gene *pup* (cg1689), *pafA* (cg1688), *arc* (cg1691) und *dop* (cg1690). Folglich wäre ein Ablauf der Pupylierung in *C. glutamicum* möglich, wie er in Abbildung 6 dargestellt ist.

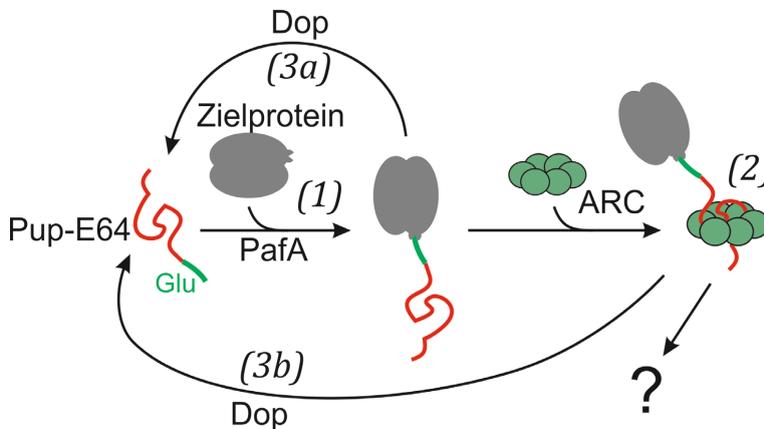


Abbildung 6. Mutmaßliche Interaktion der an der Pupylierung beteiligten Schlüsselproteine in *C. glutamicum*. Pup, prokaryotisches, Ubiquitin-ähnliches Protein, Dop, Depupylase, PafA, Pup-Ligase, ARC, AAA+-ATPase. Pup (Cg1689) wird mutmaßlich über die Pup-Ligase PafA (Cg1688) an Zielproteine gebunden (1) und pupylierte Proteine von ARC (Cg1691) erkannt (2). Dop (Cg1690) kann pupylierte Proteine mit oder ohne Unterstützung durch ARC depupylieren (3a,b). Das Schicksal pupylierter Proteine in *C. glutamicum* ist unbekannt.

Die Abwesenheit eines Proteasoms in *C. glutamicum* wirft die Frage auf, was mit pupylierten Substraten passiert. Soweit bekannt, besitzt *C. glutamicum* für die Proteolyse zwei ATP-abhängige Proteasen, ClpP₁P₂ (Engels *et al.*, 2004) und FtsH (Lüdke *et al.*, 2007), die in ihrer Struktur dem Proteasom ähneln. Sie sind ebenfalls aus Homohepta- bzw. -hexameren Ringen aufgebaut und benötigen die Aktivität von ATPasen, die große Proteine entfalten. Im Falle von FtsH ist diese Aktivität ein Teil der Protease selbst (Sauer & Baker, 2011). Das für die Interaktion mit dem Proteasom wichtige vorletzte Tyrosin in Mpa/ARC (siehe Kapitel 1.3.2) fehlt in ARC von *C. glutamicum*, und rekombinantes CgARC konnte *in vitro* nicht pupyliert werden (Delley *et al.*, 2012). CgPup besitzt außerdem ein C-terminales Glutamat und muss daher nicht durch Dop desamidiert werden. *In-vitro*-Experimente konnten zeigen, dass Dop in *C. glutamicum* vermutlich aufgrund der katalysierten Depupylierung relevant ist. Ne-

ben Zell-Lysat von *C. glutamicum* konnte auch isoliertes, rekombinantes CgDop pupylierte Substrate aus *M. tuberculosis in vitro* depuplieren (Imkamp *et al.*, 2010). Außerdem beschleunigte die Anwesenheit von Mpa in manchen Fällen die Depupylierung von Substraten aus *M. tuberculosis* durch CgDop *in vitro*, da es vermutlich diese Substrate entfaltet, um den pupylierten Rest besser zugänglich zu machen. Laut Striebel *et al.* (2014) könnte das ein Hinweis darauf sein, warum trotz Fehlens des Proteasoms in *C. glutamicum* die ATPase ARC vorhanden ist.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Trotz einiger Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen der Pupylierungsmaschinerie aus *C. glutamicum* war bei Beginn dieser Arbeit noch unbekannt, ob Pupylierung in *C. glutamicum in vivo* stattfindet. Außerdem war auch unbekannt, welche Proteine dort pupyliert werden, und vor allem, welche physiologische Funktion die Pupylierung in diesem Organismus hat. Auch die Funktion und etwaige Interaktionspartner von ARC waren unbekannt. Deshalb wurden folgende Ziele im Laufe diese Arbeit verfolgt:

1. **Identifizierung pupylierter Proteine in *C. glutamicum*.** Dazu sollte Pup mittels eines N-terminalen Affinitätstags aus einer *C. glutamicum* Δpup -Mutante gereinigt werden. Alle dabei co-gereinigten Proteine sollten über Massenspektrometrie identifiziert und nach pupylierten Aminosäure-Resten abgesucht werden. Falls pupylierte Proteine identifiziert werden, sollte auch untersucht werden, ob das Nichtvorhandensein eines Proteasoms in *C. glutamicum* Auswirkungen auf das Substratspektrum von Pup im Vergleich zu bekannten Pupylogen aus *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* oder *R. erythropolis* hat.
2. **Untersuchung der physiologischen Funktion der Pupylierung in *C. glutamicum*.** Wie oben erwähnt, ist die Pupylierung für *M. tuberculosis* bei nitrosativem Stress wichtig. Durch Kultivierungen der *C. glutamicum* Δpup -Mutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen sollte herausgefunden werden, unter welchen Bedingungen die Pupylierung eine Rolle spielt.
3. **Bestimmung des Schicksals pupylierter Proteine.** Es sollte die Stabilität von pupylierten Proteinen untersucht werden, um herauszufinden, ob auch in *C. glutamicum* Pup-abhängig eine Proteasom-unabhängige Proteolyse stattfindet. Desweiteren sollten über Reinigung von ARC mittels Affinitätstags Proteine bestimmt werden, die mit ARC interagieren, um ein Modell entwickeln zu können, welche Auswirkungen die Pupylierung auf modifizierte Proteine hat.

QUIDQUID AGIS PRUDENTER AGAS ET RESPICE FINEM

2 Material und Methoden

Für die vorliegende 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*. Enzyme mit den jeweiligen Puffern wurden von Thermo Scientific (Schwerte), Roche Diagnostics (Mannheim) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Materialien anderer Hersteller sind gesondert aufgeführt. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, beziehen sich Städtenamen in Klammern auf Städte in Deutschland.

2.1 Stammlösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit dH₂O angesetzt.

6x DNA-Ladepuffer	250 µg/ml Bromphenolblau, 400 mg/ml Saccharose
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS
10x PBS-Puffer	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄
50x TAE-Puffer	100 mM Na ₂ EDTA·2H ₂ O, 2 M Tris, mit Eisessig auf pH 8,5 eingestellt
10x TBS-Puffer	500 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4
Acetatlösung	25% (w/v) (autoklaviert); 3,05 M NaAcetat·3H ₂ O
Biotinlösung	0,8 mM (sterilfiltriert)
Calciumchloridlösung	250 mM CaCl ₂ (sterilfiltriert)
Citratlösung	1,25 M Na ₃ -Citrat (autoklaviert)
DTT-Lösung	2 M DTT (sterilfiltriert)
Eisenlösung	500 mM FeSO ₄ ·7H ₂ O (sterilfiltriert)
Gluconatlösung	2,5 M Na-Gluconat (autoklaviert)
Glucoselösung	40% (w/v) (autoklaviert); 2,22 M Glucose·H ₂ O
IPTG-Lösung	1 M IPTG (sterilfiltriert)

Kupfersulfatlösung	1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)
Lactatlösung	2,5 M Na-Lactat (autoklaviert)
NNix-Puffer	50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0, 500 mM NaCl, x mM Imidazol
PBST-Puffer	1x PBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween-20
Protocatechusäurelösung	195 mM in 1 M NaOH gelöst (sterilfiltriert)
Puffer E	100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mM NaCl, 5 mM Desthiobiotin
Puffer R	100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mM NaCl, 1 mM HABA (4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure)
Puffer W	100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
Spurensalzlösung	36 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,5 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 800 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 84 μM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1) (sterilfiltriert)
Stripping-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 100 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
TBST-Puffer	1x TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Antibiotika	
Carbenicillin	50 mg/ml (sterilfiltriert), gelöst in 70% Ethanol
Kanamycin	50 mg/ml (sterilfiltriert)

2.2 Nährmedien

Alle Medien wurden mit dH_2O angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. BHI-basierte Medien wurden 15 min autoklaviert.

BHI-Medium	37 g/l Brain Heart Infusion
BHI-Saccharose-Medium	BHI-Medium mit 100 g/l Saccharose (separat autoklaviert)
BHIS-Medium	BHI-Medium mit 91 g/l Sorbitol (separat autoklaviert)

CGXII-Medium	20 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g/l Harnstoff, 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l K ₂ HPO ₄ , 0,25 g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, 10 mg/l CaCl ₂ , 42 g/l MOPS, pH 7,0 (mit KOH-Plätzchen eingestellt), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure, 1 ml/l Biotin, 1 ml/l Spurensalzlösung und Glucose-Stammlösung (für die gewünschte Zielkonzentration entsprechend verdünnt, z.B. 1:10 für 4% \cong 222 mM) zugeben
LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt

Für Agarplatten wurden den Medien 18 g/l Agar-Agar zugesetzt. Wenn erforderlich, wurde zur selektiven Kultivierung von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen den Nährmedien Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml (*E. coli*) oder 25 µg/ml (*C. glutamicum*) oder Carbenicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml (*E. coli*) zugesetzt. Für die Induktion der Expression von Genen über den Promotor P_{tac} wurde, wenn nicht anders erwähnt, eine Endkonzentration von 1 mM IPTG zugesetzt.

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie ihre Charakteristika und Herkunft sind in Tabelle 1 aufgelistet. Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten bzw. hergestellten Plasmide.

Tabelle 1. In dieser Arbeit verwendete/hergestellte Bakterienstämme mit den entsprechenden Charakteristika sowie Referenzangaben.

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) (Wirtsstamm für die Überproduktion von Proteinen mittels pET-Vektoren; enthält den lysogenen Phagen λ DE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen 1 unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren <i>lacUV5</i> -Promotors trägt)	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp-(WT-)Stamm, Biotin-auxotroph	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
Δ <i>pup</i>	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>pup</i> -Gens (cg1689)	Diese Arbeit
Δ <i>pup</i> Δ <i>dop</i>	Δ <i>pup</i> -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>dop</i> -Gens (cg1690)	Diese Arbeit
Δ <i>pup</i> Δ <i>arc</i>	Δ <i>pup</i> -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>arc</i> -Gens (cg1691)	Diese Arbeit
Δ <i>pup</i> Δ <i>dop</i> Δ <i>arc</i>	Δ <i>pup</i> Δ <i>dop</i> -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>arc</i> -Gens (cg1691)	Diese Arbeit
Δ <i>pup</i> Δ <i>ftn</i>	Δ <i>pup</i> -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>ftn</i> -Gens (cg2782) in	Diese Arbeit
Δ <i>pup</i> Δ <i>dps</i>	Δ <i>pup</i> -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>dps</i> -Gens (cg3327)	Diese Arbeit
Δ <i>pup</i> Δ <i>ftn</i> Δ <i>dps</i>	Δ <i>pup</i> Δ <i>ftn</i> -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>dps</i> -Gens (cg3327)	Diese Arbeit
7xHis- <i>pup</i>	WT-Derivat mit einer <i>pup</i> -Genvariante (cg1689), die chromosomal für ein N-terminal Heptahistidin-getaggttes Pup kodiert	Diese Arbeit

Stamm	Charakteristika	Referenz
Δarc	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>arc</i> -Gens (cg1691)	Diese Arbeit
$\Delta arc\Delta ftn$	Δarc -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>ftn</i> -Gens (cg2782)	Diese Arbeit
Δdop	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>dop</i> -Gens (cg1690)	Diese Arbeit
Δftn	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>ftn</i> -Gens (cg2782)	Diese Arbeit
$\Delta ftn\Delta dps$	Δftn -Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>dps</i> -Gens (cg3327)	Diese Arbeit
<i>ftn</i> -K78A	WT mit Nukleotid austauschen A232G, A233C, G234T und T237A in <i>ftn</i> (cg2782), führt zu einer Ftn-Lys78Ala Mutante	Diese Arbeit
<i>ftn</i> -K78R	WT mit Nukleotid austauschen A232C, A233G, G234T und T237A in <i>ftn</i> (cg2782), führt zu einer Ftn-Lys78Arg Mutante	Diese Arbeit
<i>ftn</i> -Strep	Δftn -Derivat mit einer <i>ftn</i> -Genvariante (cg2782), die chromosomal für ein C-terminal Strep-getaggt Ftn kodiert	Diese Arbeit
Δpup <i>ftn</i> -Strep	Δpup Δftn -Derivat mit einer <i>ftn</i> -Genvariante (cg2782), die chromosomal für ein C-terminal Strep-getaggt Ftn kodiert	Diese Arbeit
Δdps	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>dps</i> -Gens (cg3327)	Diese Arbeit
$\Delta pepC$	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>pepC</i> -Gens (cg1693)	Diese Arbeit
$\Delta pepQ$	WT-Derivat mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>pepQ</i> -Gens (cg1826)	Diese Arbeit

Tabelle 2. In dieser Arbeit verwendete/hergestellte Plasmide für *C. glutamicum* und *E. coli* mit den entsprechenden Charakteristika inklusive der für die Klonierung benutzten Restriktionsenzyme sowie Referenzangaben.

Plasmid	Charakteristika (Restriktionsenzyme)	Referenz
Plasmide für den Zielorganismus <i>E. coli</i>		
pET-22b	Amp ^R ; Vektor zur Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , fügt einen C-terminalen Hexahistidin-Tag an das Zielprotein (pBR322 <i>oriV_{E.c.}</i> , P _{T7} , <i>lacI</i>)	Novagen
pET-22b-pafA	Amp ^R ; pET-22b-Derivat, kodiert für PafA (Cg1688) mit C-terminalem Heptahistidin-Tag zur Reinigung von PafA aus <i>E. coli</i> (NdeI/XhoI)	Diese Arbeit
pET-TEV1	Kan ^R , pET-28b-Derivat für die heterologe Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , fügt einen N-terminalen Decahistidin-Tag und eine TEV-Protease-Schnittstelle an das Zielprotein (pBR322 <i>oriV_{E.c.}</i> , P _{T7} , <i>lacI</i>) an	(Bussmann <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV1-pup	Kan ^R , pET-TEV1-Derivat, kodiert für Pup (Cg1689) mit N-terminalem Decahistidin-Tag und einer TEV-Protease-Schnittstelle zur Reinigung von Pup aus <i>E. coli</i> (NdeI/BamHI)	Diese Arbeit
pET-TEV1- <i>ftn</i>	Kan ^R , pET-TEV1-Derivat, kodiert für Ftn (Cg2782) mit N-terminalem Decahistidin-Tag und einer TEV-Protease-Schnittstelle zur Reinigung von Ftn aus <i>E. coli</i> (NdeI/BamHI)	Diese Arbeit
Plasmide für den Zielorganismus <i>C. glutamicum</i> (Shuttle-Vektoren mit Replikationsursprung für <i>E. coli</i>)		
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 <i>et al.</i> , 1994)
pK19 <i>mobsacB</i> - Δpup	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1204 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>pup</i> umfasst (PstI/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δdop	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1278 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>dop</i> umfasst (PstI/BamHI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δdop (für Δdop in Δpup)	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1128 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>dop</i> in <i>C. glutamicum</i> Δpup umfasst (PstI/BamHI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δarc	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1148 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>arc</i> umfasst (PstI/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δarc (für Δarc in Δpup Δdop)	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1253 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>arc</i> in <i>C. glutamicum</i> Δpup Δdop umfasst (PstI/EcoRI)	Diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika (Restriktionsenzyme)	Referenz
pK19 <i>mobsacB</i> -7xHis- <i>pup</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1393 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>pup</i> und das Gen selbst umfasst und diesem einen N-terminalen Heptahistidin-Tag sowie eine interne ApaLI Schnittstelle zur Selektion anfügt (PstI/BamHI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - <i>ftn</i> -K78R	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1661 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>ftn</i> und das Gen selbst umfasst, das für eine Ftn-Lys78Arg Variante kodiert, sowie eine interne XbaI-Schnittstelle zur Selektion enthält (Sall/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - <i>ftn</i> -K78A	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1661 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>ftn</i> und das Gen selbst umfasst, das für eine Ftn-Lys78Ala Variante kodiert, sowie eine interne XbaI Schnittstelle zur Selektion enthält (Sall/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>ftn</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1253 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>ftn</i> umfasst (Sall/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - <i>ftn</i> -Strep	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1726 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>ftn</i> und das Gen selbst umfasst und diesem einen C-terminalen Strep-Tag anfügt (Sall/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>dps</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1272 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>dps</i> umfasst (EcoRI/XbaI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>pepC</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1151 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>pepC</i> umfasst (Sall/EcoRI)	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>pepQ</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1062 bp-Overlap-Extension-PCR-Produkt, das die flankierenden Bereiche von <i>pepQ</i> umfasst (BamHI/EcoRI)	Diese Arbeit
pVWEx1	Kan ^R , <i>E. coli</i> -C. <i>glutamicum</i> -Shuttlevektor für die regulierte Genexpression (<i>P_{tac}</i> , <i>lacI^q</i> , pBL1 <i>oriV_{Cg}</i> , pUC18 <i>oriV_{E.c.}</i>)	(Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 2001)
pVWEx1-6xHis- <i>pup</i>	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 236 bp-Fragment kodierend für ein Pup-Derivat mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-6xHis- <i>pup</i> E64A	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 236 bp-Fragment kodierend für ein Pup-Derivat mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag, sowie einem Glu64Ala Austausch (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-Strep- <i>pup</i>	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 242 bp-Fragment kodierend für ein Pup-Derivat mit einem N-terminalen Strep-Tag (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1- <i>pup</i>	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 308 bp-Fragment kodierend für ein Pup-Derivat mit einem N-terminalen Decahistidin-Tag und TEV-Protease Schnittstelle (kloniert aus pET-TEV1- <i>pup</i>) (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1- <i>pup</i> -E64A	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 308 bp-Fragment kodierend für ein Pup-Derivat mit einem N-terminalen Decahistidin-Tag und TEV-Protease Schnittstelle sowie einem Glu64Ala Austausch (kloniert aus pET-TEV1- <i>pup</i>) (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-7xHis- <i>arc</i>	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1649 bp-Fragment kodierend für ein ARC-Derivat mit einem N-terminalen Heptahistidin-Tag (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1- <i>arc</i> -7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1649 bp-Fragment kodierend für ein ARC-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-Strep- <i>arc</i>	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1646 bp-Fragment kodierend für ein ARC-Derivat mit einem N-terminalen Strep-Tag (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1- <i>arc</i> -Strep	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1643 bp-Fragment kodierend für ein ARC-Derivat mit einem C-terminalen Strep-Tag (PstI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-Strep- <i>pup</i> -7xHis- <i>ftn</i>	Kan ^R , pVWEx1-Strep- <i>pup</i> -Derivat mit einem 552 bp-Fragment kodierend für ein Ftn-Derivat mit einem N-terminalen Heptahistidin-Tag (BamHI-KpnI)	Diese Arbeit
pVWEx1-Strep- <i>pup</i> -7xHis- <i>ftn</i> -K78A	Kan ^R , pVWEx1-Strep- <i>pup</i> -Derivat mit einem 552 bp-Fragment kodierend für ein Ftn-Derivat mit einem N-terminalen Heptahistidin-Tag sowie einem Austausch des pupylierten Lys78 zu Ala (BamHI-KpnI)	Diese Arbeit
pVWEx1- <i>ftn</i> -Strep	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 552 bp-Fragment kodierend für ein Ftn-Derivat mit einem C-terminalen Strep-Tag (BamHI-KpnI)	Diese Arbeit
pVWEx1- <i>dop</i>	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1580 bp-Fragment kodierend für das	Diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika (Restriktionsenzyme)	Referenz
	Dop Protein (XbaI-KpnI)	
pVWEx1-serS-7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1325 bp-Fragment kodierend für ein SerS-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag (BamHI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-serS-K58A-7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1325 bp-Fragment kodierend für ein SerS-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag sowie einem Austausch des mutmaßlich pupylierten Lys58 zu Ala (BamHI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-serS-R67A-7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1325 bp-Fragment kodierend für ein SerS-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag sowie einem Austausch des mutmaßlich pupylierten Arg67 zu Ala (BamHI-BamHI)	Diese Arbeit
pVWEx1-pepO-7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1985 bp-Fragment kodierend für ein PepO-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag (BamHI-KpnI)	Diese Arbeit
pVWEx1-pepO-K398A-7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1985 bp-Fragment kodierend für ein PepO-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag sowie einem Austausch des mutmaßlich pupylierten Lys398 zu Ala (BamHI-KpnI)	Diese Arbeit
pVWEx1-pepO-R402A-7xHis	Kan ^R , pVWEx1-Derivat mit einem 1985 bp-Fragment kodierend für ein PepO-Derivat mit einem C-terminalen Heptahistidin-Tag sowie einem Austausch des mutmaßlich pupylierten Arg402 zu Ala (BamHI-KpnI)	Diese Arbeit

2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Biogio (Nijmegen, Niederlande) synthetisiert und sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und die entsprechenden Enzyme in der letzten Spalte aufgeführt. Komplementäre Sequenzen der Crossover-PCR-Oligonukleotide sind kursiv geschrieben. Die für die ausgetauschten Aminosäuren oder Affinitätstags kodierenden Basen sind fett geschrieben.

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktionsendonuklease
Primer zur Konstruktion von pK19mobsacB-Δpup und Überprüfung (_check) der Δpup-Mutante		
pup5'o	AGACTG <u>CAGT</u> CACGCACTGGTATCCAAGG	PstI
pup5'i	CCCATCCACTAAACTTAAACACTTTGCGTTCACTACACTCAC	
pup3'o	AGAGAATT <u>C</u> GAGCGCTGGGATATGCAGTAG	EcoRI
pup3'i	TGTTTAAGTTT <u>A</u> GTGGATGGGGGTGGCGAATAGTCACTGTG	
Δpup-check-fw	TAGTGGTGGCACTTGATACG	
Δpup-check-rv	CCTGCAGTACAGCGATATTG	
Primer zur Konstruktion von pK19mobsacB-Δdop und Überprüfung (_check) der Δdop-Mutante		
dop5'o	AGACTG <u>CAG</u> GAGGATCTGTCCAATGTCATC	PstI
dop5'i	CCCATCCACTAAACTTAAACAGCTTAAAAACGGTGACAGCG	
dop3'o	AGAGGAT <u>C</u> GAAACCCACATCAAGATACAAC	BamHI
dop3'i	TGTTTAAGTTT <u>A</u> GTGGATGGGGAGGGTCTTGAAAAGGAAAAC	
Δdop-check-fw	TAAGAATTGCCACGGAATC	
Δdop-check-rv	TGAGACAGAGCGACAGATCC	
Primer zur Konstruktion von pK19mobsacB-Δarc und Überprüfung (_check) der Δarc-Mutante		
arc5'o	AGACTG <u>CAG</u> GTGGGTGAAAAGGGCAATGTC	PstI
arc5'i	CCCATCCACTAAACTTAAACAAGAATTAGAGGGCGAAGAATC	
arc3'o	AGAGAATT <u>C</u> GATCAATGCCTGAGCCAGC	EcoRI
arc3'i	TGTTTAAGTTT <u>A</u> GTGGATGGGGAATGGTCCAGGATCACTGG	

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
<i>Δarc-check-fw</i>	ACTGTCCATGGCGTGCTTC	
<i>Δarc-check-rv</i>	ATGATGACCTGGCGGCACAC	
<i>arc3'o-new</i>	AGAGAATT <u>CGA</u> ACCCACATCAAGATACAAC	EcoRI
Primer zur Konstruktion von pK19<i>mobsacB-Δftn</i> und Überprüfung (_check) der <i>Δftn</i>-Mutante		
<i>ftn5'o</i>	AGAG <u>TCCGAC</u> AGTTACCGGTCAGACGATCC	Sall
<i>ftn5'i</i>	CCCATCCACTAAACTTAAACATGATGCGATCTTCTCGTTG	
<i>ftn3'o</i>	AGAGAATT <u>CCG</u> AAGCTCGGTAAGAGACTG	EcoRI
<i>ftn3'i</i>	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTGCGCATCGACGGCGAAC	
<i>Δftn-check-fw</i>	CCCAGCTCTTGATGTCGTTGG	
<i>Δftn-check-rv</i>	CTGCGCGCGGCAATCGGTTCC	
Primer zur Konstruktion von pK19<i>mobsacB-Δdps</i> und Überprüfung (_check) der <i>Δdps</i>-Mutante		
<i>dps5'o</i>	AGAGAATT <u>CGA</u> ACCAATGCTTCGCCCTGAG	EcoRI
<i>dps5'i</i>	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGTCCAGGGACTGTGTAGTTTGCCAT	
<i>dps3'o</i>	AGAT <u>CTAGAG</u> TGCGAATCCGATGCTCATAG	XbaI
<i>dps3'i</i>	CCCATCCACTAAACTTAAACAGACGGAAACATCCAAGAGTAA	
<i>Δdps-check-fw</i>	CACGGTAGATATTTCCACAC	
<i>Δdps-check-rv</i>	GCTCGCGCGGCTCATTGATG	
Primer zur Konstruktion von pK19<i>mobsacB-ΔpepQ</i> und Überprüfung (_check) der <i>ΔpepQ</i>-Mutante		
<i>pepQ5'o</i>	AGAGGAT <u>CCG</u> GTCGGCCAAGACCTCAAAG	BamHI
<i>pepQ5'i</i>	CCCATCCACTAAACTTAAACACAGTTTTCGGCAAGTGC GCGACG	
<i>pepQ3'o</i>	AGAGAATT <u>CCG</u> GAAGAGTGCCTCGCCTTCG	EcoRI
<i>pepQ3'i</i>	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGTGAGGACCCGAAATCATC	
<i>ΔpepQ-check-fw</i>	AGTCGAAGGCTCCACCTAC	
<i>ΔpepQ-check-rv</i>	TCGGTGTGCTCGACGCGGAG	
Primer zur Konstruktion von pK19<i>mobsacB-ΔpepC</i> und Überprüfung (_check) der <i>ΔpepC</i>-Mutante		
<i>pepC5'o</i>	AGAG <u>TCCGAC</u> CGTTGGGCAGCACAGTGTCCAC	Sall
<i>pepC5'i</i>	CCCATCCACTAAACTTAAACAGTGATAGGAACCTGGGCTTAG	
<i>pepC3'o</i>	AGAGAATT <u>CCG</u> ACGTTGGAGACTGCGTAC	EcoRI
<i>pepC3'i</i>	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGGAGTGAAGGATCTGATGTG	
<i>ΔpepC-check-fw</i>	CCAGTCTTGTAGTCGATAAC	
<i>ΔpepC-check-rv</i>	CTTCTTTCAGGTCACCAAGAC	
Zusätzliche Primer zur Konstruktion von chromosomalem 7xHis-<i>pup</i>		
<i>pup5'i-HIS</i>	CCATAATTTGGGTTTGCCTTTCGCTTGTGATGGTGGTATGGTGGTGCAC <u>TACACT</u> - CACTCTCCTGC	ApaLI (intern)
<i>pup3'i-HIS</i>	GCAGGAGAGTGAGTGTAGTGCACCACCATCACCACCATCA- CAACGCAAAGCAAACCCAAATTATGG	ApaLI (intern)
Zusätzliche Primer zur Konstruktion von chromosomalem Austausch <i>ftnK78A</i>-<i>K78R</i>		
<i>ftn5'ik78A</i>	GCCTCGATAGCGGAGGTGACAT <u>CTAGAG</u> CTGGTGGTGCAATGTACCCGATCTGTG	XbaI (intern)
<i>ftn3'ik78A</i>	CACAGATCGGTGACATTCGACCACCA <u>GCTCTAG</u> ATGTACCTCCGCTATCGAGGC	XbaI (intern)
<i>ftn5'ik78R</i>	GCCTCGATAGCGGAGGTGACAT <u>CTAGAG</u> CGTGGTGGTGCAATGTACCCGATCTGTG	XbaI (intern)
<i>ftn3'ik78R</i>	CACAGATCGGTGACATTCGACCACCA <u>CGTCTAG</u> ATGTACCTCCGCTATCGAGGC	XbaI (intern)
Zusätzliche Primer zur Konstruktion von chromosomalem <i>ftn</i>-Strep		
<i>ftnStrep3'i</i>	ACGGCGAACTCGGCTCCCGCTGGTCCCA <u>CCACAGTTCGAGAAGTAAATT</u> -	

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
	CCCCGCAGTTTTTAATGCTCC	
ftnStrep5'i	GGAGCATTAAAACTGCGGGGAATTTACTTCTCGAACTGTGGGTGGGACCA- GCGGGAGCCGAGTTCCGCCGT	
Primer zur Konstruktion von pET-22b-pafA, pET-TEV1-pup und -ftn		
pafEX-fw	AGACATATGAGTACCGTGGAAATCCGCATTG	NdeI
pafEX-rv	AGACTCGAGACTGCGATAGCTCTCCGCATG	XhoI
pupEX-fw	AGACATATGAACGCCAAAGCAAACCCAAATTATGG	NdeI
pup-rv	AGAGGATCCCTATTCCGCCACCCTTTTGTACATAGG	BamHI
ftnEX-fw	AGACATATGACAATCAACGAGAAGATC	NdeI
ftnEX-rv	AGAGGATCCCTTAGCGGGAGCCGAGTTCCG	BamHI
Primer zur Konstruktion von pVWEx1-6xHis-pup, -E64A, -Strep-pup, -pup, -E64A sowie -dop		
pup-fwHIS	AGACTGCAGGAAAGGAGGATAGCAGAATGGCACACCACCATCACCATCA- CAACGCCAAAGCAAACCCAAATTATGG	PstI
pup-fwSTREP	AGACTGCAGGAAAGGAGGATAGCAGAATGGCATGGTCCCACCCACAGTT- CGAGAAGAACGCCAAAGCAAACCCAAATTATGG	PstI
pupSD-fw	AGACTGCAGAAGAAGGAGATATACCATGGGCAG	PstI
pup-rv	AGAGGATCCCTATTCCGCCACCCTTTTGTACATAGG	BamHI
pup-rvALA	AGAGGATCCCTATGCGCCACCCTTTTGTACATAGG	BamHI
dop-fw	AGATCTAGAGAAAGGAGGATAGCAGAATGGCGCTTTTATGGGATCG	XbaI
dop-rv	CAGGGTACCCTAAATAGCTTGGATGGCCC	KpnI
Primer zur Konstruktion von pVWEx1-7xHis-arc, -Strep-arc, -arc-7xHis und -arc-Strep		
arc-fw	AGACTGCAGGAAAGGAGGATAGCAGAATGGTGACCATGAGTTCCACCAACTG	PstI
arc-rvHIS7x	AGAGGATCCCTAATGATGATGATGATGATGATGATGATAACCACCTCTGCGTGAG	BamHI
arc-fwHIS7x	AGACTGCAGGAAAGGAGGATAGCAGAATGCATCATCATCATCATCATATGGT- GACCATGAGTTCACCAACTG	PstI
arc-rv	AGAGGATCCCTTAGATAACCACCTCTGCGTGAG	BamHI
arc-fwStrep	AGACTGCAGGAAAGGAGGATAGCAGAATGGTCCCACCCACAGTTCGAGAA- GATGGTGACCATGAGTTCACCAACTG	PstI
arc-rvStrep	AGAGGATCCCTTACTTCTCGAACTGTGGGTGGGACCAGATAACCACCTCTGCGTGAG	BamHI
Primer zur Konstruktion von pVWEx1-Strep-pup-7xHis-ftn, -K78A sowie pVWEx1-ftn-Strep		
HISftn-fw	AGAGGATCCGAAAGGAGGATAGCAGAATGCACCACCATCACCACCATCACAT- GACAATCAACGAGAAGATC	BamHI
ftn-rv	AGAGGTACCGAATTTAGCGGGAGCCGAGTTCCG	KpnI
ftn-fw	AGAGGATCCGAAAGGAGGATAGCAGAATGACAATCAACGAGAAGATC	BamHI
ftnStrep-rv	AGAGGTACCGAATTTACTTCTCGAACTGTGGGTGGGACCAGCGG- GAGCCGAGTTCCG	KpnI
Primer zur Konstruktion von pVWEx1-serS-7xHis, -K58A-7xHis, -R67A-7xHis, sowie -pepO-7xHis, -K398A-7xHis und -R402A-7xHis		
sers5'o	AGAGGATCCGAAAGGAGGATAGCAGAATGATCGACTGAAATTCCTC	BamHI
sers5'iR67A	GAACCTCCAGAAGTGCAGGGCGTCTCCGGAGAGGCTGTG	
sers3'iR67A	GACAGGCTCTCCGGAGGACGCCCTGCCTTCTGGAGGGTTC	
sers5'ik58A	CTCCGGAGAGGCTGTCCGATCGCCTTTCCAAAAGCCTTCTGC	
sers3'ik58A	GCAGAAGGCTTTTGGAAAGCGCATCGGACAGGCTCTCCGGAG	
sers3'o7xHIS	AGAGGATCCCTTAGTGATGGTGGTGATGGTGGTGACCGGCTTGTTCCTGCTTG	BamHI
pepo5'o	AGAGGATCCGAAAGGAGGATAGCAGAATGAAGGATCTTTATCGCTTTGTG	BamHI
pepo5'iR402A	GTGGGTGGTGACCCATTCGTCGGCGTCCGGCTGGTTTCCGATCTTG	
pepo3'iR402A	CAAGATCGGCAAACAGCCGACGCCACGAATGGGTACCACCCCCAC	

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
pepo5'iK398A	CATTCGTCGCGGTGCGCTGGTGCGCCGATCTTGCCAGCTCATAG	
pepo3'iK398A	CTATGAGCTGGGCAAGATCGGGCGCACCAGCCGACCGACGAATG	
pepo3'o7xHIS	AGAGGTACCCTAGTGATGGTGGTGGTGGTGCCAGATAGCTAGGCCGCTCTTC	KpnI
Primer zur Sequenzierung von pVWEx1- bzw. pK19mobsacB-Derivaten		
pEKExfw	GATATGACCATGATTACGCCAAGC	
pEKExrv	ACGGCGTTTCACTTCTGAGT	
M13fw	TGTAAACGACGGCCAGT	
M13rv	GGAAACAGCTATGACCAT	

2.5 Kultivierung von Bakterienstämmen

2.5.1 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienstämmen

Die Zelldichte der Bakterien in einer Flüssigkultur wurde anhand der scheinbaren optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) mit einem Shimadzu UV/Vis-Spektrometer/Photometer UV-1800 (Shimadzu GmbH, Duisburg) bestimmt. Eine lineare Korrelation zwischen der Zelldichte und der OD_{600} war zwischen einer Extinktion von 0,05 und 0,5 gegeben. Lag die gemessene Extinktion höher als 0,5, wurde die Probe entsprechend mit dH_2O verdünnt. Als Blindwert diente ebenfalls dH_2O . Wurde die Probe allerdings weniger als 1:5 verdünnt, wurde dem Blindwert dieselbe Menge Medium zugefügt, wie Zellextrakt in der Probe vorhanden war. Die Trockenzellmasse (TZM) wurde über die OD_{600} berechnet, dazu wurde der von Kabus *et al.* (2007) bestimmte Wert von $0,25 \text{ g TZM/l} \cong OD_{600} = 1$ herangezogen.

2.5.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden standardmäßig bei 37°C in LB-Medium kultiviert (Sambrook *et al.*, 2001). Für Plasmid-Isolierungen und die Stammhaltung wurden 5 ml LB Kulturen über Nacht bei 170 rpm geschüttelt. Davon wurden 4,5 ml für die Plasmidisolierung verwendet; 500 µl wurden mit gleichem Volumen an 87%igem (v/v) Glycerol vermischt und in Kryoröhrchen bei -85°C gelagert. Agarplatten mit *E. coli* Stämmen wurden entweder über Nacht bei 37°C oder für max. 48 h bei RT inkubiert.

Für Expressionskulturen wurden 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in 2 l-Erlenmeyerkolben mit zwei oder vier Schikanen mit einer ÜNK auf eine OD_{600} von 0,08 beimpft und bei 37°C und 90 rpm geschüttelt, bis eine OD_{600} von 0,7-0,8 erreicht war. Dann wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und bei 20 oder 25°C für 24 h weitergeschüttelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 4.400 g, 4°C), das Pellet wurde daraufhin mit dem entsprechenden Aufschlusspuffer gewaschen und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Kultivierung von *C. glutamicum* im Schüttelkolben

C. glutamicum wurde standardmäßig in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanten kultiviert, die 50 ml CGXII-Minimalmedium (Keilhauer *et al.*, 1993) sowie 4% (w/v) Glucose (222 mM) als Kohlenstoffquelle enthielten und bei 30°C und 130 rpm inkubiert wurden. Zum Inokulieren der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als zwei Tage waren. Wenn nicht anders angeführt, erfolgte die Kultivierung immer in drei unabhängigen biologischen Replikaten. Die Vorkultivierung erfolgte zunächst für 8 h bei 180 rpm in 5 ml BHI-Medium. Daraus wurden 500 µl in 20 ml CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose überimpft und für 16 h bei 140 rpm geschüttelt. Die Hauptkulturen (50 ml) wurden, wenn nicht explizit erwähnt, auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft. Zur Untersuchung des Wachstums unter Eisenmangel wurde sowohl in der 20 ml Vorkultur als auch in der Hauptkultur CGXII-Medium mit 4% (w/v) Glucose verwendet, dem nur 1 µM (= Eisenmangelmedium) anstatt 36 µM Eisen zugesetzt worden war. Außerdem wurden die Zellen vor jedem Überimpfen in frischem Medium, das für die zu beimpfende Kultur verwendet werden sollte, gewaschen. Zur Gesamt-RNA-Isolierung wurden die Zellen entweder in CGXII-Glucose-Minimalmedium oder BHI-Medium (Start-OD₆₀₀ = 0,5; Ernte bei OD₆₀₀ von ca. 4-5) oder in CGXII-Eisenmangel-Medium (Start-OD₆₀₀ = 1,5; Ernte bei OD₆₀₀ von ca. 3) wie beschrieben kultiviert. Für die Bestimmung von Metaboliten im Kulturüberstand wurde 1 ml Zellkultur entnommen, 1 min bei 17.600 g zentrifugiert und dieser Überstand für die Messungen verwendet (siehe Kapitel 2.9). Außerdem wurde in diesem Überstand mittels einer pH-Elektrode (InLab® Semi-Micro-L, Mettler-Toledo, Gießen) der pH-Wert bestimmt.

Für die Expression von Proteinen in *C. glutamicum* wurde eine ÜNK bestehend aus 20 ml BHI-Medium mit Einzelkolonien des entsprechenden Stammes beimpft. Am nächsten Morgen wurden mit dieser 500 ml BHI-Medium inokuliert (Start-OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,4). Die Kultivierung erfolgte bei 90 rpm. Bei einer OD₆₀₀ von 1 wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert und für 4-6 h weiter kultiviert. Die Ernte erfolgte analog zu *E. coli* (siehe 2.5.2).

2.5.4 Kultivierung von *C. glutamicum* im BioLector

Für die Kultivierung im BioLector® Basic Bioreaktor (m2p-labs, Baesweiler) wurden die jeweiligen *C. glutamicum*-Stämme in Duplikaten in 20 ml BHI-Medium über Nacht bei 140 rpm vorkultiviert. Danach wurden die Zellen in 10 ml 1x PBS-Puffer gewaschen und in 20 ml 1x PBS-Puffer resuspendiert. Die Kultivierung in 750 µl des jeweiligen Mediums wurde bei einer OD₆₀₀ von 1 in FlowerPlates® B (m2p-labs, Baesweiler) bei 1.200 rpm und 30°C gestartet. Die Messdauer betrug 24 h. Dazu wurde die nötige Menge an Inokulum in 1x PBS für 1 min bei 16.000 g sedimentiert und in 1 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Die Zelldichte im BioLector® wurde mittels Rückstreuung des Lichts (*Backscatter*) bei den Verstärkungsgraden (*Gain*) 9, 12, 17, 20, 25 und 30 aufgenommen.

2.6 Molekularbiologische Methoden

Die routinemäßigen Klonierungsarbeiten wie Polymerasekettenreaktion (PCR), Gelelektrophorese, DNA-Restriktion und -Ligation wurden gemäß Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 2001) oder Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000, Thermo Scientific, Schwerte) bestimmt. Es wurden dabei folgende Umrechnungsfaktoren berücksichtigt:

dsDNA: $A_{260\text{nm}} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 ng/μl
ssDNA und RNA: $A_{260\text{nm}} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 ng/μl

Die Reinheit der Probe wurde anhand der Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (Absorption aromatischer Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin) und $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (Absorption von EDTA, Kohlenhydraten, Phenol) ermittelt, die zwischen 1,8 und 2,0 (keine Verunreinigung mit Proteinen) bzw. 2,0 und 2,2 (keine Verunreinigung mit organischen Lösungsmitteln/Salzen) liegen sollte.

2.6.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzen der zu analysierenden Plasmide oder PCR-Produkte wurden durch Sanger-Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bestätigt. Jeder Probe wurden 15 pmol Sequenzierprimer zugegeben. Diese wurden entweder selbst oder direkt vom Sequenzierungsdienstleister zugegeben. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit den *in silico* klonierten Plasmiden/Genomfragmenten im Programm „Clone Manager 9“ (Professional Edition, Scientific & Educational Software) überprüft.

2.6.3 Isolierung genomischer DNA aus *C. glutamicum*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurden 2,5 ml Zellen einer 5 ml LB-ÜNK bei 4.000 g sedimentiert und in gleichem Volumen TE-Puffer (pH 7,6) gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml TE-Puffer (pH 7,6) mit 15 mg/ml Lysozym (frisch zugeetzt) resuspendiert und 3 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA), 220 μl 10% (w/v) SDS und 150 μl Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer) zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml 6 M NaCl (gesättigt) versetzt und gut geschüttelt, bis weißer Niederschlag erkennbar war. Die Lösung wurde 30 min bei 4.000 g bei RT zentrifugiert und der klare Überstand mit 2,5 ml Ethanol abs. vermischt. Die so gefällte DNA wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette gefischt und mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA luftgetrocknet, bevor diese in 200 μl TE-Puffer (pH 7,6) gelöst wurde und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert wurde.

2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde entweder das „QIAprep Spin Miniprep“-Kit (Qiagen, Hilden) oder das „GeneJET Plasmid Miniprep“-Kit (Thermo Scientific, Schwerte) nach den Angaben der Hersteller verwendet. Die Plasmid-DNA wurde standardmäßig in 30 μ l dH₂O eluiert. Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.6.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen oder nach Restriktion wurden mit dem „QIAquick PCR-Purification“-Kit (Qiagen, Hilden) oder „GeneJET PCR Purification“-Kit (Thermo Scientific, Schwerte) gereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 μ l dH₂O.

2.6.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (englisch Polymerase Chain Reaction) (Mullis & Faloona, 1987) wurde sowohl für präparative (*in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) als auch analytische Zwecke (Kontrolle von Transformanten und Deletionsmutanten) eingesetzt. Für die präparativen PCR-Ansätze wurde die „Phusion Hot Start II DNA Polymerase“ (Thermo Scientific, Schwerte) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Reaktionen wurden in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als *Annealing*-Temperatur wurde eine Temperatur gewählt, die 4°C unter dem niedrigsten T_m-Wert der eingesetzten Oligonukleotide lag (laut Herstellerangaben; meist 58°C). Als Elongationszeit wurde routinemäßig 20 sec pro 1000 bp gewählt. Außerdem wurden standardmäßig 35 Zyklen durchgeführt. Für analytische Zwecke wurde die DreamTaq-DNA-Polymerase (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Hierzu wurden Einzelkolonien als Matrize direkt in die Kolonie-PCR-Ansätze eingesetzt und der erste Denaturierungsschritt um 10 min verlängert. Hier wurde eine *Annealing*-Temperatur von 55°C gewählt, die bei zu geringer Spezifität auf 60°C erhöht wurde. Zur Analyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.6.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Für die Gele wurde 1%ige (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die DNA Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte mit einer Spannung von max. 120 V, bis die Bromphenolblau-Bande das Gel-Ende erreicht hatte, und die Anfärbung durch mindestens fünfzehnminütige Inkubation der Gele in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μ g/ml). Durch Belichtung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einer E-Box VX2 (PeQLab Biotechnology GmbH, Erlangen). Zur Größenbestimmung der DNA wurde der DNA-Längenstandard „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ von Thermo Scientific (Schwerte; Banden-

größen: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.000, 750, 500 und 250 bp) verwendet.

2.6.8 Rekombinante DNA-Techniken

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von Thermo Scientific (Schwerte, FastDigest® System) bezogen. Der Verdau von 1 µg DNA erfolgte standardmäßig in 50 µl Ansätzen mit 2 FDU Enzym in 1x FastDigest® Puffer. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Vermeidung einer Rezirkularisierung des Vektors während der Ligationsreaktion wurde der Restriktionsansatz mit der linearisierten Vektor-DNA direkt im Anschluss mit 1 U alkalischer Phosphatase („Shrimp Alkaline Phosphatase“, Thermo Scientific) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Für Ligationsreaktionen wurde das „Rapid DNA Ligation-Kit“ (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ansätze (60 ng Plasmid-DNA) wurden mindestens 15 min bei RT inkubiert.

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

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach Hanahan (1983) hergestellt. Einige Kolonien *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) einer frischen LB-Platte wurden in 5 ml LB-Medium resuspendiert und über Nacht bei 170 rpm geschüttelt. Mit 100 µl der ÜNK wurden 70 ml LB-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,5 bei 130 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml Falcon-Gefäßen 15 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen 10 min bei 4.000 g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 15 ml steriler 70 mM CaCl₂/20 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 5 ml eiskalter, steriler 70 mM CaCl₂/20 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und schließlich 1,25 ml steriles 85%iges (v/v) Glycerol zugefügt. 200 µl-Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85°C gelagert. Zur Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem kompletten (20 µl) Ligationsansatz oder max. 200 ng Plasmid gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 60 s bei 42°C wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für weitere 45 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor 100 µl einer 1:10 Verdünnung der transformierten Zellen auf geeigneten Selektivböden ausplattiert und bei 37°C inkubiert wurden.

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

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von Tauch und Kirchner (Tauch *et al.*, 2002). Hierzu wurde die Hauptkultur in 125 ml BHI-Medium mit 5 ml einer ÜNK angeimpft. Die ÜNK, 5 ml BHI-Medium, wurde mit 1 Kolonie des gewünschten Stammes inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 37°C ge-

schüttelt. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer OD_{600} von ungefähr 1,75. Die Zellen wurden anschließend 20 min bei 4.000 g und 4°C in 50 ml-Falcons geerntet und die Pellets vereinigt. Anschließend wurde das resultierende Pellet dreimal mit 20 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerin) und zweimal mit 20 ml 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 1 ml 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert, die Suspension als 150 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85°C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurden 150 µl kompetente Zellen mit max. 200 ng (Expressionsplasmide) oder max. 2 µg (pK19*mobsacB*) Plasmid in einer eisgekühlten, sterilen Elektroporationsküvette gemischt und mit 600 µl 10%igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation (Gene Pulser Xcell, BioRad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss wurden die Zellen in 4 ml BHI-Medium (auf 46°C vorgewärmt) überführt, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46°C) und mind. 50 min bei 30°C regeneriert. Das Pellet des gesamten Ansatzes (3 min Zentrifugation bei 4.000 g) wurde auf BHI-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und die Zellen im Anschluss bei 30°C oder RT für mindestens einen Tag inkubiert.

2.6.11 Herstellung von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19*mobsacB*-Systems

C. glutamicum-Deletionsmutanten wurden nach Niebisch und Bott (2001) in Anlehnung an die von Schäfer *et al.* (1994) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* konstruiert. Die darauf enthaltenen DNA-Fragmente enthielten rund 500 bp des 5'- und 3'-flankierenden Bereichs des zu deletierenden Gens. Dabei wurden die in Tabelle 2 beschriebenen pK19*mobsacB*-Derivate verwendet, mit denen der *C. glutamicum* Wildtyp oder entsprechende Mutanten elektrotransformiert wurden. Die transformierten Zellen wurden auf BHI-Agarplatten mit 15 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* kann von *C. glutamicum* nicht repliziert werden. Daher können nur Klone den Resistenzmarker des Plasmids aufnehmen, die durch homologe Rekombination am entsprechenden Genlocus das jeweilige pK19*mobsacB*-Derivat in das Chromosom integriert haben. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden Kanamycin-resistente Klone für 4 h in 5 ml BHI-Medium (30°C, 180 rpm) kultiviert und 100 µl einer 1:10-Verdünnung der Kulturen auf BHI-Agarplatten mit 10% (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in ihre Monosaccharide Fructose und Glucose spaltet und Fructose zu oligomerem Laevan umsetzt. Jäger *et al.* (1992) konnten zeigen, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose letal für *C. glutamicum* ist. Daher sollte bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein, wobei entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion/Insertion er-

zeugt wird. Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden, die in Tabelle 3 („check“-Primer) angegeben sind, überprüft. Diese Primer hatten die Eigenschaft in einem Abstand von > 20 bp außerhalb der zur Deletion des Gens verwendeten flankierenden Bereiche im Genom von *C. glutamicum* zu binden. Dadurch sollte vermieden werden, dass Klone mit defekter *sacB*-Expression fälschlich als positiv eingestuft werden. In diesem Fall wäre das PCR-Produkt nämlich deutlich größer, da sich das gesamte Plasmid noch im Chromosom des Klons befand.

2.6.12 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde das „RNeasy Mini-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden ca. 25 ml einer *C. glutamicum*-Kultur (OD₆₀₀ von 4-5, bei OD₆₀₀ von 3 wurden 50 ml geerntet) in -20°C vorgekühlte 50 ml Falcon-Gefäße mit 25 g Eis abzentrifugiert (5 min, 4.000 g, 4°C), mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und höchstens 14 Tage bei -20°C gelagert. Die sedimentierten Zellen wurden in 900 µl RLT-Puffer mit 10 µl einer 1 M DTT-Stocklösung resuspendiert und in Gegenwart von 400 mg Zirkonium/Silica-Perlen (Ø 0,1 mm, Roth, Karlsruhe) 3x 30 sec in einem Amalgamator (Silamat S5, Vivadent) oder 1x 30 sec in einem Precellys 24 Homogenisator (Biotechnologie GmbH, Erlangen; 6.500 rpm) mechanisch aufgeschlossen. Nach Abtrennen der Zelltrümmer und intakter Zellen durch Zentrifugation (15 min, 17.300 g, 4°C) wurde der Überstand mit 250 µl eiskaltem Ethanol vermischt, auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Die Membran wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und anschließend wurde ein Mix aus 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer („RNase-free DNase-Set“, Qiagen, Hilden) auf die Säulenmembran gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die RNA zwei Mal mit 30 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 2.6.1). Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -85°C.

2.7 Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

2.7.1 pK19mobsacB-Derivate zur Deletion von Genen

Die Konstrukte für die Deletion der Gene *pup*, *dop*, *arc* (cg1689-91), *pepC* (cg1693), *pepQ* (cg1826), *ftn* (cg2782) und *dps* (cg3327) wurden alle nach demselben Schema generiert. Deshalb soll die Konstruktion für die Deletion des *pup*-Gens stellvertretend für alle weiteren Gene beschrieben werden. Über die Oligonukleotid-Primerpaare (Tabelle 3) pup5'o/pup5'i sowie pup3'o/pup3'i wurden die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des *pup*-Gens inklusive der Codons für die ersten 4 bzw. letzten 3 Aminosäuren von gDNA des *C. glutamicum* ATCC 13032 WT (~ 1 ng/50 µl PCR-Ansatz) amplifiziert (dies geschah aufgrund der geringen Grö-

ße von Pup, um zu verhindern, dass eventuell Fragmente von Pup doch an Zielproteine verknüpft werden können; für alle weiteren Gene wurden die Codons für die ersten/letzten 10 Aminosäuren mitamplifiziert). Über die Primer „xxx_o“ wurden den flankierenden Bereichen die Schnittstellen (5' PstI, 3' EcoRI; für die restlichen Konstrukte siehe Tabelle 3) für die Klonierung in pK19*mobsacB* angefügt. Die Primer „xxx_i“ verfügen über eine komplementäre 21 bp-Region (5'-TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG), die für die nachfolgende Overlap-Extension-PCR benötigt wurde. Diese PCR wurde wie eine Standard-PCR durchgeführt, allerdings wurde während der ersten 17 Zyklen auf die Zugabe von Oligonukleotid-Primern verzichtet, da hier die in gleicher molarer Menge vorliegenden, flankierenden Fragmente sich über die komplementäre 21 bp-Region gegenseitig als Primer dienen konnten. Danach wurden die Oligonukleotid-Primer pup5'o sowie pup3'o zugesetzt, um die finalen Fragmente für die Deletion zu amplifizieren. Mit den oben erwähnten Restriktionsenzymen wurde das DNA-Fragment schließlich, genauso wie der Vektor pK19*mobsacB*, separat verdaut und anschließend ligiert. Die erfolgreiche Integration des Inserts wurde mittels der Oligonukleotid-Primer M13fw/M13rv nachgewiesen, die in pK19*mobsacB* binden. Abweichend hiervon waren die Konstrukte für die Deletion von *dop* in Δ *pup*, sowie *arc* in Δ *pup* Δ *dop*. Im ersten Falle wurde für das 3'-flankierende Fragment als Template das Plasmid pK19*mobsacB*- Δ *pup* anstatt gDNA verwendet, im zweiten Fall das Plasmid pK19*mobsacB*- Δ *dop* (für Δ *pup*) und anstatt des Primers arc3'o der Oligonukleotid-Primer arc3'o-new. Dies wurde durchgeführt, weil diese Gene allesamt sehr nahe im Genom lokalisiert sind. So sollte verhindert werden, dass bei der Deletion der entsprechenden Gene (*dop* bzw. *arc*) die Deletionen von *pup* bzw. *pup* und *dop* wieder rückgängig gemacht werden.

2.7.2 pK19*mobsacB*-Derivate zur chromosomalen Insertion von Affinitäts-Tags an Gene oder Mutationen in Gene

Die Konstrukte für die chromosomal kodierten Tags von *pup* (pK19*mobsacB*-7xHis-*pup*) und *ftn* (pK19*mobsacB*-*ftn*-Strep) sowie für die chromosomalen Austausch *ftn*-K78R und *ftn*-K78A (pK19*mobsacB*-*ftn*-K78R, pK19*mobsacB*-*ftn*-K78A) wurden in einem ähnlichen Ablauf zu den Deletions-Konstrukten hergestellt (siehe 2.7.1). Für den chromosomalen N-terminalen Heptahistidin-Tag an Pup wurden die Primer pup5'o und pup3'o, die auch schon für die Deletion von *pup* verwendet worden waren, genutzt, allerdings in der Paarung mit pup5'i-HIS bzw. pup3'i-HIS, die in der Region um das Start-Codon (GTG) binden. Dadurch wurden nicht nur die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche von *pup*, sondern auch die volle Gensequenz von *pup* amplifiziert. Die Primer „xxx_i-HIS“ erzeugten einen komplementären Bereich von 66 bp (analog zu der 21 bp komplementären Region bei den Deletionen) für die nachfolgende Overlap-Extension-PCR. Außerdem enthielten die Primer auch die Codons für die sieben Histidine, die Pup N-terminal angehängt werden sollten. Zudem wurde über diese Primer eine interne ApaLI-Schnittstelle eingefügt, mit Hilfe derer sich die erfolg-

reiche Insertion des Tags im Vergleich zum WT-*pup* testen ließ. Das Produkt der Kolonie-PCR, erzeugt durch die Primer Δpup -check-fw/-rv, wurde mit ApaI verdaut. Dies erzeugte in *C. glutamicum* 7xHis-*pup* ein Bandenmuster von 811 bp, 404 bp und 237 bp anstatt 1194 bp und 237 bp beim WT. Bei der Klonierung von 7xHIS-*pup* in pK19*mobsacB* wurde im Vergleich zu pK19*mobsacB*- Δpup anstatt der in *pup*3' o enthaltenen EcoRI-Schnittstelle mit BamHI verdaut, dessen Motiv im 3'-flankierenden Bereich von *pup* natürlich vorkommt. Da das *pup*-Gen im in Δpup deletierten Bereich eine EcoRI-Schnittstelle besitzt, wäre es sonst unmöglich gewesen, das komplette Konstrukt in pK19*mobsacB* zu klonieren.

Für die chromosomalen Veränderungen des *ftn*-Gens wurde eine ähnliche Strategie wie für die 2.7.1 beschriebenen Deletionen verfolgt. Allerdings wurden andere Gen-interne Oligonukleotid-Primer benutzt: dazu wurden die Primer *ftn*5'iK78A/-R sowie *ftn*Strep5'i und *ftn*3'iK78A/-R sowie *ftn*Strep3'i gemeinsam mit *ftn*5'o bzw. *ftn*3'o verwendet. Dadurch wurde zusätzlich zu den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen die gesamte kodierende Sequenz von *ftn* mitamplifiziert. Analog zur Herstellung von pK19*mobsacB*-7xHis-*pup* erzeugten die Oligonukleotid-Primer „xxx_i“ für die *ftn*-Konstrukte den komplementären Bereich für die Overlap-Extension-PCR. Im Falle von *ftn*-K78A/-R beherbergten die Oligonukleotide die Mutationen A232C, A233G, G234T und T237A (*ftn*-K78R) sowie A232G, A233C, G234T und T237A (*ftn*-K78A). Die Mutation T237A ist eine stille Mutation in *ftn* und führte eine interne XbaI-Schnittstelle zur Selektion der mutierten Klone ein. Daher führte der Verdau des Produkts der Kolonie-PCR, erzeugt durch die Primer Δftn -check-fw/-rv, auf *C. glutamicum* *ftn*-K78A oder -R mit XbaI zu einem Bandenmuster von 842 bp, 738 bp und 141 bp anstatt 938 bp und 738 bp im WT. Für das Konstrukt pK19*mobsacB*-*ftn*-Strep wurde keine interne Schnittstelle eingefügt, da hier die Insertion in Stämme mit Δftn -Hintergrund erfolgte und so nach einer Vergrößerung des Kolonie-PCR-Produkts gesucht werden konnte.

2.7.3 Konstruktion der *E. coli*-Expressionsplasmide (pET-Derivate)

Die vollständigen kodierenden Sequenzen von *pafA*, *pup* und *ftn* für pET-22b-*pafA*, pET-TEV1-*pup* sowie -*ftn*, mit den Größen 1461 bp, 210 bp, sowie 504 bp, wurden mithilfe der Oligonukleotid-Primerpaare *paf*EX-fw/*paf*EX-rv, *pup*EX-fw/*pup*-rv und *ftn*EX-fw/*ftn*EX-rv hergestellt. Allen PCR-Produkten wurde dadurch eine NdeI-Schnittstelle am 5'-Ende angefügt, die das Startcodon des Genprodukts enthielt. Dabei wurde das in *pup* und *pafA* enthaltene GTG-Startcodon gegen ATG ausgetauscht. In *pafA* wurde außerdem das native Stopcodon entfernt, um den in pET-22b enthaltenen Hexahistidin-Tag C-terminal mit darauffolgendem Stopcodon an PafA anzuhängen. Die Gene *pup* und *ftn* erhielten durch die Klonierung in pET-TEV1 einen N-terminalen Decahistidin-Tag sowie eine TEV-Protease Schnittstelle, wodurch nach der Reinigung über eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule der Tag bis auf die N-terminalen Aminosäuren Gly-Ser abgespalten werden konnte.

2.7.4 Konstruktion von pVWEx1-Derivaten als Expressionsplasmide für

C. glutamicum

Für sämtliche pVWEx1-basierten Plasmidkonstrukte wurden die entsprechenden Oligonukleotid-Primerpaare so gewählt, dass sie den kodierenden Bereich des jeweiligen Gens amplifizierten, eine Ribosomenbindestelle (RBS, Sequenz: GAAAGGAGGATAGCAGA, die in pVWEx1 nicht vorhanden ist), vor das Startcodon (GTGs wurden zu ATGs ausgetauscht) und, außer für *dop*, einen entsprechenden N- oder C-terminalen Affinitätstag anfügten. Dazu wurden folgende Oligonukleotid-Primer-Kombinationen und mit zwei Ausnahmen genomische DNA (gDNA) als Matrize verwendet: *pup-fwHIS/pup-rv* für pVWEx1-6xHis-*pup*, *pup-fwHIS/pup-rvAla* für pVWEx1-6xHis-*pup*-E64A, *pup-fwSTREP/pup-rv* für pVWEx1-Strep-*pup*, *pupSD-fw/pup-rv* für pVWEx1-*pup* (Matrize pET-TEV1-*pup*; dadurch wurde der N-terminale Decahistidin-TEV-Tag mitamplifiziert), *pupSD-fw/pup-rvAla* für pVWEx1-*pup*-E64A (Matrize pET-TEV1-*pup*; dadurch wurde der N-terminale Decahistidin-TEV-Tag mitamplifiziert), *dop-fw/dop-rv* für pVWEx1-*dop*, *arc-fwHIS7x/arc-rv* für pVWEx1-7xHis-*arc* (N-terminaler Heptahistidin-Tag an ARC), *arc-fw/arc-rvHIS7x* für pVWEx1-*arc*-7xHis (C-terminaler Heptahistidin-Tag an ARC), *arc-fwStrep/arc-rv* für pVWEx1-Strep-*arc* (N-terminaler Strep-Tag an ARC), *arc-fw/arc-rvStrep* für pVWEx1-*arc*-Strep (C-terminaler Strep-Tag an ARC) und *ftn-fw/ftnStrep-rv* für pVWEx1-*ftn*-Strep (C-terminaler Strep-Tag an Ftn). Die Klonierung der DNA-Fragmente in pVWEx1 erfolgte nach vorherigem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über die jeweiligen Schnittstellen in den benutzten Oligonukleotid-Primern (siehe Tabelle 3). Die erfolgreiche Ligation der PCR-Produkte in pVWEx1 wurde mit den Oligonukleotid-Primern pEKEX-fw/-rv durch DNA-Sanger-Sequenzierung überprüft.

Für die Klonierung von 7xHis-*ftn* und -*ftn*-K78A in pVWEx1-Strep-*pup* wurden die Oligonukleotid-Primer Hisftn-fw/ftn-rv und als Template gDNA bzw. pK19*mobsacB-ftn*K78A benutzt. Hisftn-fw fügte außerdem eine zusätzliche RBS vor *ftn*(-K78A) ein. Dadurch entstand ein künstliches Strep-*pup*-7xHis-*ftn* bzw. -*ftn*-K78A-Operon unter Kontrolle des *tac*-Promotors auf pVWEx1 mit separaten RBS vor *pup* und den *ftn*-Derivaten.

Die Konstrukte pVWEx1-*serS*-K58A-/-R67A-7xHis sowie pVWEx1-*pepO*-K398A-/-R402A-7xHis wurden, analog zu den chromosomalen Austausch des pupylierten Rests in *ftn* (Kapitel 2.7.2), über Overlap-Extension-PCR hergestellt. Allerdings wurden die Primer „xxx_o“ (Tabelle 3) so konstruiert, dass sie im Bereich des Start-/Stopcodons banden. Außerdem fügten die Primer sers3'07xHIS sowie pepo3'07xHIS den Konstrukten einen C-terminalen Heptahistidin-Tag an. Zur Generierung der zwei Fragmente für die Overlap-Extension-PCR wurden die Primer-Kombinationen xxx_5'o/xxx_5'i_xxx und xxx_3'o7xHIS/xxx_3'i_xxx benutzt. Die jeweiligen Primer xxx_5'i_xxx/xxx_3'i_xxx bildeten die zueinander komplementären Sequenzen für die Overlap-Extension-PCR und kodierten außerdem die Mutationen für

die Aminosäureaustausche von Lys/Arg → Ala. Die C-terminal Heptahistidin-getaggten Wildtyp-Gene *serS* und *pepO* wurden über die Primerpaare *serS*5'o/*serS*3'o7xHIS bzw. *pepO*5'o/*pepO*3'o7xHIS hergestellt. Die PCR-Fragmente von *serS* und *pepO* sowie den jeweiligen Muteinen wurden nach Verdau mit BamHI bzw. BamHI/KpnI in den ebenso geschnittenen pVWEx1 ligiert. Da bei *serS* nur mit einem Restriktionsenzym kloniert werden konnte, musste nach der routinemäßigen Überprüfung mit den Oligonukleotid-Primerpaaren pEK-Exfw/-rv noch die richtige Orientierung des Inserts im Vergleich zum *tac*-Promotor überprüft werden. Nur wenn über die Primer-Kombination pEKExfw/*serS*5'iR67A eine Bande im Agarosegel zu sehen war, war das Insert richtig orientiert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Zellaufschluss von *C. glutamicum* und *E. coli*

Der Aufschluss von *E. coli*- oder *C. glutamicum*-Zellen für Co-Reinigungsexperimente oder affinitätschromatographische Proteinreinigungen wurde mittels French-Press-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Bakterienzellen 50%ig (50 g_{Zell-Nassgewicht}/100 ml Puffer) im jeweiligen Aufschlusspuffer (NNI10, siehe Kapitel 2.8.2, bzw. TE-Puffer, siehe Kapitel 2.8.3) resuspendiert. Zur Hemmung von Proteasen wurde eine Tablette „cOmplete Mini EDTA-free Protease-Inhibitor-mix“ (Roche Diagnostics, Mannheim) pro 10 ml Aufschlusspuffer hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch mindestens viermalige Passage für *E. coli*, sechsmalige Passage für *C. glutamicum* durch eine French-Press-Zelle (SLM Aminco, Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei einem Druck von 108 MPa (*E. coli*) bzw. von 172 MPa (*C. glutamicum*). Anschließend wurden intakte Bakterienzellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (mind. 20 min bei 5.200 g, 4°C) abgetrennt. Optional erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (60 min bei 230.000 g, 4°C; Rotor Ti70; Beckmann Ultrazentrifuge L7-55), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Für die meisten affinitätschromatographischen Reinigungen von löslichen Proteinen wurde der Überstand der Ultrazentrifugation eingesetzt.

Von *C. glutamicum* Zellen für Proteomanalysen oder Western-Blot-Analysen wurden jeweils 900 µl Lösung mittels 400 mg Zirkonium/Silica-Perlen, wie unter Kapitel 2.6.12 beschrieben, aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen entweder 50%ig (50 g_{Zell-Nassgewicht}/100 ml Puffer) in TE-Puffer (2D-DIGE) bzw. nach ihrer OD₆₀₀ (Umrechnungsfaktor: Zellen aus 100 ml Kultur bei OD₆₀₀ = 2,5 in 1 ml Puffer) in TE- oder NN-Puffer unter Zugabe von Proteaseinhibitor (wie oben) resuspendiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer und Glasperlen mittels Zentrifugation (15 min, 17.200 g, 4°C) entfernt.

2.8.2 Affinitätsreinigung von Proteinen mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Proteinaufreinigung der verschiedenen Proteine mit N- oder C-terminalem Polyhistidin-Tag erfolgte über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) nach Porath *et al.* (1975). Dafür wurden die Proteinlösungen aus *C. glutamicum* oder *E. coli* auf eine Säule mit 1-2 ml resuspendierter Ni²⁺-NTA-Agarose (0,5-1 ml Bettvolumen, Qiagen, Hilden) gegeben, die zuvor mit einer Fritte abgedeckt und mit 10 ml NNI10-Puffer äquilibriert worden war. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch stufenweises Waschen mit je NNI20, NNI60 oder NNI80 und optional NNI100 entfernt, welche unterschiedliche Konzentrationen Imidazol (20-100 mM) enthielten. Die Zugabe erfolgte solange, bis durch Bestimmung der Extinktion (A_{280nm}) am Nanodrop kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit sechs Mal 1 ml NNI100-Puffer (optional) oder sechs Mal 1 ml NNI300-Puffer eluiert. Durch Entfernen der Ni²⁺-Ionen mit 10 ml Stripping-Puffer und erneuter Äquilibrierung mit 5 ml 100 mM NiSO₄ konnte die Säule wieder verwendet werden. Die Lagerung der mit Stripping-Puffer vom Ni²⁺ befreiten Säulen erfolgte in 5 ml 30%igem (v/v) Ethanol bei 4°C. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen überprüft.

2.8.3 Affinitätsreinigung von Proteinen mittels Streptactin-Sepharose

Proteine mit einem StrepTag-II (Sequenz: WSHPQFEK) wurden durch Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose gereinigt (Skerra & Schmidt, 2000). Die cytosolische Proteinfraction wurde zunächst zur Absättigung biotinylierter Proteine mit 10 µl 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), die zuvor mit 15 ml Puffer W äquilibriert worden war, aufgetragen. Nach Waschen mit 5x Puffer W wurde spezifisch gebundenes Protein mit acht Mal 1 ml Puffer E eluiert. Die Säule wurde durch fünfmaliges Waschen mit 10 ml Puffer R und zweimaliges Waschen mit je 8 ml Puffer W regeneriert und bei 4°C gelagert.

2.8.4 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinen wurde mit Hilfe von Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Merck-Millipore, Schwalbach) mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa (Pup-Derivate, Ftn-Derivate mit und ohne Tags) oder 30 kDa (PafA-6xHis, SerS-7xHis-Derivate, PepO-7xHis-Derivate) durch mehrmaliges Waschen mit dem gewünschten Puffer nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.5 Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde mit einer von zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt:

Rohextrakte für Affinitätsreinigungen wurden mittels NanoDrop-Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Schwerte) bei einer Absorption von 280 nm (= Absorption der aromatischen Aminosäuren) untersucht ($A_{280\text{nm}} = 1 \pm 1$ mg/ml Protein), Eluate mit gereinigtem Protein, auch für die gereinigten pupylierten Proteine, wurden ebenfalls am NanoDrop bei 280 nm gemessen, wobei allerdings der jeweilige Extinktionskoeffizient (ϵ) sowie das Molekulargewicht (MW, in Da) eingerechnet wurden (Proteinkonzentration in mg/ml = $A_{280\text{nm}} \cdot \text{MW} \cdot \epsilon^{-1}$). Diese wurden beide über die Aminosäuresequenz des Proteins mit dem Online-Programm ProtParam (web.expasy.org/protparam/) berechnet.

Proteinrohextrakte, die für 2D-DIGE sowie Western-Blots eingesetzt wurden, wurden mit der Bradford-Methode (Bradford, 1976) untersucht. Hierzu wurden 100 μl Probe in entsprechender Verdünnung mit 900 μl Bradford-Reagenz („Coo Protein Assay“, Uptima, Frankreich) versetzt, für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen (Shimadzu UV/Vis-Spektrometer/Photometer UV-1800). Die Proteinkonzentration wurde über eine BSA-Kalibrationsgerade (0,00625-0,1 mg/ml) berechnet.

2.8.6 Proteinverdau mittels TEV-Protease

Heterolog mit dem pET-TEV-Vektor produzierte Proteine besitzen eine TEV-Protease-Erkennungssequenz (ENLYFQG) zwischen den N-terminalen Histidinen und der für das Zielprotein kodierenden Aminosäuresequenz. Die TEV-Protease ist ein 27 kDa großes *Nuclear Infusion a* (Nla)-Protein aus dem Tabakäztvirus (TEV, englisch *Tobacco etch virus*), und schneidet zwischen den Aminosäuren Glutamin (Q) und Glycin (G). Vor dem Verdau wurden die Eluate der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aufkonzentriert (Kapitel 2.8.4) und in NN-Puffer verdaut. Für den Verdau bei 16°C über Nacht wurden 50 μg TEV-Protease (erhalten von Xenia Schuplezow, Forschungszentrum Jülich) eingesetzt. Nach dem TEV-Verdau wurde die Proteinlösung erneut einer Ni^{2+} -NTA-Chromatographie unterzogen. Zur Elution des gewünschten Proteins ohne His-Tag wurde die Säule mit NNI20-Puffer gewaschen. Alle Histidin-Tag-haltigen Fragmente sowie die TEV-Protease, die ebenfalls einen Histidin-Tag aufweist, binden an das Säulenmaterial und wurden anschließend mit Strip-Puffer oder NNI300 entfernt.

2.8.7 *In-vitro*-Pupylierung von Substraten

Die *in-vitro*-Pupylierung von Ftn, SerS (plus Muteine) und PepO (plus Muteine) erfolgte abgewandelt nach einem Protokoll von Striebel *et al.* (2009). Die Gene *pup* und *ftn* wurden mittels des Vektors pET-TEV1 in *E. coli* exprimiert, über einen Decahistidin-Tag gereinigt (Kapitel 2.8.2) und dieser mittels TEV-Protease-Verdau abgespalten (Kapitel 2.8.6). Das Gen *fafA* wurde mit C-terminalem Hexahistidin-Tag in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Gene der Substrate SerS und PepO wurden in *C. glutamicum* $\Delta\text{pup}\Delta\text{dop}\Delta\text{arc}$ exprimiert, und über ihren C-terminalen Heptahistidin-Tag aufgereinigt. Die Pupylierung wurde bei RT über Nacht

(16 h) durchgeführt in Puffer R_a (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM DTT) mit 5 mM ATP. Es wurden 7,5-10 µM Pup, 0,5 µM PafA sowie 2 µM jeweiliges Substrat eingesetzt. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne ATP oder ohne Pup durchgeführt.

2.8.8 Herstellung eines Anti-Pup-Antikörpers

Das aus *E. coli* BL21(DE3) gereinigte 10xHis-TEV-Pup-Protein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens bei der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) verwendet. Das gewonnene Anti-Serum vom 61. Immunisierungstag oder vom 181. Immunisierungstag wurde für Western-Blots eingesetzt.

2.8.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung löslicher Proteine nach ihrer Masse wurden entweder „NuPAGE® Bis-Tris“ (Life Technologies, Darmstadt, 10% oder 12% Gele) oder „Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™“-Fertiggele (BioRad, München) benutzt. Die Proben wurden nach Herstellerangaben mit Puffer versetzt und in Anwesenheit von Antioxidantien (bei BioRad-Gelen DTT, bei NuPAGE-Gelen laut Protokoll) denaturiert. Die Elektrophorese wurde in den vertikalen Gelkammern der jeweiligen Hersteller (XCell SureLock® Mini-Cell bzw. MiniProtean-II-Apparatur) durchgeführt. Für die NuPAGE-Gele wurde für die Auftrennung kleinerer Proteine (< 30 kDa) das MES-Puffer-System laut Herstellerangaben benutzt, ansonsten das MOPS-Puffer-System. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker „SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard“ (Life Technologies, die Bandengrößen variieren je nach verwendetem Puffersystem und sind deshalb in den jeweiligen Abbildungen angegeben) verwendet. Die Auftrennung der NuPAGE-Gele erfolgte bei konstanter Stromstärke (80-90 mA pro Gel) und einer max. Spannung von 500 V, die Any-kD-Gele wurden mit konstanter Spannung (200-400 V) getrennt. Standardmäßig wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurden die Gele dreimal 5 min in 50 ml dH₂O, dann 1 h mit 50 ml „GelCode Blue Stain Reagent“ (Thermo Scientific) geschüttelt und schließlich überschüssige Färbelösung durch Waschen in dH₂O entfernt. Die Gele wurden dann mit dem Typhoon Trio™ Variable Mode Imager (GE Healthcare, München) eingescannt.

2.8.10 Western-Blot

Zum Nachweis von Proteinen mit mono- und polyklonalen Antikörpern wurden die durch SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche Diagnostics, Mannheim) mittels einer Mini Trans-Blot® Cell (BioRad, München) transferiert (*Tankblotting*). Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde mit Methanol abs. für einige Sekunden aktiviert und dann zusammen mit dem SDS-Gel 5 min in Blotting-Puffer (3,03 g/l Tris, 14,4 g/l Glycin, 10% (v/v) Methanol) äquilibriert. Der Western-Blot-Aufbau erfolgte nach dem *Sandwich*-Prinzip in Blotting-Puffer: Dazu wurden luftbasen-

frei ein Schwamm, ein Whatman-Papier, das Gel, die Membran, ein Whatman-Papier und ein weiterer Schwamm in einer Kassette zusammengelegt und die Kassette verschlossen. Die Kassette wurde mit der Membranseite zur Anode in die Blottingapparatur gesteckt. Der Transfer erfolgte für 45 min bei maximal 4,2 mA/cm² (ohne V-Limitierung) pro Gel. Danach wurde die Membran in 1x PBS oder 1x TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver oder 3% (w/v) BSA 1 h oder über Nacht bei 4°C geschüttelt. Danach wurden folgende Antikörper über Nacht bei 4°C oder mind. 1,5 h bei RT direkt zur Blocking-Lösung zugegeben: monoklonaler Anti-Poly-His-Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (Sigma-Aldrich, Seelze; 1:5.000), polyklonales Anti-Pup-Antiserum (siehe Kapitel 2.8.8, 1:2.000) oder Streptavidin gekoppelt an alkalische Phosphatase (IBA Life Sciences, Göttingen; 1:3.500). Danach wurde die Membran zweimal 5 min mit PBST- oder TBST-Puffer und einmal 5 min mit 1x PBS oder 1x TBS gewaschen. Anschließend folgte die Detektion (Anti-His oder Streptavidin) oder eine Inkubation mit aus Ziege gewonnenem Sekundär-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. Dazu wurde der Antikörper in 50 ml 1x PBS oder 1x TBS 1:20.000 verdünnt und die Membran mind. 1 h unter Schütteln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie zuvor gewaschen. Für die Detektion mit alkalischer Phosphatase wurde der Western-Blot in 25 ml AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) äquilibriert. Die Farbdetektion erfolgte für 30 min mit 6,65 mg NBT (Nitroblautetrazolium, gelöst in 70% (v/v) Dimethylformamid) und 6,65 mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (Natriumsalz), gelöst in dH₂O) in 25 ml AP-Puffer. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde die Membran mit 1 ml 30% Trichloressigsäure gespült und mehrmals kurz mit dH₂O gewaschen.

2.9 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

2.9.1 Quantifizierung von Aminosäuren

Die Quantifizierung von Aminosäuren in Kulturüberständen wurde mittels *reverse phase*-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC, High Performance Liquid Chromatography) in einer 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn) Anlage mit automatischer *o*-Phthaldialdehyd (OPA) Vorsäulenderivatisierung (Jones & Gilligan, 1983) durchgeführt. Die Kulturüberstände wurden dafür 1:100 verdünnt gemessen. Die Derivatisierung wurde durchgeführt, indem 1 µl der zu analysierenden Probe mit 20 µl OPA/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Niederlande) gemischt und eine Minute bei RT im Probenraum inkubiert wurde. Die Derivatisierung beruht auf der Reaktion der primären Aminogruppe mit OPA und 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert. Als Säulen wurde eine ODS Hyperclone 125x4 mm Trennsäule (Phenomenex, USA) mit 5 µm Partikelgröße und einer

direkt angekoppelten *Security Guard*-Vorsäule benutzt. Die Substanzen wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität mit einer Flussrate von 0,6 ml/min innerhalb von 37 min bei 40°C mit einem Gradienten aus 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2) als polarer Phase und Methanol als unpolare Phase eluiert. Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Exzitation bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Konzentration der Aminosäuren wurde anhand eines definierten, externen Standards der entsprechenden Aminosäure bestimmt. Dafür wurden die Signalfächen des Standards integriert und so eine Kalibriergerade erstellt. Die Identität wurde anhand der Retentionszeiten von bekannten Standards bestimmt. Für die Daten-Auswertung wurde die Software Chemstation (Agilent) benutzt.

2.9.2 Quantifizierung von organischen Säuren und Glucose

Die quantitative Bestimmung von Glucose und organischen Säuren in Kulturüberständen erfolgte durch Ionen-Ausschlusschromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Organic Acid Resin, 300x8 mm, Polystyrol-Divinylbenzol Säulenmaterial; CS Chromatographie, Langerwehe) durch isokratische Elution innerhalb von 38 min mit 100 mM H₂SO₄ bei einer Flussrate von 0,4 ml/min und einer Säulentemperatur von 40°C mit Hilfe eines Agilent Technologies 1100 LC Systems, wobei die Detektion der organischen Säuren mit einem Agilent 1100 diode array Detektor bei 215 nm, die von Glucose mit einem Agilent 1100 refractive index Detektor erfolgte. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Signalfächen mit zuvor erstellten Kalibriergeraden aus definierten, externen Standards.

Die spezifische Glucoseaufnahme (specific glucose up-take rate, sGUR) wurde aus den Messungen der Glucose und der Biomasse, wie von Koch-Koerfges *et al.* (2012) beschrieben, berechnet.

2.10 Methoden der Transkriptomik und Proteomik

2.10.1 Transkriptomanalysen mittels DNA-Microarrays

Die isolierte Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* (Kapitel 2.6.12) wurde in fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden umgeschrieben (Polen *et al.*, 2007). 23 µg RNA wurden mit 500 ng Zufallshexanukleotid-Primern (Life Technologies, Darmstadt) gemischt und mit RNase-freiem dH₂O auf 15 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 65°C inkubiert und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Die Referenzprobe (meist *C. glutamicum* WT) wurde mit 3 µl grünfluoreszierendem Nukleotidanalogen FluoroLink Cy3-dUTP und die Probe mit 3 µl rotfluoreszierendem FluoroLink Cy5-dUTP (GE Healthcare, München; je 1 mM) gemischt. Pro Triplikat der Experimente wurde ein *Color swap*-Experiment durchgeführt, um Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Effizienz im Einbau der zwei Farbstoffe auszuschließen; das heißt, bei einem Replikat wurde die Probe mit Cy3 und die Referenz mit Cy5 markiert. Daraufhin wurden zu

jeder Probe 11,6 µl eines Reverse-Transkriptase Mastermix, bestehend aus 6 µl 0,1 M DTT, 12 µl 5x 1st Strand Buffer (Life Technologies), 1,2 µl dNTP-MIX (Life Technologies; 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 10 mM dTTP) und 4 µl Superscript-II Reverse Transkriptase (Life Technologies), zugefügt. Die Proben wurden 10 min bei RT und anschließend 110 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,1 M NaOH und Inkubation für 10 min bei 70°C gestoppt, um die RNA zu hydrolysieren. Dann wurde die Lösung mit 10 µl 0,1 M HCl neutralisiert. Anschließend wurden die Proben mit Microcon YM-30 Säulchen (Millipore, Schwalbach) von nicht eingebauten Nukleotidanaloga getrennt. 50 µl Probe wurden mit dH₂O im Säulchen auf 500 µl aufgefüllt und das Volumen durch Zentrifugation (10 min, 16.000 g, RT) auf 20 µl eingengt. Die Lösung im Säulchen wurde wiederum mit dH₂O auf 500 µl aufgefüllt und durch Zentrifugation auf 20 µl eingengt. Die Cy3- und Cy5-markierten Proben, die im Microarray miteinander verglichen werden sollten, wurden vereinigt und nochmals mit 500 µl dH₂O im Microcon Säulchen aufgefüllt. Schließlich wurde das Volumen durch Zentrifugation auf < 44 µl eingengt und für die Hybridisierung verwendet.

Die verwendeten 4x44K 60-mer DNA-Microarrays zur genomweiten Genexpressionsanalyse wurden bei Agilent Technologies (Waldbronn) individuell angefertigt. Das Design dazu wurde mit der Agilent eArray Plattform (<https://earray.chem.agilent.com/earray>) erstellt. Dieses Array Design beinhaltete Oligonukleotide für annotierte Protein-kodierende Gene und nicht-kodierende RNA Gene der Genome von *C. glutamicum* und weiterer drei Bakterienspezies (*E. coli*, *Gluconobacter oxydans* und *Bacillus subtilis*). Für *C. glutamicum* wurde die Genomannotation von Kalinowski *et al.* (2003) bestehend aus 3.057 Protein-kodierenden mRNAs und 80 nicht-kodierenden RNA Genen (tRNAs und rRNAs) verwendet (Accession Number NC_006958). Die Annotationen wurden am Institut anhand von aktuellerer Literatur aktualisiert (Abigail Koch-Körfges, Forschungszentrum Jülich). Jedes dieser Gene wurde auf jedem Microarray durch ein bis drei Oligonukleotide repräsentiert. Außerdem waren Kontroll-Spots von Agilent aufgespottet.

Die vereinigten, Cy-markierten cDNA-Sonden wurden 17 h bei 65°C auf den 4x44K Arrays mittels des Gene Expression Hybridization Kits und der Hybridisierungskammer im Hybridisierungsofen nach den Herstellerangaben (alle Agilent) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays mit dem Wash Buffer Kit (Agilent) nach Herstellerangaben gewaschen. Der Glasträger mit den 4 Arrays wurde daraufhin mit dem GenePix 4000B Laser Scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gescannt. Dabei wurde die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 532 nm (für Cy3-dUTP) und 635 nm (Cy5-dUTP) bei einer Auflösung von 5 µm gemessen. Die Analyse erfolgte mit der Software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). Die Rohdaten der Fluoreszenzintensitäten wurden im TIFF Format (GenePix Pro 6.0) gespeichert.

chert und mit der GenePix Image Analysis Software sowie der Agilent Gene Array List (GAL) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden als GPR-Datei (GenePix Pro 6.0) gespeichert und mit den BioConductor R-Packages *limma* and *marray* (<http://www.bioconductor.org>) prozessiert, um eine Hintergrundkorrektur der Spot Intensitäten, Ratio Berechnung und Normalisierung sowie diagnostische Plots zur Qualitätskontrolle des Arrays durchzuführen. Zur Analyse wurden die prozessierten, LOESS-normalisierten Daten zusammen mit detaillierten Informationen über die Experimente gemäß des MIAME Standards (Brazma, 2009) in der DNA Microarray Datenbank des Instituts (Polen & Wendisch, 2004) gespeichert. Zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene anhand der Cy5/Cy3-Ratios wurden die Daten gefiltert. Dabei mussten die prozessierten Cy5/Cy3-Fluoreszenzverhältnisse, die die relativen mRNA-Spiegel wiedergeben, folgende Kriterien erfüllen: die *Flags* mussten > 0 sein und das Signal/Rauschen-Verhältnis von Cy5 ($F635\text{Median}/B635\text{Median}$) oder Cy3 ($F532\text{Median}/B532\text{Median}$) ≥ 3 . Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde mittels t-Test ein *p*-Wert bestimmt, der $\leq 0,05$ sein sollte. Dabei wurden die relativen RNA-Spiegel eines Gens aller Replikate mit den relativen RNA-Spiegeln aller anderen Gene aller Replikate verglichen. Ausnahmen hiervon sind gesondert gekennzeichnet. Signifikant verändert betrachtet wurden außerdem nur Gene, deren mRNA-Spiegel in der Probe im Vergleich zur Referenz mind. zweifach erhöht/erniedrigt waren.

2.10.2 Proteomanalysen mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Bei der zweidimensionalen Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) werden (cytosolische) Proteine aufgrund zweier voneinander unabhängiger Eigenschaften getrennt. Die erste Dimension trennt die Proteine anhand der unterschiedlichen Netto-Ladung, also ihrer isoelektrischen Punkte (pI), die zweite Dimension nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht (Schaffer *et al.*, 2001). Alle Materialien und Geräte, die in der 2D-Gelelektrophorese verwendet wurden, stammten, wenn nicht anders angegeben, von GE Healthcare (München). Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 200 μg der Proteine (bestimmt nach der Bradford-Methode, siehe Kapitel 2.8.5) mit 9 Volumen Aceton über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurden die gefällten Proteine zentrifugiert (10 min bei 17.600 *g* und 4°C) und getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte durch Zugabe von 40 μl Solubilisierungspuffer A (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 30 mM Tris-HCl, pH 8,5) und kräftiges (1.000 rpm) Schütteln am Thermoblock für mind. 1 h bei RT. Dadurch sollte eine Konzentration von 5 μg Protein/ μl Probe erreicht werden. Die Farbstoffe zur Markierung der Proben stammten von GE Healthcare oder NH DyeAGNOSTICS GmbH (Halle). Die Markierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die Nomenklatur der Farbstoffe wird in weiterer Folge von GE übernommen. Die Hälfte jeder Probe oder Kontrolle ($\cong 100 \mu\text{g}$) wurde mit Farbstoff (analog zu den Microarray-Experimenten: Kontrolle Cy3-Farbstoff, Probe Cy5-

Farbstoff) markiert. Auch hier wurde pro Triplikat ein *Color swap*-Experiment durchgeführt. Die restlichen Hälften aller im Experiment verwendeten Proben und Kontrollen wurden gemischt und jeweils 100 µg davon mit Cy2-Dye markiert (= Standard). Pro Replikat wurde ein solcher Standard markiert. Dieser diente später als Referenz, um unterschiedliches Laufverhalten zwischen den Replikaten während der 2D-Gelelektrophorese auszugleichen. Nach der Markierung wurden alle Proben mit gleichem Volumen 2x Probenpuffer B (8 M Harnstoff, 130 mM DTT, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Pharmalyte 3-10 NL) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben für ein Replikat (Probe, Cy5, Kontrolle, Cy3, und Standard, Cy2) wurden vereinigt und mit Rehydrationspuffer C (8 M Harnstoff, 13 mM DTT, 4% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) Pharmalyte 3-10 NL) auf ein Endvolumen von 450 µl aufgefüllt. Nach Zentrifugation (10 min bei 17.600 g) wurde die Proteinlösung luftblasenfrei zwischen die beiden Elektroden eines Keramikschiffchen pipettiert, die für den entsprechenden pH-Bereich ausgewählten Fertiggelstreifen (24 cm Immobiline DryStrip, pH 4-7 linear) 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: 50 µA/Strip bei 20°C, 10 h Rehydration, 1 h 500 V, ein Gradient bis 1.000 V über 4 h, ein Gradient bis 8.000 V über 3 h, dann 5,36 h 8.000 V. Die erreichten Gesamt-kVh sollten dabei ≥ 40 sein. Danach wurden die IEF-Gelstreifen entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die zweite Dimension nach Herstellerangaben mittels des 2D Gel DALTsix NF 12.5% Kit (Gel Company Inc, San Francisco, USA) in Petri-Schalen äquilibriert, auf Fertiggele aufgebracht und die Proteine elektrophoretisch mit einer EttanTM DALTsix Electrophorese Einheit (GE) getrennt. Auf gleiche Höhe wie der Gelstreifen wurde ein feuchtes Filterpapier gelegt, das in 10 µl Protein-Größenstandard (Precision Plus ProteinTM Standard, Biorad, München) getränkt war. Die Bedingungen für den Vorlauf waren 10 mA pro Gel bei 50 V für 1 h (0,5 W pro Gel), für den Hauptlauf 30 mA pro Gel bei 250 V für 14 h (2,5 W pro Gel). Nach dem Hauptlauf wurden die Gele mit einem Typhoon TrioTM Variable Mode Imager (GE) mittels grünem, rotem oder blauem Laser (532 nm, 633 nm bzw. 488 nm) mit entsprechenden Emissionsfiltern (580 nm, 670 nm bzw. 520 nm) bei einer Auflösung von 200 Microns für den Cy3-, Cy5- bzw. Cy2-Farbstoff gescannt. Die Intensitäten der Gelbilder wurden mit der Delta2D 4.0 Software (Decodon, Greifswald) ausgewertet. Als signifikant verändert betrachtet wurden Proteine, deren durchschnittliches Verhältnis Probe zu Kontrolle $\leq 0,5$ oder $\geq 2,0$ und der *p*-Wert $\leq 0,05$ war. Danach wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250 gefärbt. Für die Coomassie-Färbung wurden die Gele zwei Mal 10 min in dH₂O gewaschen und 2 h in Färbelösung (5% (w/v) Ammoniumsulfat-Oktadecahydrat, 10% (v/v) Ethanol, 0,02% (w/v) Coomassie Brillantblau G250, 2% (v/v) o-Phosphorsäure) geschüttelt, und über Nacht in dH₂O entfärbt. Am nächsten Tag wurden die Gele drei Mal 20 min mit dH₂O gewaschen. Dann konnten signifikant veränderte Proteinspots mittels eines EXQuest Spot

Cutter (Bio-Rad) ausgestanzt und in 96-Well-Platten übertragen werden. Die Identität der Proteinspots konnte dann über eine Peptidmassen-Fingerprint-Analyse mittels Trypsinisierung und MALDI-TOF-Massenspektrometrie aufgeklärt werden.

2.10.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-Fingerprint-Analysen mit Hilfe des Massenspektrometers Ultraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III (Bruker Daltonics) wurden Proteinbanden/-spots als Gelstückchen aus Coomassie-gefärbten Acrylamidgelen ausgeschnitten und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut. Hierzu wurden die Gelstückchen so oft 10 min lang mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30% (v/v) Acetonitril gewaschen, bis keine Blaufärbung mehr sichtbar war. Anschließend wurden die Gelstückchen 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 2-6 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/µl Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 2-6 µl 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei RT oder 2 h bei 37°C verdaut. Die tryptischen Peptide wurden durch Zugabe von 5-10 µl dH₂O (15 min Inkubation bei RT) und Zugabe von 5-10 µl 0,2% (v/v) Trifluoressigsäure in 30% (v/v) Acetonitril (10 min Inkubation bei RT) eluiert. Gegebenenfalls wurden die tryptischen Peptide mittels „ZipTip® C18 standard bed“ (Millipore) nach Angaben des Herstellers konzentriert. Die Proben wurden auf PACII-(Prespotted-Anchor-Chip)-Target-Messplatten (Bruker Daltonics, Bremen) mit 96 oder 384 Spots aufgetragen. Auf diesen Messplatten war bereits sowohl die α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure-(HCCA-)Matrix als auch ein Standard mit einem Massenspektrum von 757 bis 3.574 Da vorgelegt. Die Proben wurden im positiven Reflektormodus und mit einem Beschleunigungspotential von 26,3 kV analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die Bruker-Softwares „flexControl 3.0“ bzw. „flexAnalysis 3.0“ verwendet. Anschließend konnten die erhaltenen Peptidmassen zwischen 900 und 4.500 Da mit Hilfe des Programms „BioTools 3.1“, des MASCOT-Servers (Matrix Science, London, UK) und des MASCOT-Algorithmus (Matrix Science, v.2.2.0) mit der hauseigenen *C. glutamicum*-Proteindatenbank verglichen werden. Beim Peptidmassenvergleich mittels MASCOT-Software sowie mittels des MS-Fit-Programms wurden eine (zwei bei pupylierten Peptiden) *missed cleavage* beim Trypsinverdau, eine Carbamidomethylsubstitution am Cystein als feste Modifikation, als variable Modifikation eine Oxidation von Methionin (bei pupylierten Peptiden eine Pupylierung an Lysin, +243,09 Da) und eine Abweichung bis max. 100 ppm zugelassen. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn ein MOWSE-Score (Molecular Weight Search, Molmassensuche) ≥ 46 erhalten wurde, der die statistische Absicherung des Ergebnisses widerspiegelt (Pappin *et al.*, 1993). Zur Identifizierung pupylierter Peptide wurde mittels LIFT-Methode am Ultraflex MALDI-TOF/TOF das mutmaßliche, tryptische Peptid selektiert und weiter fragmentiert (= MS/MS), um die Aminosäuresequenz des ausgewählten Peptids (parent ion) abzuleiten. Die Ionisierungsspannung betrug in diesen Fällen 8,0 kV, die LIFT-Spannung 19 kV

und die Reflektorspannung 29,5 kV. Bei der Zuordnung und Bewertung der erhaltenen Spektren wurde eine MS/MS-Toleranz von 0,5 Da vorausgesetzt. Ein Peptid galt dann als identifiziert, wenn die MASCOT-Datenbanksuche einen Kandidaten als signifikant ($p < 0,05$) betrachtete.

2.10.4 MudPIT-Massenspektrometrie

Für die Identifizierung von pupylierten Peptiden wurde in der AG Dirk Wolters (Ruhr-Universität Bochum) eine Multidimensionale Proteinidentifikation (MudPIT, englisch Multi-dimensional Protein Identification Technology) mit einem Thermo LTQ Orbitrap Velos Ionenfallen-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurden die vereinigten Proteine (10-30 µg der Pup-E64A-, 110-130 µg der Pup-Proben; jeweils Triplikate) aus der Anreicherung der pupylierten Proteine (siehe Kapitel 2.8.2) in 50 mM Ammoniumbikarbonat-Puffer (Sigma Aldrich, Seelze) und 20% (v/v) Methanol (Baker) resuspendiert und auf Eis verschickt. Danach wurden 1 µg "Sequencing Grade-Trypsin" (Promega) pro 50 µg Gesamtprotein für einen Übernacht-Proteinverdau bei 37°C zugesetzt. Anschließend wurden die Proben getrocknet und die Peptide in 10 µL 0,1% Trifluoressigsäure und 2% Acetonitril gelöst. Danach wurden sie auf eine Fused Silica Kapillare (100 µm ID, Polymicro) geladen, die mit *reversed phase*- (RP, C18 Luna, 3 µm, 100 Å, Phenomenex) und Starker-Kationenaustauscher-Säulenmaterial (SCX, PolySULPHOETHYL A, 5 µm, 200 Å, PolyLC) gepackt war (10-12 cm RP/4 cm SCX/3 cm RP).

MudPIT Analysen wurden mit einer quaternären U-HPLC Pumpe (Accela, Thermo Scientific) durchgeführt, die direkt über ein PEEK Microcross an die Thermo LTQ Orbitrap gekoppelt war. Eine optimale Peptidauftrennung wurde mit einer effektiven Flussrate von 200 (± 50) nL/min, einer Spray-Spannung von 1,8 kV und einer Transferkapillartemperatur von 180°C erreicht. Bei einem 8-Schritt-MudPIT-Experiment entsprach jeder Schritt einer *instrument method*-Datei mit identischen Einstellungen für das HPLC-Gradientenprogramm. Das Massenspektrometer wurde so eingestellt, dass ein volles MS-Spektrum zwischen 400-2000 *m/z* für das Vorläuferion (precursor ion, R = 60.000) und anschließende MS/MS Scans der besten 20 Vorläuferionen des vorherigen MS-Scans aufgenommen wurden, um Fragmentationen mit der Ionenfalle zu detektieren.

Die Auswertung der MS/MS-Daten erfolgte mit der Proteome Discoverer Software (Version 1.2). Die Daten wurden mit der *C. glutamicum* Annotation (3.057 Proteine) von Kalinowski *et al.* (2003) verglichen. Als Maßgabe dienten eine Massegenauigkeit von 10 ppm, eine Fragmentationstoleranz von 1 Da und Pupylierung an Arginin oder Lysin als variable Modifikation (+ 243,08552 Da) bei 2 missed cleavages im Trypsinverdau. Um als signifikanter Treffer zu zählen, musste ein Protein durch 2 unterschiedliche Peptide und einen XCorr von 1,8 für einfach, 2,5 für zweifach oder 3,5 für dreifach geladene Peptide erfüllen (Fränzel *et al.*, 2010,

Washburn *et al.*, 2001, Wolters *et al.*, 2001). Außerdem wurden die Spektren der pupylierten Peptide manuell im Bezug auf ihre Ionenserien und Ionenintensitäten untersucht, um die Modifizierungsstellen zu bestätigen. Nur manuell bestätigte pupylierte Proteine wurden auch in die Liste der "bestätigten Zielproteine" aufgenommen. Wenn nötig, wurden zusätzliche MS/MS-Spektren von weiteren biologischen Replikaten ausgewertet, die mit weniger Waschschritten gereinigt worden waren, um Zielproteine zu bestätigen. Tryptische Peptide, die an einem C-terminalen Lys oder Arg modifiziert schienen und nicht dem C-Terminus des Proteins entsprachen, wurden als falsch positive Treffer verworfen, da die Pupylierung die Trypsinisierung des Aminosäurerests verhindert (Poulsen *et al.*, 2010).

3 Ergebnisse

3.1 Der *pup*-Gencluster in *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum ATCC 13032 besitzt Gene für alle Proteine, die für die Pupylierung in *Mycobacterium* sp. notwendig sind, und zwar für Pup (kodiert durch *pup*, cg1689), die Pup-Ligase PafA (*pafA*, cg1688), die Depuplyase Dop (*dop*, cg1690) und die AAA+-ATPase ARC (*arc*, cg1691). Aus Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierdaten sind bisher insgesamt vier Promotoren zur Expression von Genen des *pup*-Genclusters bekannt (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Die Daten sind in Abbildung 7 gezeigt.

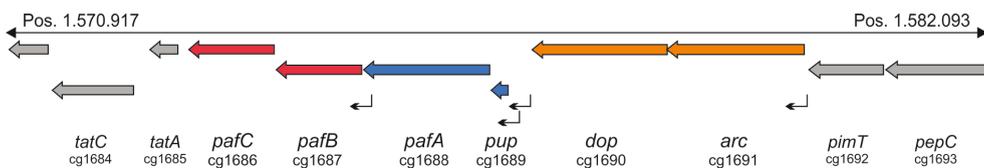


Abbildung 7. Der *pup*-Gencluster in *C. glutamicum* ATCC 13032. Die Gene der bekannten, in die Pupylierung involvierten, Proteine sind in Farbe dargestellt. Operons haben gleiche Farben, deren putative Promotoren sind durch schwarze Pfeile angedeutet. Die Größe der Gene basiert auf der Leserahmen-Vorhersage der Genom-Sequenzierung von Kalinowski *et al.* (2003). Die Vorhersage der Promotoren basiert auf der Publikation von Pfeifer-Sancar *et al.* (2013).

In *C. glutamicum* bilden *pup* und *pafA* wahrscheinlich ein Operon, was einen Unterschied im Vergleich zu Actinobakterien mit Proteasom darstellt, die ein *pafABC*- sowie ein *pup-prcBA*-Operon (*prcAB* kodieren für die Untereinheiten des Proteasoms) besitzen (Barandun *et al.*, 2012). Außerdem liegen *arc* und *dop* in *C. glutamicum* in einem Operon, während sie in Mycobakterien durch mehrere Gene getrennt sind (Abbildung 3). Die putativen Promotoren dieser zwei Operons wurden durch die Sequenzierung von angereicherten 5'-Enden von mRNAs bestimmt (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Analyse deuten darauf hin, dass es vor *arc* einen Promotor und vor *pup* zwei Promotoren gibt (schwarze Pfeile in Abbildung 7). Vor *arc* wurde ein Promotor identifiziert, der wahrscheinlich ein *leaderless*-Transkript reguliert, das also unmittelbar mit dem Startcodon beginnt. In *M. tuberculosis* bildet *pafA* ein Operon mit zwei weiteren Genen, welche *pafB* und *pafC* benannt wurden. Bakterien-Zwei-Hybrid-Systeme konnten zeigen, dass PafB und PafC miteinander interagieren (Festa *et al.*, 2007). Es konnte aber noch kein Zusammenhang von PafBC mit der Pupylierung gezeigt werden. In *C. glutamicum* sind PafB und PafC als Transkriptionsfaktoren annotiert (Kalinowski *et al.*, 2003).

Für alle weiterführenden Arbeiten war es notwendig, die bisher in *C. glutamicum* bekannten Gene, die mutmaßlich an der Pupylierung beteiligt sind, zu charakterisieren. Untersuchungen zu den putativen Transkriptionsregulatoren PafB und PafC, sowie dem *pup*-Promotor wurden

in einer Masterarbeit (Reuters, 2014) durchgeführt. Die Ergebnisse daraus werden in der Diskussion (Kapitel 4.1.4) behandelt. Zur phänotypischen Charakterisierung wurden *in-frame*-Deletionsmutanten von *C. glutamicum* hergestellt, in denen keine Pupylierung (Δpup) oder Depupylierung (Δdop) mehr stattfinden konnte, oder pupylierte Proteine nicht mehr durch die ATPase ARC (Δarc) erkannt werden konnten (Abbildung 8). Da die Deletion von *pafA* mutmaßlich den gleichen Effekt wie eine Δpup -Mutante gehabt hätte, wurde in dieser Arbeit nur die Δpup -Mutante als Stamm mit fehlender Pupylierung untersucht.

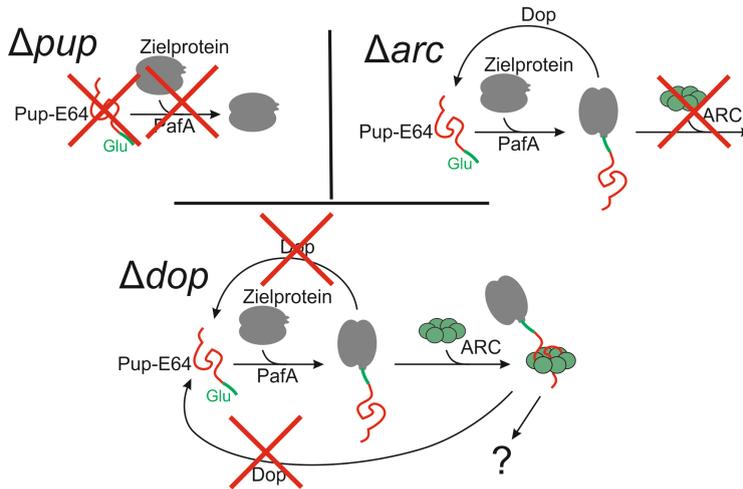


Abbildung 8. Schema der theoretischen Auswirkungen in pupylierungsdefizienten *C. glutamicum*-Stämmen mit Deletionen der Gene *pup*, *dop* oder *arc*. Δpup : Deletionsmutante des Gens cg1989, kodierend für das prokaryotische, Ubiquitin-ähnliche Protein Pup, Δarc : Deletionsmutante des Gens cg1691, kodierend für die AAA+-ATPase ARC, Δdop : Deletionsmutante des Gens cg1690, kodierend für die Depupylase Dop. PafA, Pup-Ligase.

Alle genannten Einzeldelentionsmutanten konnten erfolgreich hergestellt werden und das Verhältnis zwischen wildtypischen Klonen und Deletionsmutanten nach dem zweiten Rekombinationsereignis (Kapitel 2.6.11) zur Deletion war in allen Fällen ausgeglichen (WT im Vergleich zu Δpup -Mutante 7:6, WT: Δdop 5:7, WT: Δarc 7:5). Das spricht dafür, dass diese Gene in *C. glutamicum* bei Wachstum in Vollmedium nicht essentiell sind. Diese Deletionen konnten auch in Kombinationen, nämlich als $\Delta pup\Delta dop$ -, $\Delta pup\Delta arc$ - sowie $\Delta pup\Delta dop\Delta arc$ -Deletionsmutanten, erfolgreich durchgeführt werden.

Das Fehlen der Pupylierung hatte im Schüttelkolben keinen Einfluss auf das Wachstum einer Δpup -Mutante im Vergleich zum WT in Brain-Heart-Infusion-(BHI)-Vollmedium. Die erreichten Wachstumsraten und Biomassen von WT und der Δpup -Mutante waren vergleichbar. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich das Fehlen der Pupylierung, Depupylierung oder der ATPase ARC auf das Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4% Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle (CGXII-Glucose-Minimalmedium) auswirkt. Unter diesen Bedingungen erreichten sowohl der WT wie auch die Δpup -, die Δdop - und die Δarc -Mutante eine fina-

le OD₆₀₀ von 55-57 und Wachstumsraten zwischen 0,42 und 0,45 h⁻¹. Das Wachstum zwischen dem WT und Deletionsmutanten der Pupylierungsmaschinerie war also in Standard-Nährmedien vergleichbar.

Anschließend wurde eine weitere Charakterisierung der *Δpup*-Mutante durchgeführt. Um festzustellen, ob die Pupylierung einen Einfluss auf gebildete Nebenprodukte hat, wurden die *Δpup*-Mutante und der WT in CGXII-Glucose-Minimalmedium kultiviert und der pH-Wert sowie mittels HPLC die Konzentrationen organischer Säuren von Überstandsproben aus der Kultivierung innerhalb der ersten 12 h und nach 24 h bestimmt. Der Verlauf der pH-Wertänderungen sowie die Produktion organischer Säuren waren in beiden Stämmen vergleichbar. Unter Standard-Kultivierungsbedingungen hatte die Pupylierung also keinen Einfluss auf das Wachstum oder die Ausscheidung von organischen Säuren in *C. glutamicum*.

Um nachzuverfolgen, ob das Fehlen der Pupylierung eventuell Auswirkungen auf transkriptioneller Ebene hat, wurde das Transkriptom der *Δpup*-Mutante gegen das des WTs mit DNA-Microarrays verglichen (Tabelle 4). Dafür wurden jeweils drei unabhängige biologische Replikate des WTs und der *Δpup*-Mutante in CGXII-Glucose-Minimalmedium und BHI-Medium kultiviert und bei OD₆₀₀ 4-5 für eine RNA-Isolierung geerntet. In CGXII-Glucose-Minimalmedium waren die mRNA-Spiegel von vier Genen in der *Δpup*-Mutante im Vergleich zum WT mehr als zweifach erhöht. Die Menge an mRNA von *pup* war, wie zu erwarten, in der *Δpup*-Mutante deutlich (Faktor 25) reduziert, was die Deletion bestätigte. In BHI-Medium waren lediglich die mRNA-Spiegel der Gene *oppC* (Faktor 5,8 erhöht) und *pup* (Faktor 20 reduziert) in der *Δpup*-Mutante gegenüber dem WT signifikant verändert.

Tabelle 4. Ergebnisse der globalen Transkriptomanalysen von *C. glutamicum Δpup* im Vergleich zum *C. glutamicum* ATCC 13032 WT nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose oder in BHI-Vollmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 4-5. Gezeigt sind der jeweilige Genlocus, Genname und die Annotation. Dargestellt sind Gene, deren mRNA-Spiegel in der *Δpup*-Mutante in drei biologischen Replikaten im Vergleich zum WT mindestens zweifach verändert vorlagen. Statistisch signifikant wurden Veränderungen angesehen, die einen *p*-Wert ≤ 0,05 hatten.

Gen-locus	Gen-name	Annotation	mRNA-Verhältnis <i>Δpup</i> /WT	<i>p</i> -Wert
CGXII-Medium				
cg2184	<i>oppD</i>	ATPase Komponente eines Oligopeptid-Transportsystems (ABC-Typ)	24,93	< 0,01
cg2183	<i>oppC</i>	Permease-Komponente eines Oligopeptid-Transportsystems (ABC-Typ)	15,76	< 0,01
cg3219	<i>ldhA</i>	NAD-abhängige L-Lactat Dehydrogenase	2,50	0,01
cg0018	-	Putatives, konserviertes Membranprotein	2,38	< 0,01
cg1689	<i>pup</i>	Prokaryotisches, ubiquitin-ähnliches Protein	0,04	< 0,01
BHI-Medium				
cg2183	<i>oppC</i>	Permease-Komponente eines Oligopeptid-Transportsystems (ABC-Typ)	5,76	< 0,01
cg1689	<i>pup</i>	Prokaryotisches, ubiquitin-ähnliches Protein	0,05	0,07

Die deutlichsten Unterschiede im Transkriptom von Δpup im Vergleich zum WT wurden unter beiden Bedingungen bei den Genen *oppC* und *oppD* beobachtet (*oppD* war in BHI-Medium nur 1,71-fach erhöht). Beide Gene sind Teil eines Operons (*oppABCD*), das für einen putativen Oligopeptid-Transporter OppABCD kodiert, homolog zum Operon Rv3666c-Rv3663c in *M. tuberculosis* H37Rv (Flores-Valdez *et al.*, 2009). Die mRNA-Spiegel von *oppAB* waren in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT unverändert. Die Tatsache, dass die Expression eines Oligopeptidtransporters beim Fehlen der Pupylierung bzw. eines eventuellen Protein-degradationsapparates verändert scheint, ist eine interessante Beobachtung. Allerdings wurden bereits in der Vergangenheit Experimente durchgeführt, welche zeigten, dass die Transkripte von *oppC* und *oppD* starken Schwankungen unterworfen sind (Bosco, 2011). Um auszuschließen, dass die veränderten Transkriptmengen durch Mutationen in der DNA-Sequenz stromaufwärts von *oppC* in der Δpup -Mutante aufgetreten waren, die die Transkription beeinflussen könnten, wurde ein Bereich von 700 bp stromaufwärts und 300 bp stromabwärts vom Translationsstart von *oppC* mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Diese Untersuchung ergab keine Mutationen in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT (Daten nicht gezeigt).

Da die Pupylierung in Mycobakterien Proteine unter anderem für den Abbau markiert, erscheint es wahrscheinlicher, dass nicht das Transkriptom, sondern das Proteom in einer Δpup -Mutante im Vergleich zum WT verändert ist. Deshalb wurden die zytosolischen Proteinfractionen von *C. glutamicum* WT und Δpup unter denselben Bedingungen, wie sie auch für die Transkriptomvergleiche gewählt worden waren, mittels zweidimensionaler Differenzgelelektrophorese (2D-DIGE) verglichen. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede (p -Wert $\leq 0,05$) der Protein-Spiegel festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, dass unter den gewählten Bedingungen kein Pup-vermittelter Abbau von zytosolischen Proteinen stattfindet.

3.2 Reinigung und Identifizierung des Pupyloms aus *C. glutamicum*

Die bisher gezeigten Ergebnisse ließen noch keine Rückschlüsse zu, ob die Pupylierung in *C. glutamicum* überhaupt abläuft. Deshalb war das nächste Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Proteine in diesem Organismus pupyliert werden. Deshalb sollte das pupylierte Proteom, auch Pupyloim genannt, identifiziert werden. Darum wurde ein Stamm konstruiert, in dem das Pup-Protein mit einem Affinitätstag versehen war, um Pup mitsamt daran kovalent gebundener Proteine anzureichern, wie es schon in vorherigen Studien mit *Mycobacterium* sp. sowie *R. erythropolis* durchgeführt worden war (Festa *et al.*, 2010, Poulsen *et al.*, 2010, Watrous *et al.*, 2010, Yun *et al.*, 2012). Alle genannten Organismen besitzen ein Pro-

teasom. Das Pupylom aus *C. glutamicum* wäre somit das erste aus einem Proteasom-freien Actinobakterium.

3.2.1 Konstruktion eines *C. glutamicum pup*-Expressionsstammes und Reinigung des Pupyloms

Um zu vermeiden, dass natives Pup-Protein eventuell bevorzugt gegenüber dem getaggen Pup (Pup-Proben) von PafA für die Pupylierung als Substrat genutzt wird, wurde die zuvor hergestellte *C. glutamicum* Δpup -Mutante als Expressionsstamm benutzt. Diese wurde mit pVWEx1-Derivaten transformiert, welche die Gene für Pup und Pup-E64A unter Kontrolle des *tac*-Promotors enthielten (vgl. pVWEx1-*pup* bzw. pVWEx1-*pup*-E64A in Tabelle 2). Das Gen *pup*-E64A kodiert für eine Pup-Variante mit einem Austausch des C-terminalen Glutamat-Restes, über den Pup mit Zielproteinen kovalent verknüpft wird, zu Alanin. Durch den Austausch kann theoretisch keine Pupylierung mehr stattfinden, weshalb dieses Konstrukt als Negativkontrolle (Pup-E64A-Proben) diente. Beide Konstrukte verfügten, zur Reinigung über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie, über einen N-terminalen Decahistidin-Tag, der über eine TEV-Protease-Schnittstelle (aus dem Vektor pET-TEV1) mit Pup fusioniert war. Der Tag konnte nur N-terminal angefügt werden, da der C-Terminus für die Funktion von Pup essentiell ist (Abbildung 4). Die Expression fand im Vollmedium BHI statt, wobei die *pup*- und *pup*-E64A-Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Bereits nach 1 h war eine Expression beider Konstrukte im Rohextrakt, der über eine SDS-PAGE getrennt worden war, erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Nach vierstündiger Induktion wurden die Zellen geerntet und anschließend mittels French-Press-Zelle aufgeschlossen. Die Rohextrakte beider Konstrukte wurden auf eine Ni^{2+} -NTA-Säule mit 1 ml Bettvolumen aufgetragen und die beiden Pup-Konstrukte inklusive ihrer gebundenen Proteine nativ vom restlichen Proteom getrennt. Die Eluate von Pup und Pup-E64A wurden über eine SDS-PAGE getrennt und sämtliche Coomassie-gefärbten Banden mittels Peptidmassen-Fingerprint-Analyse durch MALDI-TOF-MS analysiert. Ein exemplarisches Gel solcher Eluate sowie die mit MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine sind in Abbildung 9 dargestellt. Das Gelbild zeigt deutlich, dass bei der Reinigung von funktionellem Pup im Gegensatz zur Negativkontrolle eine größere Zahl von Proteinen gereinigt wurde. Das spricht für eine erfolgreiche Anreicherung von mutmaßlich pupylierten Zielproteinen.

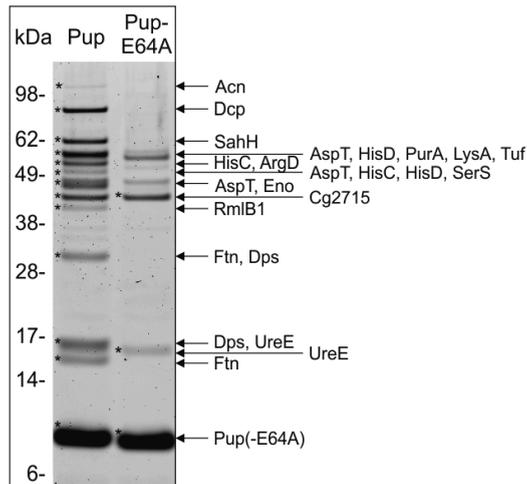


Abbildung 9. Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der angereicherten Proteine 10x-His-TEV-Pup bzw. 10xHis-TEV-Pup-E64A mit Angabe aller mittels MALDI-TOF-MS/MS identifizierten Proteine aus *C. glutamicum* Δpup pVWEx1-pup (Pup) bzw. pVWEx1-pup-E64A (Pup-E64A). Diese Abbildung ist exemplarisch für drei biologische Replikate. Links sind die Größen des Protein-Standards in kDa angegeben. Die Reinigung erfolgte über eine native Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aus der löslichen Proteinfraction der beiden Stämme. Es wurden 10 μ l der dritten Elutionsfraktion (mit 300 mM Imidazol) auf das Gel aufgetragen. Die sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und nach Trypsin-Verdau mittels MALDI-TOF-MS analysiert (Tabelle A1 im Anhang). Identifizierte Banden sind mit Sternchen markiert, nicht markierte Banden konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Rechts ist die dabei bestimmte Identität der Proteine aufgelistet, die über Pfeile im Gelbild markiert sind. Acn, Aconitase (Cg1737; 101,7 kDa), ArgD, Acetylmethionin-Aminotransferase (Cg1583; 41,2 kDa), AspT, Aspartat-Aminotransferase (Cg0294; 46,5 kDa), hypothetisches Protein (Cg2715; 42,4 kDa), Dcp, putatives Peptidyl-Dipeptidase-A-Protein (Cg2527; 73,9 kDa), Dps, mangelinduziertes DNA-Schutzprotein (Cg3327; 18,4 kDa), Eno, Enolase (Cg1111; 44,9 kDa), Ftn, Ferritin (Cg2782; 18,1 kDa), HisC, Histidinolphosphat-Aminotransferase (Cg2304; 39,9 kDa), HisD, Histidinolphosphat-Dehydrogenase (Cg2305; 46,8 kDa), LysA, Diaminopimelat-Decarboxylase (Cg1334; 47,4 kDa), Pup(-E64A), prokaryotisches ubiquitin-ähnliches Protein mit N-terminalem Decahistidin-Tag und TEV-Protease-Schnittstelle (Cg1689; 10,3 kDa), PurA, Adenylosuccinat-Synthetase (Cg3063; 46,8 kDa), RmlB1, dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (Cg0403; 38,1 kDa), SahH, S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (Cg0860; 52,0 kDa), SerS, Seryl-tRNA-Synthetase (Cg3201; 46,5 kDa), Tuf, Elongationsfaktor Tu (Cg0587; 43,9 kDa), UreE, akzessorisches Protein der Urease (Cg0116; 14,7 kDa).

Außerdem ist erkennbar, dass einige Proteine in zwei unterschiedlich großen Banden detektiert werden konnten, deren unterschiedliches Laufverhalten im Gel in etwa dem Unterschied von 10,3 kDa entspricht, die die Pupylierung durch (10xHis-TEV-)Pup verursacht (z.B.: Ftn, Dps). Für die Eisen-Speicherproteine Ferritin (Cg2782) und das mangelinduzierte DNA-Schutzprotein Dps (*DNA-binding protein from starved cells*, Cg3327) ist bekannt, dass es sich um multimerische Proteine handelt (Andrews *et al.*, 2003). Da die Aufreinigung nativ stattgefunden hatte, könnten hierbei unpupylierte Ftn- oder Dps-Monomere mit pupylierten cogenereinigt worden sein. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Reinigung des Pupylooms auch nicht-pupylierte Proteine angereichert wurden, die nicht-kovalent mit Pup oder pupylierten Proteinen interagierten. Die Pupylierung an Lysin-Resten kann durch die Suche nach einer Massenzunahme von 243,08552 Da an Lysin-Resten detektiert werden (Burns *et al.*, 2008, Pearce *et al.*, 2008). Diese Zunahme entsteht durch die Isopeptidbindung

von Pup an Lysin-Reste: Nach dem tryptischen Verdau verbleiben die C-terminalen Aminosäuren GGE von Pup am Peptid. Außer für das Peptid ANYTVPGINENDAKQLIDGLQE (entspricht Position K14) von Dps konnte jedoch mittels MALDI-TOF/TOF kein Nachweis für einen pupylierten Lysin-Rest in den in Abbildung 9 gezeigten Proteinen erbracht werden (MS/MS-Daten, Abbildung A1a im Anhang).

3.2.2 Identifizierung pupylierter Proteine in *C. glutamicum* mittels multidimensionaler Proteinidentifizierungstechnik

Für ein breiteres Screening nach pupylierten Proteinen wurde deshalb die multidimensionale Proteinidentifizierungstechnik (MudPIT) in Kooperation mit der AG Wolters (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die Messungen führte Dr. Benjamin Fränzel mit Eluaten der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Kapitel 3.2.1) durch. Bei dieser Methode werden die Proteine durch eine zweimalige Passage über HPLC (2D-LC) zuerst fraktioniert und dann mittels MS/MS analysiert (Wolters *et al.*, 2001). Diese Methode ist vor allem für die Suche nach posttranslationalen Modifikationen geeignet. Dabei werden die jeweils 20 intensivsten Vorläuferionen (= Peptide) eines Laufs automatisch weiter fragmentiert und MS/MS-Spektren davon aufgenommen. Mit dieser Methode konnten in drei biologischen Replikaten insgesamt 386 (Pup-Proben) bzw. 226 (Pup-E64A-Proben) unterschiedliche Proteine identifiziert werden, davon 191 sowohl in den Pup- als auch in den Pup-E64A-Proben (vollständige Liste in Tabelle A7 im Anhang). Für 54 Proteine aus den Pup-Proben wurde außerdem durch automatische Suche mit den erhaltenen MS/MS-Spektren mind. ein pupylierter Lysin-Rest identifiziert. Demnach ergibt sich zusammen mit Dps (Kapitel 3.2.1) ein Pupylom von 55 Proteinen in *C. glutamicum* (Tabelle 5). Die MS/MS-Spektren der pupylierten Peptide dieser Zielproteine wurden nachträglich manuell überprüft und die Pupylierung bestätigt. In den Pup-E64A-Proben wurde, wie zu erwarten, keine Pupylierung von Proteinen nachgewiesen.

Von den 54 mit MudPIT identifizierten, pupylierten Proteinen wurden pupylierte Reste von 15 in allen drei Replikaten, insgesamt 14 in jeweils zwei und insgesamt 25 in jeweils nur einem biologischen Replikat detektiert. Insgesamt konnten 62 unterschiedliche, pupylierte Lysin-Reste sowie drei putativ pupylierte Arginin-Reste identifiziert werden. Das heißt, in manchen Proteinen wurde mehr als ein Aminosäurerest als pupyliert identifiziert. In zwei Proteinen ergab die Analyse der MS/MS-Spektren eine Pupylierung von zwei verschiedenen Resten am selben tryptischen Peptid, und zwar für K1 und R10 des Peptids KIGQASPEDRPAL-LEGSNELK von SerS (Cg3201, siehe auch Kapitel 3.3.2) bzw. von K6 und K9 des Peptids LQLVDKNVKIMK von LdhA (Cg3219). In beiden Fällen konnte jedoch mit Hilfe der MS/MS-Daten kein Nachweis erbracht werden, dass beide Reste gleichzeitig pupyliert waren. Insgesamt wurden in fünf Proteinen, SahH, FumC, IlvC, Acn und LdhA, zwei pupylierte Reste gefunden, in drei Proteinen, SerS, Tuf und HisD, sogar drei (Tabelle 5).

Tabelle 5. Liste der 55 pupylierten Proteine aus *C. glutamicum* ATCC 13032, sortiert nach funktionalen Kriterien und Genlocusnummern. Die Proteine wurden über Decahistidin-getaggetes Pupyloprotein mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und mittels multidimensionaler Proteinidentifizierungstechnik (MudPIT) identifiziert. Gezeigt sind: die jeweilige Genlocusnummer und der Proteinname sowie dessen Annotation. Proteine, deren Annotation fett geschrieben ist, wurden auch mittels MALDI-TOF-MS im gereinigten Pupyloprotein identifiziert (Abbildung 9). Außerdem gezeigt: die Größe des Proteins in kDa, die Zahl aller für das jeweilige Protein aus der MudPIT-Analyse in drei biologischen Replikaten gefundenen Peptide (# Pep.) und die Position der pupylierten Reste. In Klammern hinter der Position ist die Zahl der MS/MS-Spektren aus den MudPIT-Messungen für das jeweilige pupylierte Peptid angegeben (# Spek.). Für vier pupylierte Lysin-Reste in fett konnte mittels *Alignments* mit ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) herausgefunden werden, dass sie zwischen *C. glutamicum* und entweder *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* oder *R. erythropolis* konserviert sind. Die hinteren vier Spalten geben an, ob Homologe der identifizierten pupylierten Proteine aus *C. glutamicum* auch in den Pupyloproteinen von *M. tuberculosis* (1, Festa *et al.*, 2010), *M. smegmatis* (2, Poulsen *et al.*, 2010) bzw. (3, Watrous *et al.*, 2010) oder *R. erythropolis* (4, Yun *et al.*, 2012) als putative Ziele der Pupylierung (o) oder als pupyliert detektiert (x) wurden. Die Suche nach Homologie wurde mittels BLASTp-Analysen durchgeführt (Altschul *et al.*, 1990). Die Pupylierung an Dps wurde ausschließlich mittels MALDI-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie gezeigt.

Gen-locus	Protein-name	Annotation	Größe (kDa)	# Pep.	Position (# Spek.)	1	2	3	4
Proteine des Metabolismus									
Cg0294	AspT	Aspartat-Aminotransferase	46,5	37	K315 (25)	o	x	x	x
Cg0482	GpmA	Phosphoglycerat-Mutase	27,2	17	K173 (5)		o	o	
Cg0860	SahH	S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase	52,0	42	K46 (2), K457 (137)	x			x
Cg0948	SerC	Phosphoserin-Aminotransferase	40,4	11	K219 (1)	o			
Cg0973	Pgi	Glucose-6-phosphat-Isomerase	59,2	9	K30 (1)	o			
Cg1111	Eno	Enolase	44,9	23	K234 (51)		o	o	
Cg1145	Fum	Fumarase	50,2	36	K168 (3), K252 (4)	o	o	o	
Cg1268	GlgA	Glycogen-Synthase	42,5	14	K360 (6)				
Cg1435	IlvB	Acetolactat-Synthase, große Untereinheit	66,8	5	K553 (2)	o		o	
Cg1437	IlvC	Acetohydroxysäure-Reductoisomerase	36,2	12	K290 (10), K321 (1)	o	o	o	
Cg1488	LeuD	Isopropylmalat-Isomerase, kleine Untereinheit	22,2	16	K126 (185)	x	x	o	
Cg1659	Gpt	Purin-Phosphoribosyl-Transferase	17,8	4	K132 (2)				
Cg1737	Acn	Aconitase	101,7	41	K38 (1), K393 (6)	o	o	x	
Cg1790	Pgk	Phosphoglycerat-Kinase	42,7	15	K309 (3)	o	o	o	
Cg2083	Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase	67,9	20	K352 (6)	o			
Cg2304	HisC	Histidinolphosphat-Aminotransferase	39,9	27	K55 (49)	o	o	o	
Cg2305	HisD	Histidinol-Dehydrogenase	46,8	24	K56 (1), K97 (2), K407 (97)	o	x	o	
Cg2833	CysK	O-Acetylserin-(Thiol-)Lyase	32,8	21	K220 (1)	x	o		
Cg2840	ActA	Acetyl-CoA:CoA-Transferase	54,5	26	K231 (1)				
Cg2958	ButA	L-2,3-Butandiol-Dehydrogenase	27,1	13	K133 (10)	o			
Cg3047	AckA	Acetat-Kinase	43,1	6	K137 (2)	o			
Cg3063	PurA	Adenylosuccinat-Synthetase	46,8	35	K284 (196)	x		x	
Cg3068	Fda	Fructosebisphosphat-Aldolase	37,2	14	K237 (1)				
Cg3118	Cysl	Sulfit-Reductase (Hämoprotein)	63,0	12	K539 (2)	o	x	o	
Cg3219	LdhA	NAD ⁺ -abhängige L-Lactat-Dehydrogenase	34,4	10	K98 (1), K101 (1)				

Gen-locus	Protein-name	Annotation	Größe (kDa)	# Pep.	Position (# Spek.)	1	2	3	4
Proteine der Translation									
Cg0583	FusA	Elongationsfaktor EF-2/G	77,4	35	K492 (2)	x			
Cg0587	Tuf	Elongationsfaktor Tu	43,9	29	K76 (17), K185 (1), K188 (6)	o	x	o	
Cg0594	RplC	50S ribosomales Protein L3	23,1	10	K74 (3)		o		
Cg1017	MetS	Methionyl-tRNA-Synthetase	67,6	10	K216 (1)	o			
Cg1333	ArgS	Arginyl-tRNA-Synthetase	59,7	13	K549 (2)	o			
Cg1420	GatB	Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, Untereinheit B	53,5	5	K490 (2)		o		
Cg2609	ValS	Valyl-tRNA-Synthetase	101,6	31	(R342) (1)				
Cg3201	SerS	Seryl-tRNA-Synthetase	46,5	22	K58 (3), (R67) (3), K80 (6)				
Andere Proteine									
Cg0193	PepO	Endopeptidase O	71,3	20	(R402) (1)		o		
Cg0350	GlxR	cAMP-abhängiger, globaler Transkriptionsregulator GlxR	25,0	19	K57 (6)	o	o		
Cg0378		Putatives, phagenassoziiertes Protein	17,1	3	K142 (2)				
Cg0403	RmlB1	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	38,1	21	K307 (4)	o			
Cg0475		Konserviertes, hypothetisches Protein	17,8	4	K161 (16)				
Cg1044		Konserviertes, hypothetisches Protein	12,7	6	K31 (6)				
Cg1136		Konserviertes, hypothetisches Protein	14,7	3	K89 (2)				
Cg1244	ArsC4	Arsenat-Reductase	12,9	2	K44 (1)				
Cg1267		Putative β -Fructosidase (Levanase/Invertase)	54,6	6	K312 (2)				
Cg1373		Putatives Glyoxalase-/Bleomycin-Resistenz/Dioxygenase-Superfamilie Protein	16,8	5	K137 (5)		o		
Cg1386	EtfB	Elektronentransfer-Flavoprotein, β -Untereinheit	27,2	9	K200 (5)	o	o	o	
Cg1553	Qor2	Chinon-Oxidoreductase	29,0	3	K125 (2)				
Cg1595	UspA2	Universelles Stressprotein Nr. 2	16,1	6	K94 (1)	o	o	o	
Cg1811		Putativer Integration-Host-Faktor cIHF	11,9	6	K45 (1)		o	o	
Cg2275		Putatives Zellteilungs-Initiatorprotein	29,5	8	K188 (1)				
Cg2453		Putative Exoribonuclease	54,2	17	K115 (15)				
Cg2527	Dcp	Putatives Peptidyl-Dipeptidase-A-Protein	73,9	42	K305 (336)				
Cg2782	Ftn	Ferritin	18,1	16	K78 (52)	o	o	x	
Cg2988	Ppa	Anorganische Pyrophosphatase	17,9	18	K147 (2)		o		x
Cg3255	UspA3	Universelles Stressprotein Nr. 3	32,2	4	K238 (2)	x		x	
Cg3422	TrxB	Thioredoxin-Reductase	34,3	10	K64 (3)		o	o	
Nur MALDI-TOF/TOF:									
Cg3327	Dps	Mangelinduziertes DNA-Schutzprotein Dps	18,4	7	K14 (1)				

Für Dps konnte im Gegensatz zur MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse mittels MudPIT kein Nachweis einer Pupylierung erbracht werden, obwohl das Dps-Protein identifiziert wurde. Es besteht immer die Möglichkeit, dass Peptide in massenspektrometrischen Messungen nicht detektiert werden können, wenn die Ionisierung, bei MudPIT mit Elektrospray-Ionisierung, bei MALDI matrix-assistierte Laserdesorption/-ionisierung, eines Peptids nicht optimal funktioniert. So könnten pupylierte Peptide übersehen worden sein. Deshalb wurden zusätzlich aus allen identifizierten Proteinen der Pup- bzw. Pup-E64A-Proben diejenigen herausgesucht, die in allen drei Pup-Proben vorhanden waren, aber in der Pup-E64A-Kontrolle fehlten, um eine Liste putativer Zielproteine zu erhalten (Tabelle A8 im Anhang). Von diesen 72 gefundenen Proteinen waren 21 bereits Teil des bestimmten Pupyloms, wohingegen für die restlichen 51 Proteine kein pupyliertes Peptid detektiert worden war. Unter diesen 51 Proteinen finden sich etwa die einzigen zwei Proteine aus prominenten Banden der co-gereinigten Zielproteine, für die bisher mit keiner MS-Methode ein pupyliertes Peptid gefunden werden konnte: die Diaminopimelat-Decarboxylase LysA und die Acetylmethionin-Aminotransferase ArgD (siehe Abbildung 9). Außerdem fanden sich fünf bereits bestätigte pupylierte Proteine aus anderen Organismen in dieser Liste: die Katalase KatA, die Ribosephosphat-Pyrophosphokinase PrsA, die putative UDP-*N*-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase GlmU, die *S*-Adenosylmethionin-Synthetase MetK, sowie das erwähnte ArgD-Protein (siehe Tabelle A9 im Anhang, kursive Genlocus-Nummern). Wie oben erwähnt (Kapitel 3.2.1), könnten aufgrund der nativen Aufreinigung des Pupyloms auch nicht-kovalent mit Pupylierungssubstraten interagierende Proteine mitgereinigt worden sein. Die große Zahl der in den Proben mittels MudPIT identifizierten Proteine im Vergleich zur geringen Zahl der tatsächlich pupylierten Proteine scheint das zu bestätigen. Jedoch kann eine etwaige Pupylierung dieser Proteine auch nicht ausgeschlossen werden (Tabelle A8 im Anhang). Deshalb wurde eine Methode zur *in-vitro*-Pupylierung von Proteinen etabliert (Kapitel 3.3), um zukünftig Proteine auf eine Pupylierung hin zu untersuchen.

Wenn man die bestätigten Zielproteine der Pupylierung aus *C. glutamicum* anhand ihrer verifizierten oder vorhergesagten physiologischen Rolle sortiert, wird deutlich, dass die zwei Hauptkategorien „Metabolismus“ und „Translation“ 60% aller Zielproteine ausmachen. Eine Karte des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels mit den pupylierten Proteinen der Kategorie „Metabolismus“ aus Tabelle 5 ist in Abbildung 10 zu finden, in der unterschiedliche Stoffwechselwege in Farbe dargestellt sind.

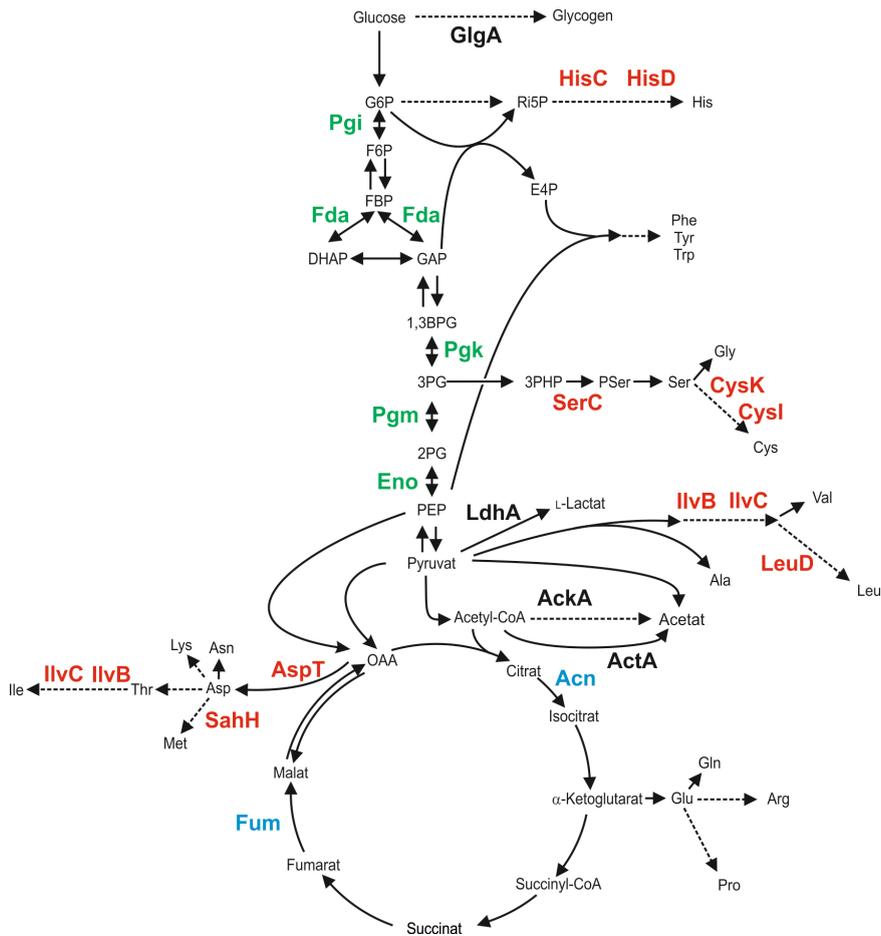


Abbildung 10. Pupylierte Proteine in *C. glutamicum*, die in den Zentralstoffwechsel involviert sind. Die Enzyme und Metabolite des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels (Glykolyse, grün, und Citratzyklus, blau), die Abzweigungen zur Aminosäurebiosynthese (rot), sowie weitere Abzweigungen (fermentative Wege sowie Glycogensynthese, schwarz) sind gezeigt. Metabolite: 1,3BPG, 1,3-Bisphosphoglycerat; 2PG, 2-Phosphoglycerat; 3PG, 3-Phosphoglycerat; 3PHP, 3-Phosphohydroxyppyruvat; AMP, Adenosinmonophosphat; DHAP, Dihydroxyacetonphosphat; E4P, Erythrose-4-phosphat; F6P, Fructose-6-phosphat; FBP, Fructose-1,6-bisphosphat; G6P, Glucose-6-phosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-phosphat; OAA, Oxalacetat; PEP, Phosphoenolpyruvat; P5Ser, Phosphoserin; Ri5P, Ribulose-5-phosphat; Aminosäuren sind im Drei-Buchstaben-Code dargestellt (siehe Abkürzungen). Proteine: Acn, Aconitase; ActA, CoA-Transferase; AckA, Acetat-Kinase; AspT, Aspartat-Aminotransferase; Cysl, Sulfid-Reductase; CysK, O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase; Eno, Enolase; Fda, Fructose-Bisphosphat-Aldolase; Fum, Fumarase; GlgA, Glycogen-Synthase; HisC, Histidinolphosphat-Aminotransferase; HisD, Histidinolphosphat-Synthase; IlvB, Hydroxysäure-Reductoisomerase; LdhA, L-Lactat-Dehydrogenase; Pgi, Glucose-6-phosphat-Isomerase; Pkg, Phosphoglycerat-Kinase; SahH, S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase; SerC, Phosphoserin-Aminotransferase. Durchgezogene Linien zeigen eine, gestrichelte Linien mehrere Reaktionen.

Die Kategorie „Metabolismus“ umfasst unter anderem fünf Enzyme der Glykolyse (Pgi, Fda, Pkg, Pgm und Eno; grün), sowie zwei Enzyme (Acn und Fum) aus dem Citratzyklus (blau). Außerdem fanden sich ein oder mehrere pupylierte Enzyme in den Aminosäurebiosynthesewegen für Histidin, Serin, Cystein, Aspartat und den verzweigtkettigen Aminosäuren (rot).

Desweiteren waren Acetat-Bildung über die Acetat-Kinase (AckA) oder über die Acetyl-CoA:CoA-Transferase (ActA), L-Lactat-Bildung über LdhA, Glykogen Bildung über die Glykogen-Synthase (GlgA) und die Nucleotidsynthese (Gpt, PurA) Ziele der Pupylierung in *C. glutamicum*. In der Kategorie „Translation“ wurden ein ribosomales Protein der 50S Untereinheit (RplC), die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G, die Methionyl-, Valyl-, Seryl- und Arginyl-tRNA-Synthetasen sowie die Glutamyl-tRNA Amidotransferase gefunden. Die restlichen 40% der Zielproteine stellen eine heterogene Gruppe mit verschiedensten oder unbekanntenen Funktionen dar, wie putative Stressproteine (UspA2, UspA3, Ftn, ArsC4) oder auch putative Peptidasen (PepO, Dcp). Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Pupylierung Proteine zahlreicher Stoffwechselprozesse zu betreffen scheint.

3.3 Etablierung eines Systems zur *in-vitro*-Pupylierung

Um die Möglichkeit zu haben, putativ pupylierte Proteine zu untersuchen, war es ein Ziel dieser Arbeit, gereinigte Proteine *in vitro* zu pupylieren. Durch diese Methode eröffnet sich zum einen die Möglichkeit, zu überprüfen, ob ein ausgewähltes Protein pupyliert werden kann oder nicht; zum anderen kann auch die mutmaßlich pupylierte Aminosäure bestimmt werden, indem Punktmutationen, durch die pupylierte Aminosäure-Reste ausgetauscht werden, in Pupylierungssubstrate eingeführt werden (siehe Kapitel 3.3.2). Striebel *et al.* (2009) etablierten die *in-vitro*-Pupylierung von Substraten mit Enzymen aus *M. tuberculosis* H37Rv. Dabei exprimierten sie die Pup-Ligase PafA mit C-terminalem Hexahistidin-Tag sowie das Modellsubstrat, die Malonyl-CoA-Acyl-Carrierprotein-Transacylase FabD, mit N-terminalem Strep-Tag in *E. coli* BL21(DE3) und reinigten diese über Ni²⁺-NTA- bzw. Streptactin-Affinitätschromatographie. Pup wurde ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, allerdings mit einem Hexahistidin-Tag plus einer TEV-Protease-Schnittstelle am N-Terminus. Dadurch konnten sie nach der Aufreinigung den Hexahistidin-Tag von Pup mittels TEV-Protease abspalten, wodurch sie Pup in der nativen Größe erhielten. Die gereinigten Proteine wurden bei pH 7,5 in Puffer R_a (enthält Tris, NaCl, MgCl₂, Glycerol und DTT; Konzentrationen siehe Kapitel 2.8.7) unter Zugabe von 5 mM ATP in folgenden Konzentrationen gemischt: 10 µM Pup, 0,5 µM PafA und 2 µM Substrat. Die *in-vitro*-Pupylierung erfolgte für 17 h bei Raumtemperatur.

3.3.1 Ferritin als Modellsubstrat der *in-vitro*-Pupylierung

Analog zu dem Protokoll von Striebel *et al.* wurden für diese Arbeit die Proteine PafA (54,9 kDa) und Pup (6,8 kDa) aus *C. glutamicum* in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und gereinigt. Pup wurde, abweichend vom Protokoll mit Pup aus *M. tuberculosis*, mit einem Decahistidin-Tag und einer TEV-Schnittstelle (aus dem Vektor pET-TEV1) gereinigt und danach der Tag mit der TEV-Protease abgeschnitten. Um die Funktionalität der gereinigten Proteine zu tes-

ten, wurde als Modellsubstrat Ferritin (Ftn) ausgewählt. Dieses Protein war bereits als pupyliertes Protein identifiziert worden (Tabelle 5). Außerdem war der Größenunterschied zwischen pupyliertem (24,9 kDa) und unpupyliertem (18,1 kDa) Ftn im SDS-Gel erkennbar (Abbildung 9) und sowohl das unmodifizierte wie auch das pupylierte Ftn unterscheidet sich in der Größe deutlich von PafA und auch Pup. Die Reinigung von *C. glutamicum* Ftn erfolgte wie für Pup über einen Decahistidin-Tag und TEV-Schnittstelle, sodass Ftn in seiner nativen Größe eingesetzt werden konnte. Als Negativkontrolle wurde der Transkriptionsregulator DtxR (Cg2103; 26,3 kDa) mit C-terminalem Hexahistidin-Tag gewählt, da es nicht als pupyliertes Protein identifiziert worden war, obwohl es fünf Lysine enthält und ebenfalls deutlich kleiner als PafA und größer als Pup ist. In Abbildung 11 sind die Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gele sowie ein Western-Blot, in dem Pup mittels Anti-Pup-Antiserum detektiert worden war, einer solchen *in-vitro*-Pupylierung von Ftn und DtxR zu sehen. Die Banden aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide mittels MALDI-TOF-MS identifiziert (Tabelle A2 im Anhang).

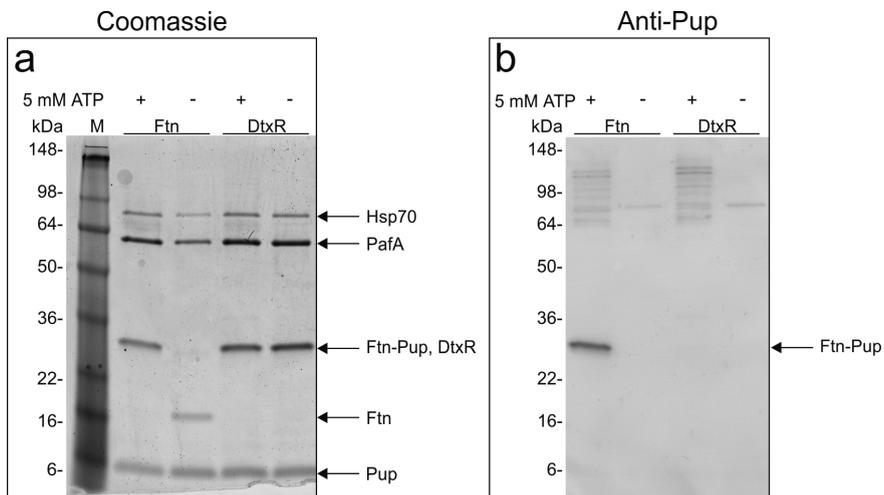


Abbildung 11. *In-vitro*-Pupylierungsstudien mit Ferritin (Ftn) und dem Transkriptionsregulator DtxR. Links sind die Größen des Protein-Standards (M) in kDa angegeben. Mit Ftn und DtxR wurde eine *in-vitro*-Pupylierung durchgeführt. Die Proben enthielten alle 2 μ M Substrat (Ftn oder DtxR), 0,5 μ M der Pup-Ligase PafA-6xHis und 10 μ M Pup-Protein. Die Umsetzung erfolgte in Puffer R_a (Kapitel 2.8.7) mit 5 mM ATP für 17 h bei RT. Für Negativkontrollen wurde auf die Zugabe von ATP verzichtet. Alle verwendeten Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mittels Polyhistidin-Tags über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Tags von Pup und Ftn wurden mittels TEV-Protease abgespalten. Auf der linken Seite (a) ist das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel abgebildet, auf der rechten Seite (b) ein Western-Blot mit Anti-Pup-Antiserum (Kaninchen, 1:2.000). Die mit Pfeilen markierten Proteine wurden mittels MALDI-TOF/TOF-MS identifiziert (Tabelle A2 im Anhang): DtxR (Cg2103; 26,3 kDa), Ftn (Cg2782; 18,1 kDa), Hsp70 (Chaperon aus *E. coli* BL21(DE3); 65,6 kDa), PafA (Cg1688; 54,9 kDa), Pup (Cg1689; 6,8 kDa). Diese Abbildung ist exemplarisch für zwei unabhängige biologische Replikate.

Die SDS-PAGE zeigt, dass Ftn *in vitro* pupyliert werden kann. Es war ein deutlicher Unterschied in der Größe der Ftn-Bande mit und ohne ATP zu sehen, der in etwa den erwarteten

6,8 kDa entsprach, den eine Modifizierung durch Pup ausmacht. Die Pupylierung konnte mittels Western-Blot nachgewiesen werden, es tauchte nur eine Bande in der Probe mit ATP auf, während keine in der Negativkontrolle ohne ATP zu sehen war. Freies Pup-Protein konnte im gezeigten Western-Blot nicht detektiert werden, obwohl der Anti-Pup-Antikörper auch freies Pup in einer Menge > 0,25 µg detektieren kann (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich wurde das kleine Pup-Protein während des Blottings durch die Membran geblottet (*blow-through*), wodurch die Menge an freiem Pup im Western-Blot geringer war als die von an Zielproteine gebundenen Pup-Molekülen, welche aufgrund des höheren Molekulargewichts nicht durchgeblottet worden waren. Außerdem wurde auch mittels MALDI-TOF-MS/MS ein Peptid mit dem pupylierten K78 in Ftn (Tabelle 5) identifiziert (Abbildung A1b im Anhang). Für DtxR konnte weder im SDS-Polyacrylamid-Gel noch im Western-Blot eine Pupylierung nachgewiesen werden (Abbildung 11). Diese Ergebnisse zeigten, dass heterolog exprimiertes PafA und Pup funktionell waren und dass bei einer *in-vitro*-Pupylierung nicht jedes lysinreiche Protein pupyliert wird. Es war zudem das erste Mal, dass ein corynebakterielles Protein *in vitro* mit Enzymen aus *C. glutamicum* pupyliert wurde. Parallel zu den hier durchgeführten Arbeiten wurde gezeigt, dass die *in-vitro*-Pupylierung von Substraten aus *M. tuberculosis* mit heterolog in *E. coli* exprimiertem *C. glutamicum* PafA und Pup möglich ist (Özcelik *et al.*, 2012).

3.3.2 Untersuchungen zur Pupylierung von Arginin-Resten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine *in-vitro*-Pupylierung mit den in *E. coli* exprimierten Proteinen möglich war, wurde eine Beobachtung der MudPIT-Messungen (Tabelle 5) weiter untersucht: Interessanterweise ließen sich die MS/MS-Daten von pupylierten Peptiden der putativen Endopeptidase O (PepO) sowie der Valyl- und der Seryl-tRNA-Synthetase (ValS und SerS) so interpretieren, dass eine Pupylierung an dem im jeweiligen Peptid vorkommenden Arginin-Rest wahrscheinlicher erschien als an dem ebenfalls vorhandenen Lysin-Rest. Die Pupylierung von Arginin-Resten wurde bisher noch nicht beschrieben.

Um die Pupylierung eines Peptids zu bestätigen, haben Watrous *et al.* (2010) während ihrer Pupyliomstudie in *M. smegmatis* einen Trainingsmarker vorgeschlagen: In den MS/MS-Spektren von pupylierten Peptiden sollten Fragmentationen zu finden sein, die dem trypsinierten Peptid ohne GG oder GGE der Pup-Seitenkette entsprechen, bei denen also das Peptid selbst intakt und nur die Aminosäuren der Pup-Seitenkette fragmentiert sind. In den MS/MS-Spektren aller drei Peptide, die auf eine Pupylierung an Arginin-Resten hindeuteten, konnten diese charakteristischen Fragmentationen gefunden werden (Abbildung A2 im Anhang). Das bestätigte, dass die gefundenen Peptide aller drei Proteine auch tatsächlich pupyliert waren.

Um die pupylierte Aminosäure zu identifizieren, wurden die Gene von zwei der drei möglichen Proteine, und zwar *serS* und *pepO*, mit den DNA-Sequenzen für einen C-terminalen Heptathistidin-Tag versehen, exprimiert und mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Konstrukte SerS-7xHis, PepO-7xHis). Die Expression wurde im Stamm *C. glutamicum* $\Delta pup\Delta dop\Delta arc$ durchgeführt, dem die wesentlichen Komponenten der Pupylierungsmaschinerie fehlen (Kapitel 3.1), um zu verhindern, dass *in-vivo*-Pupylierung der Proteine vor der Reinigung stattfand. Bei SerS ging es um die Frage, ob K58 oder R67 pupyliert wird, bzw. bei PepO, ob K398 oder R402 pupyliert wird. Von beiden Proteinen wurden deshalb parallel zum WT-Protein auch je zwei Muteine exprimiert und über einen C-terminalen Heptahistidin-Tag gereinigt, die einen Austausch des vermutlich pupylierten Lysins oder Arginins zu Alanin trugen. Dadurch entstanden die Konstrukte SerS-K58A-7xHis bzw. SerS-R67A-7xHis und PepO-K398A-7xHis bzw. PepO-R402A-7xHis. Der Austausch des tatsächlich pupylierten Rests zu Alanin sollte dazu führen, dass das Protein nicht mehr pupyliert werden kann. Deshalb wurden diese insgesamt sechs Proteine dann *in vitro* pupyliert und im SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt (Abbildung 12). Die in Abbildung 12a und c gekennzeichneten Banden im SDS-Gel wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert (Tabelle A3 im Anhang).

Sowohl bei den SerS- als auch bei den PepO-Konstrukten war in den SDS-Polyacrylamid-Gelen und im Western-Blot zu beobachten, dass der Austausch des mutmaßlich pupylierten Lysin-Rests zu einer deutlichen Reduktion der pupylierten Bande (SerS-Pup = 54,2 kDa; PepO-Pup = 79,1 kDa) im Vergleich zum Austausch des mutmaßlich pupylierten Arginin-Rests führt. Das sprach bei beiden Proteinen dafür, dass der jeweilige Lysin- und nicht der Arginin-Rest *in vitro* pupyliert worden war.

Bei SerS wurde beobachtet, dass auch K80 mittels MudPIT als pupyliert identifiziert worden war (Tabelle 5). Das könnte erklären, warum beim Austausch von K58 immer noch eine und beim Austausch von R67 zwei pupylierte Banden im Western-Blot zu erkennen waren. Bei SerS-R67A-7xHis entsprach die obere Bande ($64 < x < 98$ kDa) wahrscheinlich einer (Multi-)Pupylierung sowohl an K58 als auch K80. Außerdem ist zu entdecken, dass unpupyliertes SerS-7xHis als zwei Banden im SDS-Gel läuft und auch in der SDS-PAGE zwei (Abbildung 12a) bzw. im Western-Blot vier (Abbildung 12b) pupylierte Banden im Vergleich zu SerS-R67A-7xHis aufweist. Beide unpupylierten SerS-7xHis-Banden wurden mittels MALDI-TOF-MS als SerS identifiziert. In beiden im SDS-Gel sichtbaren Banden von SerS-7xHis, die laut Western-Blot (Abbildung 12b) pupyliert waren, konnte die Pupylierung an K58 mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS nachgewiesen werden (Abbildung A1c im Anhang). Die Gründe für die Aufspaltung von SerS in zwei Banden sind unklar, da auch bei einer erneuten Reinigung (Daten nicht gezeigt) keine Veränderung des Bandenmusters eintrat. Die zwei Banden könnten für eine posttranslationale Modifikation, wie z.B. eine Phosphorylierung, von SerS-7xHis

sprechen, die an SerS-R67A-7xHis/-K58A-7xHis nicht stattfand, oder für eine Co-Reinigung von SerS-7xHis mit dem nativen SerS, das im Expressionsstamm nicht deletiert worden war. Beides konnte jedoch mittels MALDI-TOF-MS nicht nachgewiesen werden, wodurch weder die eine noch die andere Vermutung bestätigt werden konnte.

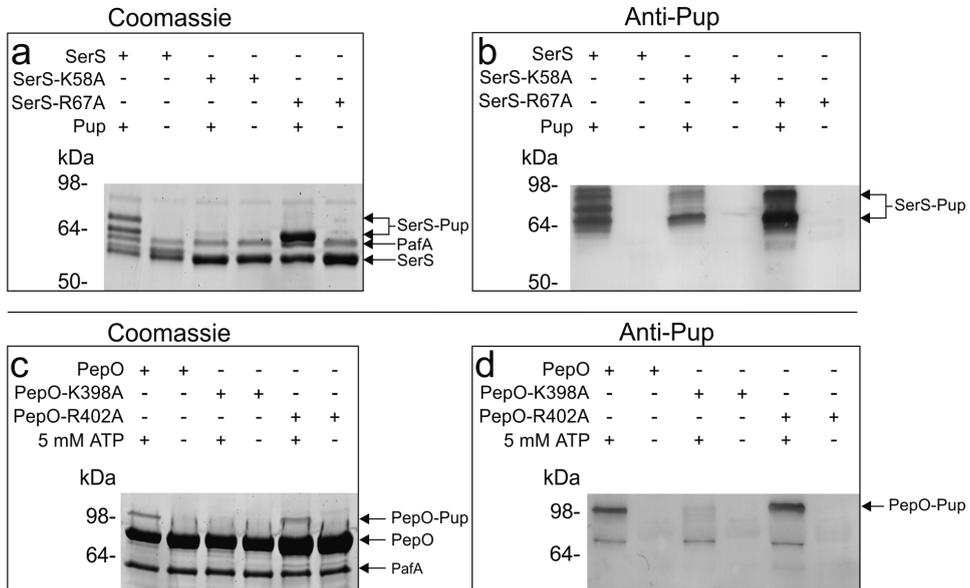


Abbildung 12. SDS-Polyacrylamid-Gele (a, c) und Western-Blot-Analysen (b, d) der *in-vitro*-Pupylierungsexperimente von SerS-7xHis, SerS-K58A-7xHis und SerS-R67A-7xHis (a, b) bzw. PepO-7xHis, PepO-K398A-7xHis, PepO-R402A-7xHis (c, d). Links sind die Größen des Protein-Standards in kDa angegeben. Die Proteine wurden mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie über die C-terminalen Heptahistidin-Tags aus *C. glutamicum* $\Delta\text{pup}\Delta\text{dop}\Delta\text{arc}$ gereinigt und einer *in-vitro*-Pupylierung unterzogen (Kapitel 2.8.7). Die Proben enthielten alle 2 μM Substrat (SerS oder PepO), 0,5 μM der Pup-Ligase PafA-6xHis und 10 μM Pup-Protein. Die Umsetzung erfolgte in Puffer R_a mit 5 mM ATP für 17 h bei RT. In den Negativkontrollen wurde auf die Zugabe von Pup (a, b) bzw. ATP (c, d) verzichtet. PafA-6xHis und Pup wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mittels Polyhistidin-Tags über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Der Tag von Pup wurde mittels TEV-Protease abgespalten. Für die Western-Blots (b, d) wurde ein Anti-Pup-Antiserum (aus Kaninchen, 1:2.000) verwendet. Die markierten Banden wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert als: SerS-Pup: SerS-K58-Pup (Cg3201; 47,4 kDa); PafA: PafA (Cg1688; 54,9 kDa); SerS: SerS/-K58A/-R67A; PepO-Pup: PepO (Cg0193; 72,3 kDa), PepO: PepO (Tabelle A3 im Anhang). Die SDS-Gele/Western-Blots wurden zugeschnitten, die vollständigen Gele/Western-Blots sind in Abbildung A4 im Anhang abgebildet. Die Abbildung ist exemplarisch für je zwei biologische Replikate.

3.4 Untersuchungen zur physiologischen Rolle der Pupylierung in *C. glutamicum*

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass die Pupylierung in *C. glutamicum* *in vivo* stattfinden kann (Kapitel 3.2), aber unter Standard-Wachstumsbedingungen (BHI-Vollmedium, CGXII-Glucose-Minimalmedium) nicht essentiell für das Wachstum ist (Kapitel 3.1). Deshalb wurde, um eine physiologische Rolle der Pupylierung in *C. glutamicum* zu finden, nach Kultivierungsbedingungen gesucht, unter denen der Verlust der Pupylierung Ein-

fluss auf das Wachstum von *C. glutamicum* hat. Daraufhin wurden der WT und die pupylierungsdefiziente Δpup -Mutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen verglichen.

3.4.1 Untersuchungen zum Wachstum der Δpup -Mutante auf verschiedenen Kohlenstoff-/Energiequellen sowie unter verschiedenen Stress-/Mangelbedingungen

Da sich im Pupylom (Tabelle 5) sehr viele Proteine befanden, die in den zentralen Kohlenstoffstoffwechsel involviert sind, wurde zuerst das Wachstum von WT und Δpup -Mutante in CGXII-Minimalmedium untersucht, dem anstatt 4% (w/v) Glucose andere Kohlenstoff- bzw. Energiequellen zugesetzt wurden. Dabei wurden sowohl Schüttelkolben (Kapitel 2.5.3) als auch das BioLector-System benutzt (Kapitel 2.5.4). Als Kohlenstoffquellen wurden Acetat (2% (w/v)) und L-Lactat (100 mM) getestet, da Enzyme, die an der Verstoffwechslung dieser organischen Säuren beteiligt sind, pupyliert sind (Abbildung 10). Außerdem wurde Gluconat (100 mM) als Kohlenstoffquelle, die über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird (Bianchi *et al.*, 2001), bzw. Citrat (50 mM) als aerob über den Citratzyklus verstoffwechselte Kohlenstoffquelle (Polen *et al.*, 2007) getestet. Bei Wachstum auf diesen Kohlenstoffquellen waren sowohl die Wachstumsraten als auch die erreichten Zelldichten zwischen WT und Δpup vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Vergleich mit der Kohlenstoffquelle Arabitol (0,8% (w/v)) führte zu demselben Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.3.1) beschrieben, dient die Pupylierung in Mycobakterien unter anderem der Proteolyse. Deshalb wurden Wachstumsbedingungen untersucht, bei denen *C. glutamicum* vermutlich auf die Proteolyse angewiesen ist, um optimal wachsen zu können. Dazu wurde einerseits das Wachstum von *C. glutamicum* WT und Δpup -Mutante mit Glutamin (70 mM) als einziger Kohlen- und Stickstoffquelle untersucht. Im Vergleich zum Wachstum in Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose (\cong 222 mM) waren dabei sowohl die Menge an verfügbarem Kohlenstoff als auch Stickstoff um ca. 70% reduziert, wodurch angenommen wurde, dass *C. glutamicum* vermehrt auf Recycling-Mechanismen, u. a. durch Proteolyse, zurückgreifen müsste, um Proteinneusynthese zu betreiben. Das Wachstum von WT und Δpup -Mutante war unter den getesteten Bedingungen jedoch vergleichbar mit bisher veröffentlichten Werten (Rehm *et al.*, 2010). Andererseits wurde untersucht, wie *C. glutamicum* WT und Δpup -Mutante auf Hitzestress reagierten, der durch 5, 10 oder 15 min Inkubation bei 55°C ausgelöst wurde. Hierbei wurde angenommen, dass *C. glutamicum* denaturierte Proteine eventuell Pup-abhängig abbauen könnte, um eine Aggregation der denaturierten Proteine zu verhindern. Unter den getesteten Bedingungen gab es jedoch keinen Wachstumsunterschied zwischen beiden Stämmen. Der WT erreichte eine finale OD₆₀₀ zwischen 42 und 56, die Δpup -Mutante zwischen 42 und 60.

Es wurde herausgefunden, dass die Pupylierung und das Proteasom in *M. tuberculosis* für die Resistenz gegenüber nitrosativem Stress notwendig sind (siehe Kapitel 1.3.3). Deshalb

wurden ähnliche Kultivierungsbedingungen wie in der Studie von Darwin *et al.* (2003) gewählt. Dort wurde der Stress durch Kultivierung von *M. tuberculosis* bei pH 5,5 unter Zugabe von 3 mM Natriumnitrit erzeugt, und die Zellen danach in Vollmedium kultiviert, um sie auf ihre Lebensfähigkeit zu testen. WT und die Δpup -Mutante wurden aus einer BHI-Vorkultur in CGXII-Glucose-Minimalmedium, pH 5,5, auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Diesen Vorkulturen wurden entweder 0, 3 oder 10 mM $NaNO_2$ zugegeben. Nach 17 h waren die erreichten Biomassen zwischen WT und Δpup -Mutante vergleichbar (0 mM $NaNO_2$: WT $19,2 \pm 1,1$, Δpup -Mutante $21,5 \pm 0,6$; 3 mM: WT $2,6 \pm 0,6$, Δpup $2,6 \pm 1,1$; 10 mM: WT $0,21 \pm 0,04$, Δpup $0,20 \pm 0,04$). Danach wurden die *C. glutamicum*-Zellen in CGXII-Glucose-Minimalmedium überimpft, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu überprüfen. WT und Δpup -Mutante, die nur einem pH-Wert von 5,5 ausgesetzt waren, wuchsen anschließend in CGXII-Glucose-Minimalmedium wie erwartet (Kapitel 3.1). Die *C. glutamicum* WT- und Δpup -Zellen mit 3 mM $NaNO_2$ in der Vorkultur wuchsen mit, im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit, leicht reduzierter Wachstumsrate ($\mu = 0,36 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) und erreichten vergleichbare Biomassen. Die Zellen aus der Vorkultur mit 10 mM $NaNO_2$ schienen durch diese Bedingungen sehr stark geschädigt worden zu sein, da sie nur mit einer Wachstumsrate von $0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ wuchsen. Sie erreichten nach 24 h nur eine finale OD_{600} zwischen 0,2 und 0,3. Zumindest unter den hier getesteten Bedingungen scheint die Pupylierung somit keinen Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum* bei nitrosativem Stress zu haben.

3.4.2 Untersuchungen zum Wachstum von *C. glutamicum* unter Eisenmangel

Da die in Kapitel 3.4.1 gezeigten Wachstumsbedingungen keinen Wachstumsphänotyp der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT gezeigt hatten, wurde im Anschluss an diese Experimente das Wachstum von *C. glutamicum* WT und Δpup -Mutante unter verschiedenen Eisenkonzentrationen untersucht. Diese Bedingungen wurden gewählt, da sich im Pupyloem einige Proteine befanden, deren Genexpression Eisen-abhängig reguliert ist, wie zum Beispiel die Aconitase, eine Komponente der Isopropylmalat-Dehydratase (LeuD) sowie die Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps (Wennerhold *et al.*, 2005). Die Eisen-abhängige Genexpression wird in *C. glutamicum* hauptsächlich durch den Masterregulator DtxR gesteuert (Wennerhold & Bott, 2006, Brune *et al.*, 2006). Dieser bildet mit intrazellulär vorhandenem Eisen(II) ein Dimer, welches dann als Repressor von Genen fungiert, deren Genprodukte unter anderem hochaffine Eisenimporter sind, die unter Eisenmangel die Eisenaufnahme verbessern. Außerdem kann DtxR im Komplex mit Eisen auch die Genexpression aktivieren, zum Beispiel die der Eisenspeicherproteine *ftn* und *dps*. Außerdem reprimiert DtxR den Transkriptionsregulator RipA, der daher nur unter Eisenmangel verstärkt exprimiert wird und dann selbst als Repressor die Expression von Genen für Eisen-haltige Proteine wie der Aconitase, der Isopropylmalat-Dehydratase oder auch der Succinat:Menachinon-Oxidoreductase (SQO, *sdhCAB*) reguliert (Wennerhold *et al.*,

2005). In der genannten Studie von Wennerhold & Bott (2006) zu den Eisen-abhängigen Transkriptionsregulatoren wurde den Wachstumsmedien für die Etablierung von Eisenmangel und -überschuss statt der in CGXII-Glucose-Minimalmedium enthaltenen 36 μM Eisen(II)-sulfat 1 μM bzw. 100 μM Eisen(II)-sulfat zugesetzt. Das Wachstum von *C. glutamicum* WT und Δpup -Mutante wurde daraufhin bei diesen beiden Bedingungen im BioLector getestet. Während bei Eisenüberschuss kein Unterschied im Wachstum zwischen WT und Δpup -Mutante erkennbar war, wuchs bei der Reduktion der Eisenkonzentration auf 1 μM die Δpup -Mutante mit einer im Vergleich zum WT um 40% verringerten Wachstumsrate. Das Wachstum in Anwesenheit unterschiedlicher Eisen(II)-sulfat-Konzentrationen, und zwar 36, 10, 5, 0,1, 0,05 μM , ist in Abbildung 13 gezeigt. Das Wachstum bei 0,01 μM Eisen(II)-sulfat war vergleichbar mit 0,1 bzw. 0,05 μM und ist nicht gezeigt.

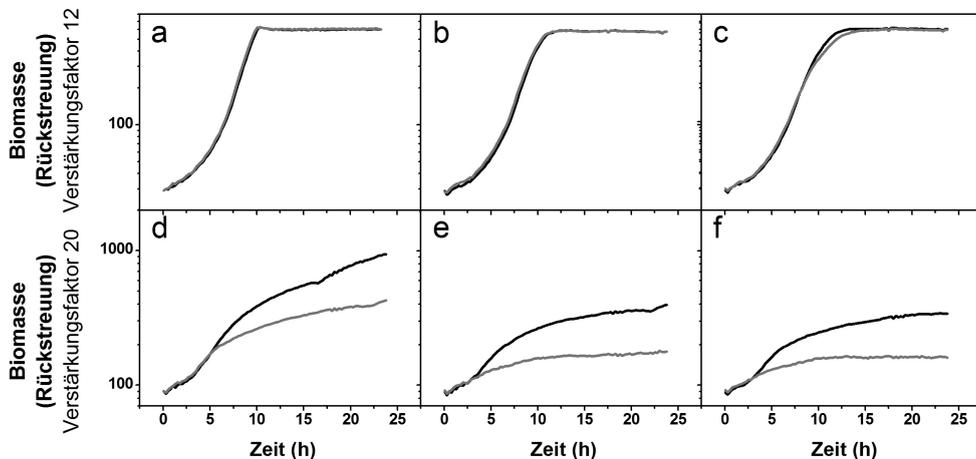


Abbildung 13. Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (schwarz) und Δpup -Mutante (grau) in Anwesenheit verschiedener Eisenkonzentrationen. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose im BioLector in 48-Flower-Well-Platten kultiviert. Gezeigt ist die gemittelte Biomasse aus zwei biologischen Replikaten. Die Vorkultur wurde in BHI-Medium kultiviert. Dem Minimalmedium wurden (a) 36 μM , (b) 10 μM , (c) 5 μM , (d) 1 μM , (e) 0,1 μM oder (f) 0,05 μM Eisen(II)-sulfat zugesetzt.

Im Wachstumsexperiment mit unterschiedlichen Eisenkonzentrationen war erkennbar, dass ab einer Zugabe von weniger als 5 μM bis 0,1 μM Eisen(II)-sulfat zum Medium die Biomassebildung beider Stämme abnahm. Eine signifikante Reduktion des Wachstums der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT wurde erkennbar (Abbildung 13d-f). Bei einer Zugabe von weniger als 0,1 μM Eisen(II)-sulfat war keine Abhängigkeit der erreichten Zelldichte von der Menge an Eisen im Medium mehr gegeben (Abbildung 13e-f). Das könnte damit zusammenhängen, dass in den Medienkomponenten noch Spuren von Eisen vorhanden waren. Um diese Spuren zu bestimmen, sollen Messungen der Eisenkonzentration im CGXII-Grundmedium ohne Eisen(II)-sulfat-Zugabe durchgeführt werden. Aufgrund der Ergebnisse

der Wachstumsexperimente wurde auch noch das Wachstum unter Mangel an anderen divalenten Kationen getestet, und zwar in CGXII-Glucose-Minimalmedium mit Spurensalzlösungen ohne Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} oder Ni^{2+} bzw. mit einer Reduktion der Zugabe von $CaCl_2$ von 10 mg/l auf 100 μ g/l oder von $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ von 500 auf 5 mg/l. Bei keiner dieser Bedingungen war ein Unterschied in der Wachstumsrate oder der erreichten Zelldichte zwischen *C. glutamicum* WT und Δpup -Mutante zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Für die weiteren Experimente, die größere Volumina des Überstandes und höhere Zellmengen voraussetzten, wurden die beiden Stämme in CGXII-Glucose-Minimalmedium mit 1 μ M Eisen(II)-sulfat in Schüttelkolben untersucht. Es zeigte sich, dass der Wachstumsdefekt der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT deutlicher wurde, wenn die Zellen bereits in der Vorkultur an Eisenmangel adaptiert worden waren (Abbildung 14).

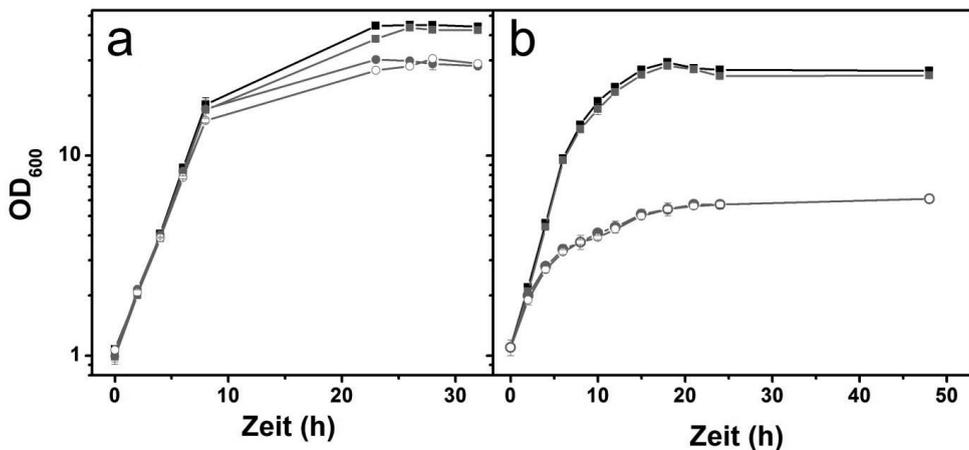


Abbildung 14. Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (schwarze Quadrate) und Δpup -Mutante (graue, gefüllte Kreise) sowie der Δpup -Mutante mit pVWEx1-*pup* (graue Quadrate) oder pVWEx1-*pup*-E64A (graue, offene Kreise) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Den Plasmid-tragenden Stämmen wurden ins Medium 25 μ g/ml Kanamycin sowie 1 mM IPTG zur Induktion der Genexpression zugesetzt. (a) Die Zellen wurden in BHI-Medium über Nacht vorkultiviert oder (b) die Zellen wurden über Nacht in CGXII-Glucose-Minimalmedium unter Eisenmangel vorkultiviert. Die Messungen stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten dar.

Der *C. glutamicum* WT erreichte bei Kultivierung unter Eisenmangel eine im Vergleich zu Standard-Eisenkonzentrationen (Kapitel 3.1) um 20-25% erniedrigte finale OD_{600} ($44,2 \pm 0,8$ gegenüber $54,8 \pm 2,4$) und Wachstumsrate ($\mu = 0,35 \pm < 0,01 \text{ h}^{-1}$ gegenüber $0,45 \pm < 0,01 \text{ h}^{-1}$) (Abbildung 14a). Die Δpup -Mutante bildete unter diesen Bedingungen bei vergleichbarer Wachstumsrate ($\mu = 0,35 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), nur 64% der Biomasse des WT's (OD_{600} final $28,1 \pm 0,9$). Das Fehlen der Pupylierung in der Δpup -Mutante hatte also unter Eisenmangel einen Einfluss auf die erreichbare Zelldichte (Abbildung 14a). Wurden die Zellen bereits in der Vorkultur unter Eisenmangel gezüchtet (Abbildung 14b), war die Wachstumsrate

des WT's vergleichbar ($\mu = 0,36 \pm < 0,01 \text{ h}^{-1}$), die erreichte Biomasse jedoch um 40% niedriger ($26,6 \pm 0,9$) als bei Vorkultivierung in BHI-Medium (Abbildung 14a). Die Δpup -Mutante wuchs im Vergleich zum WT unter diesen Bedingungen signifikant langsamer ($\mu = 0,23 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) und die Biomassebildung war um 77% reduziert ($OD_{600} = 6,1 \pm 0,3$). Dies deutet darauf hin, dass die Pupylierung in *C. glutamicum* eine wichtige Rolle für die Anpassung an Eisenmangelbedingungen spielt. Der Wachstumsdefekt der Δpup -Mutante konnte durch Plasmid-basierte Expression von *pup*, aber nicht von *pup*-E64A komplementiert werden (Abbildung 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass das schlechte Wachstum der Δpup -Mutante unter Eisenmangel auf der Abwesenheit der Pupylierung beruhte. Für die weiteren Untersuchungen wurden in der Folge die Zellen bereits in der Vorkultur unter Eisenmangel gezüchtet.

Im Anschluss wurden die Glucose-Aufnahme und die Sekretion von organischen Säuren sowie Aminosäuren in die Kulturüberstände mittels HPLC-Messungen und der pH-Wert der Kulturüberstände bestimmt (Tabelle 6 und Abbildung 15). Die Komplementation durch Expression von *pup* in der Δpup -Mutante bewirkte ein pH-Profil und ein Profil organischer Säuren vergleichbar mit dem WT (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6. Wachstumsparameter, spezifische Glucoseaufnahmerate (sGUR), pH-Werte und Konzentrationen organischer Säuren sowie Aminosäuren in den Kulturüberständen von *C. glutamicum* ATCC 13032 und der Δpup -Mutante nach Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μM Eisen(II)-sulfat). Als Referenz sind die entsprechenden Werte für *C. glutamicum* WT in CGXII-Medium mit Standard-Eisenkonzentration (36 μM) angegeben (Koch-Koerfges *et al.*, 2012). Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen, biologischen Replikaten sowie die Standardabweichung (σ) sind angegeben. Die Maximalwerte der organischen Säuren sowie Alanin sind absolut bzw. im Bezug auf die Zelltrockenmasse (ZTM) angegeben. * Persönliche Kommunikation Michael Vogt (Forschungszentrum Jülich).

Parameter	36 μM Eisen		1 μM Eisen			
	Wildtyp, σ		Wildtyp, σ	Δpup , σ		
End-OD ₆₀₀	63	± 12	27	± 1	6,1	$\pm 0,3$
μ (h ⁻¹)	0,40	$\pm 0,01$	0,36	$\pm 0,01$	0,23	$\pm 0,01$
pH-Wert _{max}	7,5	$\pm 0,1$	7,5	$\pm 0,1$	7,7	$\pm 0,1$
pH-Wert _{min}	5,9	$\pm 0,1$	4,9	$\pm 0,1$	6,9	$\pm 0,1$
sGUR (nmol min ⁻¹ (mg ZTM) ⁻¹)	89,0	$\pm 0,6$	48,7	$\pm 1,0$	25,1	$\pm 1,4$
Finale Glucosekonz., 48 h (mM)	0		36,1	$\pm 1,8$	146	± 5
Acetat _{max} (mM)	14,4	$\pm 4,7$	18,5	$\pm 0,6$	36,7	$\pm 0,7$
Acetat _{max} (mmol (g ZTM) ⁻¹)	0,74	$\pm 0,50$	2,79	$\pm 0,14$	24,1	$\pm 1,0$
Lactat _{max} (mM)	149	± 31	8,32	$\pm 0,86$	0	
Lactat _{max} (mmol (g ZTM) ⁻¹)	13,0	$\pm 5,0$	1,25	$\pm 0,11$	0	
Pyruvat _{max} (mM)	0		128,0	$\pm 0,6$	78,5	$\pm 3,7$
Pyruvat _{max} (mmol (g ZTM) ⁻¹)	0		19,0	$\pm 1,3$	51,4	$\pm 0,5$
Alanin _{max} (mM)	n.d. (~ 1)*		40,8	$\pm 0,3$	16,2	$\pm 1,0$
Alanin _{max} (mmol (g ZTM) ⁻¹)	n.d. (~0,02)*		6,3	$\pm 0,0$	10,6	$\pm 0,1$

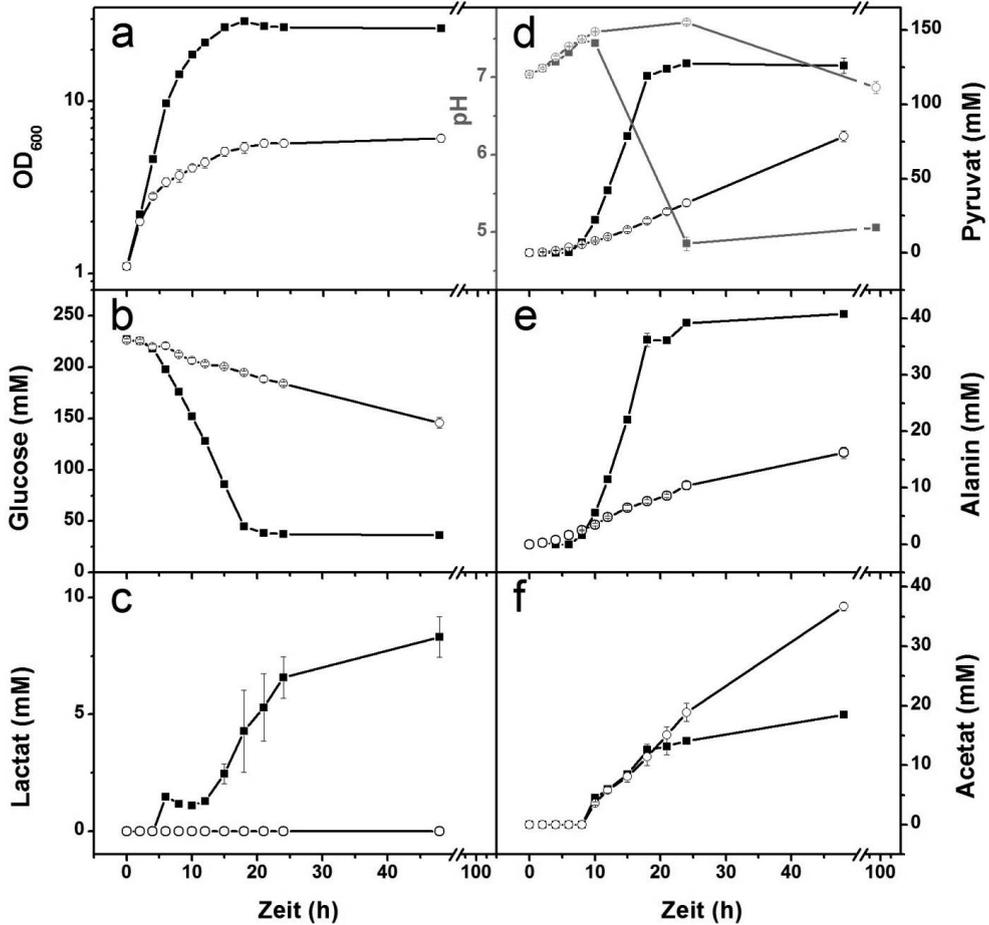


Abbildung 15. (a) Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (gefüllte Quadrate) und der Δpup -Mutante (offene Kreise) sowie die (b) Glucose-, (c) Lactat-, (d) Pyruvatkonzentrationen und der pH-Wert (grau), die (e) Alanin- und (f) Acetatkonzentration in den Kulturüberständen bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der WT wies während der Kultivierung unter Eisenmangel einige Unterschiede im Hinblick auf die Glucose-Aufnahmerate und die sekretierten Säuren im Vergleich zur Kultivierung unter Standard-Eisenkonzentrationen (Koch-Koerfges *et al.*, 2012) auf. Die Glucose-Aufnahmerate war um 45% erniedrigt ($48,7 \pm 1,0$ gegenüber $89,0 \pm 0,6$ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{ZTM}}^{-1}$) und die 222 mM Glucose im Medium wurden nicht vollständig verstoffwechselt, $36,1 \pm 1,8$ mM waren nach 50 h noch im Überstand detektierbar (Abbildung 15b). Dies könnte durch den pH-Wert von 4,8 erklärt werden, der nach 24 h gemessen wurde (Abbildung 15d). *C. glutamicum* hat einen internen pH-Wert von 7,5 und kann effiziente pH-Homöostase nur bei externen pH-Werten zwischen 6 und 9 betreiben (Follmann *et al.*, 2009). Da nach 24 h keine weitere Glucose mehr verbraucht wurde und nur wenig organische Säuren sowie

Aminosäuren produziert wurden, nämlich 4,5 mM Acetat, 2 mM Alanin und 1,7 mM Lactat, ist davon auszugehen, dass der WT aufgrund inhibierter pH-Homöostase metabolisch inaktiv war. Unter Standard-Eisenkonzentrationen produziert der WT sehr viel Lactat, welches auch für die Ansäuerung des Kulturüberstandes verantwortlich ist (Tabelle 6). Die Produktion dieser Säure korreliert mit der Abnahme der Sauerstoffverfügbarkeit ab einer OD_{600} von 7-10 (Koch-Koerfges *et al.*, 2012), da Lactatgärung ein Weg zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten ($NADH$ zu NAD^+) ist, wenn der terminale Elektronenakzeptor Sauerstoff für die Atmungskette limitiert ist. Es fällt auf, dass vom WT unter Eisenmangel vergleichsweise wenig Lactat gebildet wurde, weil dieser vermutlich nicht oder nur geringfügig in die Sauerstofflimitierung kam. Die Zunahme der organischen Säure Pyruvat, welche unter Standardbedingungen nicht sekretiert wird, bis zu einem maximalen Wert von $128,0 \pm 0,6$ mM im Kulturüberstand des WTs korrelierte hier unter Eisenmangel mit der Abnahme des pH-Werts (Abbildung 15d). Die Akkumulation von Pyruvat deutet auf eine Inhibierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDH-Komplex) unter Eisenmangel hin. Der Verlauf der Bildung von Alanin korreliert mit der Bildung von Pyruvat. Sobald nach 8 h Pyruvat sekretiert wurde, wurde auch Alanin sekretiert (Abbildung 15d,e). Es konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum*-Stämme, die hohe Mengen an Pyruvat bilden, einen Teil davon über die Amino transferasen AlaT und AvtA zu Alanin umwandeln (Wieschalka *et al.*, 2012). Zusätzlich sekretierte der WT signifikante Mengen an Acetat (Tabelle 6), welches nicht wieder verstoffwechselt wurde. Die Tatsache, dass Acetat durch den WT nicht wieder aufgenommen wurde, könnte dadurch erklärt werden, dass die Gene der Phosphotransacetylase (*pta*) und der Acetat-Kinase (*ackA*), die wichtig für die Acetat-Verstoffwechslung sind, durch RipA unter Eisenmangel reprimiert werden (Wennerhold *et al.*, 2005). Die Bildung von Acetat könnte bei geringen Aktivitäten von PTA und AK durch die Pyruvat:Chinon-Oxidoreductase, welche Pyruvat zu Acetat umsetzt, katalysiert worden sein (Schreiner *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zum WT verringerte sich der pH-Wert des Kulturüberstandes der Δpup -Mutante nicht, wobei, vermutlich durch die Verstoffwechslung des Ammoniumsulfats oder die Spaltung des Harnstoffs im Medium, der pH-Wert nach 24 h von 7,0 bis auf 7,7 anstieg (Abbildung 15d). Dieser Verlauf könnte erklären, warum die Δpup -Mutante auch nach Erreichen der stationären Phase nach 24 h immer noch metabolisch aktiv war, das heißt, Glucose verbrauchte und weiterhin Pyruvat, Alanin und Acetat produzierte (Abbildung 15d-f). Die Δpup -Mutante produzierte kein Lactat, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass sie aufgrund der niedrigen Zelldichten von $OD_{600} < 10$ nicht sauerstofflimitiert war. Die Glucose-Aufnahmerate war im Vergleich zum WT unter Eisenmangel um annähernd 50% reduziert ($25,1 \pm 1,4$ gegenüber $48,7 \pm 1,0$ $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg_{ZTM}^{-1}$). Auffällig war, dass die Δpup -Mutante im Vergleich zum WT, solange dieser metabolisch aktiv war, bis zu fünfmal mehr

Acetat bezogen auf die Biomasse ($8,4 \pm 0,6$ gegenüber $1,7 \pm 0,1$ $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{ZTM}}^{-1}$) sekretierte (Abbildung 15e).

3.4.3 Untersuchungen des Transkriptoms und des zytosolischen Proteoms der Δpup -Mutante unter Eisenmangel

Im nächsten Schritt sollten die Transkriptome von WT und Δpup -Mutante unter Eisenmangel verglichen werden. Um dabei eventuelle Pupylierungseffekte von Effekten des Eisenmangels unterscheiden zu können, wurde zuerst ein Transkriptomvergleich des WTs in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel ($1 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat) mit dem WT unter Standard-Eisenkonzentrationen ($36 \mu\text{M}$) in der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} = 4-5$) mit DNA-Microarrays durchgeführt. In Tabelle 7 sind alle 66 Gene mit signifikant verändertem mRNA-Spiegel (≥ 2 -fach) unter Eisenmangel mit einem p -Wert $\leq 0,1$ aufgelistet.

Tabelle 7. Ergebnisse der globalen Transkriptomanalysen des *C. glutamicum* WTs unter Eisenmangel im Vergleich zum *C. glutamicum* WT unter Standard-Eisenkonzentrationen nach Kultivierung bis zu einer OD_{600} zwischen 4 und 5. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose mit $36 \mu\text{M}$, bzw. mit $1 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat kultiviert, die Vorkultivierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Hauptkultivierung. Dargestellt sind alle Gene, deren mRNA-Spiegel in drei biologischen Replikaten mindestens 2-fach verändert vorlag (p -Wert $\leq 0,1$). Als statistisch signifikant verändert wurden die Gene angesehen, deren p -Wert $\leq 0,05$ war. Bei Genen, deren p -Wert $0,1 \geq x \geq 0,05$ war, wurde das Verhältnis der mRNA-Spiegel mit einem Sternchen markiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. UE, Untereinheit. CGP1-3, Genomregion der Prophagen 1-3.

Gen-locus	Gen-name	Annotation	mRNA-Verhältnis 1 μM /36 μM
CGP1-, CGP3-Regionen			
cg1513	<i>tnp23a</i>	Transposase ISCG23a, putatives Pseudogen, CGP1	2,90
cg1895		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	2,11
cg1896		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	4,42
cg1897		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	10,97
cg1914		Hypothetisches Protein, CGP3	3,10
cg1918		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	6,13
cg1919		Putatives Membranprotein, CGP3	3,41
cg1921		Hypothetisches Protein, CGP3	2,34*
cg1922		Hypothetisches Protein, CGP3	2,57
cg1963		Putative Superfamilie-II-DNA/RNA-Helicase, CGP3	2,20
cg1970		Hypothetisches Protein, CGP3	2,48
cg1974		Hypothetisches Protein, CGP3	3,79
cg1975		Hypothetisches Protein, CGP3	3,66
cg1977		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	5,38
cg1978		Hypothetisches Protein, CGP3	2,02
cg1980		Putative MoxR-artige ATPase, CGP3	2,00
cg1981		Hypothetisches Protein, CGP3	2,05*
cg1983		Hypothetisches Protein, CGP3	2,17
cg1986		Hypothetisches Protein, CGP3	2,36
cg1987		Hypothetisches Protein, CGP3	2,09
cg1999		Hypothetisches Protein, CGP3	2,42
cg2004		Hypothetisches Protein, CGP3	2,83
cg2008		Putatives Membranprotein, CGP3	3,16
cg2014		Hypothetisches Protein, CGP3	4,51
cg2016		Hypothetisches Protein, CGP3	3,37
cg2017		Hypothetisches Protein, CGP3	2,79

Gen-locus	Gen-name	Annotation	mRNA-Verhältnis 1 µM/36 µM
cg2022		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	2,89*
cg2023		Putatives Membranprotein, CGP3	2,96*
cg2061	<i>psp3</i>	Putatives, sekretiertes Protein, CGP3	0,45
cg4005		Putatives, sekretiertes Protein, CGP1	2,48
Eisen-Homöostase und DtxR-Regulon			
cg0052		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Permease-Protein	0,49
cg0769		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Permease-UE	2,77
cg0771	<i>irp1</i>	Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	2,20
cg0922		Putatives, sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	2,20
cg0924		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Substrat-bindendes Lipoprotein	2,12*
cg0927		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Permease-UE	2,08*
cg3404		Putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), Substrat-bindendes Lipoprotein	2,33
Transporter			
cg1377	<i>ssuC</i>	Transmembran-ABC-Transporterprotein für aliphatische Sulfonate, UE 2	2,27
cg1447	<i>zrf</i>	Zink-Exporter	2,53
cg2256		Putatives ABC-Typ-Multidrug-/Daunorubicin-Transportsystem, ATPase-Komponente	0,49
cg2911	<i>znuA1</i>	Sekretiertes Mn/Zn-bindendes Lipoprotein-Oberflächenadhesin des Znu1-Zinkimporters	0,48*
cg3026	<i>mrpD2</i>	UE 3 des Na ⁺ /K ⁺ /H ⁺ -Antiporters Mrp2	2,08
cg3226		L-Lactat-Permease	3,25
cg3353	<i>nagT</i>	Gentisat-Transporter	0,50
Weitere Proteine mit bekannter Funktion			
cg0104	<i>codA</i>	Creatinin-Desaminase	0,48
cg0182	<i>tagA2</i>	DNA-3-Methyladenin-Glycosylase-I-Protein	0,41*
cg0341	<i>fadD1</i>	Putative Fettsäure-CoA-Ligase, Transmembranprotein	0,43
cg0640	<i>fdxB</i>	Ferredoxin Nr. 2, Eisen-Schwefel-Cluster	0,18*
cg1320	<i>lipP</i>	Lipase	0,45
cg1369	<i>atpC</i>	ε-UE des F ₁ -Teils der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase	2,05
cg2461	<i>tnp4a</i>	Transposase ISCG4a	0,45*
cg2637	<i>benA</i>	Benzoat-1,2-Dioxygenase, α-UE	0,44
cg2804	<i>tnp21a</i>	Transposase ISCG21a	0,45
cg3297	<i>tnp19b</i>	Transposase ISCG19a-Fragment, putatives Pseudogen	0,50
Proteine mit unbekannter Funktion			
cg0073		Putative Sulfurtransferase, enthält RHOD-Domäne	0,47*
cg0079		Putatives, sekretiertes Protein	0,47
cg0255		Hypothetisches Protein	0,45
cg0256		Hypothetisches Protein	0,47*
cg0713		Hypothetisches Protein	2,19
cg1279		Putatives, sekretiertes Protein	2,26
cg2268		Putativer Transkriptionsregulator, LysR-Familie	0,50*
cg2449		Putatives Protein, involviert in SOS- und Stress-Antwort	2,09*
cg2511		Putatives Membranprotein, enthält CBS-Domäne	2,35
cg2756		Hypothetisches Protein	0,43
cg3103		Hypothetisches Protein	0,32
cg3243		Putative RecB-Familie-Nuclease	0,49*

Die auffälligste Beobachtung war, dass unter Eisenlimitierung anscheinend die Expression der Gene, die im Bereich des Prophagen CGP3 und, in geringerem Umfang, auch von CGP1 liegen, im WT induziert waren. Diese machten fast die Hälfte (46%) der veränderten Gene aus. Es wurde gezeigt, dass erhöhte intrazelluläre Eisenmengen, die in einer *ΔdtxR*-Mutante vorliegen, für eine Induktion des CGP3-Prophagen verantwortlich sind (Frunzke *et al.*, 2008).

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die mRNA-Spiegel von Genen des DtxR- oder RipA-Regulons unter Eisenmangel verändert sind (Kapitel 3.4.2). Insgesamt sechs Gene, die durch DtxR reguliert sind, schienen zwischen 2- und 2,8-fach erhöht, das sind jedoch nur 10% des DtxR-Regulons (Tabelle 7). Das könnte daran liegen, dass die Zellen nach Eisenmangelbedingungen am Ende der Vorkultur das frische Eisen(II) aus der Hauptkultur aufgenommen hatten, wodurch kurzfristig intrazellulär Eisenüberschuss herrschte und der Prophage CGP3 induziert wurde. Erst im Laufe der Kultivierung verringerten sich die intrazellulären Eisenkonzentrationen und eine geringe Eisenmangelantwort bildete sich aus. Die Transkriptmengen zweier weiterer Gene, die in die Eisenhomöostase involviert sein könnten, schienen 2- und 5,5-fach erniedrigt, nämlich die Gene für einen weiteren putativen Eisen-Transporter (cg0052) bzw. für das Ferredoxin FdxB, für die keine DtxR-abhängige Regulation bekannt ist. Die übrigen Gene des putativen Operons cg0645-cg0637, in dem sich *fdxB* befindet, wiesen jedoch keine veränderten mRNA-Spiegel auf. Der Hauptteil der restlichen regulierten Gene betraf Transportproteine sowie einzelne Komponenten von Stoffwechselwegen, wie Creatinin- oder Benzoatstoffwechsel (Tabelle 7). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass deutlich geringere Effekte auf transkriptioneller Ebene im WT unter Eisenmangel in der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten waren als bei den Transkriptomanalysen von $\Delta dtxR$ -Mutanten (Brune *et al.*, 2006, Wennerhold & Bott, 2006).

Schließlich wurden die mRNA-Spiegel der Δpup -Mutante und des WTs nach 2 h unter Eisenmangel mittels DNA-Microarrays verglichen ($OD_{600} = 3$; Abbildung 14b). Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da nach 2 h der Unterschied in den Zelldichten zwischen den beiden Stämmen noch nicht signifikant war. So sollten die Auswirkungen auf das Transkriptom, verursacht durch den Wachstumsdefekt der Mutante, minimiert werden. Die hier diskutierten Unterschiede in den Transkriptomen zeigt Tabelle 8, für eine komplette Liste siehe Tabelle A10 im Anhang. Insgesamt waren die mRNA-Spiegel von 125 Genen signifikant (2-fach, p -Wert $\leq 0,05$) verändert. Im Gegensatz zum WT (Tabelle 7) waren in der Δpup -Mutante die mRNA-Spiegel von 15 der 19 Gene des RipA-Regulons sowie 34 der 63 Gene des DtxR-Regulons (Wennerhold *et al.*, 2005, Wennerhold & Bott, 2006) signifikant verändert. Zu den Genen, die in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT mehr als 3-fach erhöht waren, gehörten DtxR-regulierte Eisen-/Hämtransporter und RipA, sowie ArgR-regulierte Gene der Argininbiosynthese und Gene des Thiaminstoffwechsels (Tabelle 8), deren Expression bis auf wenige Ausnahmen erhöht war.

Die mRNA-Spiegel jener sechs Komponenten von Eisentransportern (Tabelle 7), die im WT unter Eisenmangel erhöht schienen, waren in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT unter Eisenmangel nochmals mehr als 3-fach erhöht. Die erhöhte Expression von Genen der Thiaminbiosynthese könnte mit oxidativem Stress in der Δpup -Mutante zusammenhängen,

da Thiamin als Antioxidans wirken kann (Abigail Koch-Körfges, persönliche Kommunikation), oder sie könnte ein Indiz für einen Mangel an Thiaminpyrophosphat (TPP), einem wichtigen Cofaktor des PDH-Komplexes sein (Schreiner *et al.*, 2005). Allerdings waren keine anderen Gene, die auf oxidativen Stress hinweisen (z.B. *katA*, *sod*), verstärkt exprimiert und auch die Expression der Gene des PDH-Komplexes, *aceE*, *aceF* oder *lpdA*, war unverändert.

Tabelle 8. Ergebnisse der globalen Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* Δ pup im Vergleich zum *C. glutamicum* WT nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat) bei einer OD₆₀₀ von 3. Dargestellt ist eine Auswahl von Genen, deren mRNA-Spiegel in der Δ pup-Mutante im Vergleich zum WT mindestens 2-fach verändert vorlag und einen *p*-Wert $\leq 0,1$ aufwiesen. Die vollständige Liste findet sich in Tabelle A10 im Anhang. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Als statistisch signifikant verändert wurden Gene angesehen, deren *p*-Wert $\leq 0,05$ war. Bei Genen, deren *p*-Wert $\geq 0,05$ war, wurde das Verhältnis der mRNA-Spiegel mit einem Sternchen markiert. Zur Vervollständigung von Operons oder Biosynthesewegen sind auch Gene, die nicht signifikant verändert waren oder nur in 2 Experimenten auswertbar waren, angeführt. Die mRNA-Spiegel dieser sind kursiv dargestellt. Genlocus-Namen in fett sind Pupylierungsziele in *C. glutamicum* (Tabelle 5).

Genlocus	Gen-name	mRNA-Spiegel Δ pup/WT	Genlocus	Gen-name	mRNA-Spiegel Δ pup/WT	Genlocus	Gen-name	mRNA-Spiegel Δ pup/WT
DtxR-regulierte Gene			RipA-regulierte Gene			Aminosäurebiosynthese		
cg0159		2,28	cg0310	<i>katA</i>	0,16	cg0961		0,45
cg0160		15,60	cg0445	<i>sdhC</i>	0,39	cg1129	<i>aroF</i>	2,38
cg0405		3,01	cg0446	<i>sdhA</i>	0,32	cg1432	<i>ilvD</i>	0,41*
cg0465		5,27	cg0447	<i>sdhB</i>	0,39	cg1435	<i>ilvB</i>	0,42*
cg0466	<i>htaA</i>	4,74	cg0448		0,64	cg1436	<i>ilvN</i>	0,41
cg0467	<i>hmuT</i>	5,08	cg1341	<i>narI</i>	0,33	cg1437	<i>ilvC</i>	0,82*
cg0468	<i>hmuU</i>	2,85	cg1342	<i>narJ</i>	0,32	cg1580	<i>argC</i>	2,45
cg0469	<i>hmuV</i>	1,98	cg1343	<i>narH</i>	0,39	cg1581	<i>argJ</i>	3,43
cg0470	<i>htaB</i>	15,19	cg1344	<i>narG</i>	0,37	cg1582	<i>argB</i>	3,79
cg0471	<i>htaC</i>	10,17	cg1345	<i>narK</i>	0,48*	cg1583	<i>argD</i>	5,09
cg0527	<i>glyR</i>	3,23*	cg1487	<i>leuC</i>	0,43	cg1584	<i>argF</i>	3,29
cg0589		4,96	cg1488	<i>leuD</i>	0,51	cg1585	<i>argR</i>	2,88
cg0590		8,02	cg1737	<i>acn</i>	0,16	cg1586	<i>argG</i>	1,49*
cg0591		4,17	cg1738	<i>acnR</i>	0,55*	cg1588	<i>argH</i>	1,82
cg0767		2,23	cg1739	<i>gat</i>	1,89	cg1701	<i>metH</i>	2,25
cg0768		4,06	cg2636	<i>catA1</i>	0,35*	cg2334	<i>ilvA</i>	0,92*
cg0769		6,49	cg3047	<i>ackA</i>	0,40*	cg2418	<i>ilvE</i>	1,16*
cg0770		2,67	cg3048	<i>pta</i>	0,34*	Transporter		
cg0771	<i>irp1</i>	5,50	Thiaminstoffwechsel			cg0506		0,42
cg0921		2,26	cg1227	<i>ykoE</i>	6,87	cg0507		0,39
cg0922		5,81	cg1228	<i>ykoD</i>	2,37*	cg0701		2,08
cg0924		5,23	cg1229	<i>ykoC</i>	7,38	cg0737		2,25
cg0926		3,55	cg1476	<i>thiC</i>	10,08	cg1169	<i>metP</i>	0,39
cg0927		3,46	cg1495	<i>thiL</i>	0,93*	cg1299	<i>cydD</i>	0,31
cg1120	<i>ripA</i>	6,91	cg1654	<i>thiD1</i>	2,47	cg1419		3,57
cg1418		2,16	cg1655	<i>thiM</i>	2,02	cg2181	<i>oppA</i>	0,30
cg1930		6,88	cg2236	<i>thiE</i>	2,14	cg2182	<i>oppB</i>	0,38
cg1931		5,17	cg2237	<i>thiO</i>	2,86	cg2183	<i>oppC</i>	5,35
cg2234		3,31	cg2238	<i>thiS</i>	3,16	cg2184	<i>oppD</i>	2,86
cg2445	<i>hmuO</i>	2,16	cg2239	<i>thiG</i>	3,63	cg2610		0,37
cg2782	<i>ftn</i>	0,43*	cg2240	<i>thiF</i>	3,33	cg2675		2,28
cg3156	<i>htaD</i>	10,37	cg2561	<i>thiX</i>	1,00*	cg2676		2,96
cg3404		3,77	cg3409	<i>thiD2</i>	0,93*	cg2677		2,58
			Aminosäurebiosynthese			cg3216	<i>gntP</i>	0,45
			cg0755	<i>metY</i>	2,22			

Im Vergleich zum WT waren in der Δpup -Mutante die mRNA-Spiegel von RipA-regulierten Genen (z.B. *katA*, *acn*, *sdhB*, *narJI*), Genen des Propionatmetabolismus (*prpB2C2D2*), Untereinheiten von Transportern (*oppA*, *cydD*) und außerdem noch cg1612, das für eine putative Acetyltransferase kodiert, sowie cg3195, das für eine putative Flavin-enthaltende Monooxygenase kodiert, mehr als 3-fach erniedrigt. Der Gencluster *oppABCD* war der einzige, der, im Vergleich zu den Transkriptomanalysen unter Standard-Eisenkonzentrationen, unter Eisenmangel ebenfalls in der Δpup -Mutante gegenüber dem WT verändert schien (Kapitel 3.1). Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieses Transkriptomvergleichs dafür, dass in *C. glutamicum* Δpup geringere intrazelluläre Eisenkonzentrationen vorgelegen hatten, da die Δpup -Mutante eine deutlich stärkere transkriptionelle Antwort vermittelt durch DtxR und RipA als der WT auf den Eisenmangel aufwies.

In Bezug auf das *pup*-Gencluster mit den Genen *arc*, *dop*, *pup* und *pafABC* konnten in den Transkriptomvergleichen unter Eisenmangel keine Unterschiede in den Transkriptmengen zwischen den getesteten Stämmen gefunden werden, mit Ausnahme des mRNA-Spiegels von *pup*, der in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT erwartungsgemäß erniedrigt war (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass (i) unter den getesteten Bedingungen keine veränderte Expression der Gene des *pup*-Genclusters vermittelt durch Transkriptionsregulatoren stattfand und dass (ii) die Deletion von *pup* keine detektierbaren Auswirkungen auf die Expression der restlichen Gene des *pup*-Genclusters hatte. Es konnte in der Δpup -Mutante keine signifikante Veränderung von mRNA-Spiegeln puylierter Proteine (Tabelle 5) unter Eisenmangel festgestellt werden, der unabhängig von einer DtxR-/RipA-Regulation war (siehe fett geschriebene Genlocus-Nummern in Tabelle 8). Aufgrund der Tatsache, dass Pupylierung eine posttranslationale Modifikation ist, war nicht zu erwarten, dass die mRNA-Spiegel von Pup-Zielproteinen verändert waren; deshalb wurde im Anschluss das zytosolische Proteom der Δpup -Mutante mit dem des WTs unter Eisenmangel verglichen.

Dazu wurden die Zellen unter Eisenmangel bei gleicher OD_{600} (4-5) geerntet, also zu einem Zeitpunkt, an dem das Wachstum zwischen den beiden Stämmen bereits sehr unterschiedlich war (Abbildung 15) und größere Unterschiede im Proteom zu erwarten waren. Der Vergleich der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Rohextrakte von WT und Δpup -Mutante wurde mittels 2D-DIGE über einen pH-Bereich von 4 bis 7 durchgeführt (Kapitel 2.10.2). Siebenundzwanzig Proteinspots konnten in der Mutante als signifikant (> 2 -facher Unterschied der Proteinmengen, p -Wert $\leq 0,05$) verändert zum WT gefunden werden. Diese Spots wurden aus den Gelen ausgeschnitten und einer Peptidmassen-Fingerprint-Analyse durch MALDI-TOF-MS unterzogen (Tabelle A4 im Anhang). Tabelle 9 zeigt jene 20 signifikant veränderten Proteinspots, die identifiziert werden konnten.

Tabelle 9. Vergleich des zytosolischen Proteoms der Δpup -Mutante im Vergleich mit dem *C. glutamicum* WT nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Die Proteine wurden mittels 2D-DIGE in drei biologischen Replikaten über einen pH-Bereich von 4 bis 7 getrennt und anschließend signifikant (≥ 2 -fach, p -Wert $\leq 0,05$) veränderte Proteinspots über Peptidmassen-Fingerprint identifiziert. Es sind die Spotnummern (siehe Gelbild Abbildung A3 im Anhang), die Genlocus-Nummer, die Annotation und das Verhältnis der Proteinmengen von Δpup -Mutante im Vergleich zum WT gezeigt. Außerdem ist angeführt, ob das jeweilige Transkript in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT unter Eisenmangel verändert war (Tabelle 8) und ob am entsprechenden Protein eine Pupylisierung detektiert wurde (x, Tabelle 5) oder es als Kandidat für eine Pupylisierung gilt (o, Tabelle A8 im Anhang). Werte mit Sternchen hatten einen p -Wert $\geq 0,05$. Proteine, deren veränderte Proteinmenge in der Δpup -Mutante mit einer signifikanten (fett gedruckter Genlocus) oder nicht-signifikanten (kursiv gedruckter Genlocus) Veränderung ihrer Transkriptmenge korrelierte, sind gekennzeichnet.

Spot Nr.	Genlocus	Protein	Annotation	Proteingehalt Δpup /WT	mRNA-Spiegel Δpup /WT	Pup-Zielprotein
1	Cg2445	HmuO	Häm-Oxygenase	4,12	2,16	
2	Cg3118	CysI	Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein	3,37	1,36	x
3	Cg3404		putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), Substrat-bindendes Lipoprotein	2,81	3,77	
4	Cg1458	Odx	Oxalacetat-Decarboxylase	2,79	0,71*	
5	Cg3340	DadA	Putative D-Aminosäure-Dehydrogenase	2,70	1,09*	
6	Cg1476	ThiC	Thiamin-Biosynthese Protein	2,63	10,08	
	Cg1606	PyrG	CTP-Synthetase		1,02*	
7	Cg0400	AdhC	Alkohol-Dehydrogenase, Klasse C	2,32	0,97*	
8	Cg0648	Adk	Adenylat-Kinase	2,14	1,07*	
9	Cg1246		Putatives Membranprotein	2,10	1,30*	
10	<i>Cg1337</i>	Hom	Homoserin-Dehydrogenase	2,09	1,57	
11	<i>Cg1432</i>	IlvD	Dihydroxysäure-Dehydratase	0,49	0,41*	
12	<i>Cg0572</i>	RplJ	50S ribosomales Protein L10	0,48	0,64*	
13	<i>Cg1432</i>	IlvD	Dihydroxysäure-Dehydratase	0,47	0,41*	
14	Cg0310	KatA	Katalase	0,45	0,16	o
15	Cg3195		Putative Flavin-enthaltende Monooxygenase FMO	0,43	0,24	
16	Cg0446	SdhA	Succinat:Menachinon-Oxidoreductase, Flavoprotein Untereinheit	0,42	0,32	
17	Cg0310	KatA	Katalase	0,42	0,16	o
18	Cg3118	CysI	Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein	0,38	1,36	x
19	Cg3118	CysI	Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein	0,36	1,36	x
20	<i>Cg2782</i>	Ftn	Ferritin	0,32	0,43*	x

Es wurde beobachtet, dass einige Proteine, deren Expression in den DNA-Microarrays in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT verändert war, auch einen veränderten Proteingehalt aufwiesen. Bei den Proteinen HmuO, Cg3404, KatA, Fmo und SdhA verursachte eine signifikante Erhöhung bzw. Erniedrigung der mRNA-Spiegel anscheinend auch eine signifikant vermehrte bzw. verminderte Translation der jeweiligen mRNA (fett geschriebene Genlocus-Nummern in Tabelle 9). Ähnliches gilt für Hom, IlvD, RplJ und Ftn, allerdings war bei diesen Proteinen die Veränderung der mRNA-Spiegel nicht signifikant (kursive Genlocus-Nummern in Tabelle 9). Im Spot 6 wurden sowohl die CTP-Synthetase PyrG als auch das Thiamin-Biosynthese Protein ThiC identifiziert, jedoch scheint es wahrscheinlicher, dass ThiC erhöht

vorlag, da der mRNA-Spiegel von *thiC* in den DNA-Microarrays auch stark (> 10-fach) erhöht war. Für Cysl wurden insgesamt drei Spots (Nummern 2, 18 und 19) gefunden, deren Proteinmengen sich in *C. glutamicum* Δpup vom WT unter Eisenmangel unterschieden und sowohl erhöht als auch erniedrigt erschienen (Abbildung A3 im Anhang). Da Cysl sowohl eine Hämgruppe als auch einen Eisen-Schwefel-Cluster besitzt, könnten diese Unterschiede durch unterschiedliche Beladung mit Häm/Eisen zustande kommen: Spot 2 besaß eine apparente Größe von < 65 kDa (kleiner als ThiC und IlvD) und einen apparenten isoelektrischen Punkt (pI) von 5,6 (vergleichbar mit RplJ, Abbildung A3 im Anhang). Spot 18 erschien in etwa gleich groß wie Spot 2, jedoch war der apparente pI zwischen 5,4 und 5,5 (zwischen SdhA und ThiC/PyrG). Spot 19 erschien ca. 2 kDa kleiner als Spot 2 bzw. 18, der apparente pI entsprach etwa dem von ThiC/PyrG (pI = 5,5).

Im Hinblick auf eine mögliche Funktion der Pupylierung könnten vor allem Proteine interessant sein, deren Mengen in der Δpup -Mutante im Vergleich zum WT erhöht waren, ohne dass ihre Transkripte verändert waren, was für einen fehlenden Abbau durch Pup sprechen könnte, sofern die Pupylierung in *C. glutamicum* auch ein Signal für Proteolyse ist. Das würde Odx, DadA, AdhC, Adk und Cg1246 zu interessanten Kandidaten machen (Tabelle 9). Von keinem dieser Proteine wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit ein pupyliertes Peptid gefunden (Kapitel 3.2.2).

3.4.4 Deletionsmutanten der Depupylyase *dop* und der ATPase *arc* unter Eisenmangel

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Pup bzw. funktionierende Pupylierung in *C. glutamicum* unter Eisenmangel zu starken Wachstumsdefekten (Abbildung 14) sowie weitreichenden Veränderungen im Transkriptom (Tabelle 8), wie auch im zytosolischen Proteom (Tabelle 9) führte. Daher stellte sich nun die Frage, ob auch (i) die Depupylierung durch Dop und (ii) die Erkennung von Pup über die AAA+-ATPase ARC eine Rolle unter Eisenmangel spielen. Im Fall von Dop sollte dies Aufschluss darüber geben, ob in einem Actinobakterium, das Pup mit C-terminalem GGE exprimiert und daher keine Aktivierung von Pup über Desamidierung notwendig ist, Dop *in vivo* trotzdem benötigt wird, und zwar als Depupylyase. Im Fall von ARC sollte untersucht werden, ob die proteasomale ATPase ARC in einem Actinobakterium ohne Proteasom trotzdem von Bedeutung für pupylierte Proteine ist (Abbildung 8). Dazu wurden die *in-frame*-Deletionsmutanten *C. glutamicum* Δdop bzw. Δarc (Kapitel 3.1) wie zuvor die Δpup -Mutante unter Eisenmangel kultiviert. Die beiden Mutanten zeigten unter Eisenmangel auch ein verschlechtertes Wachstum im Vergleich zum WT (Abbildung 16).

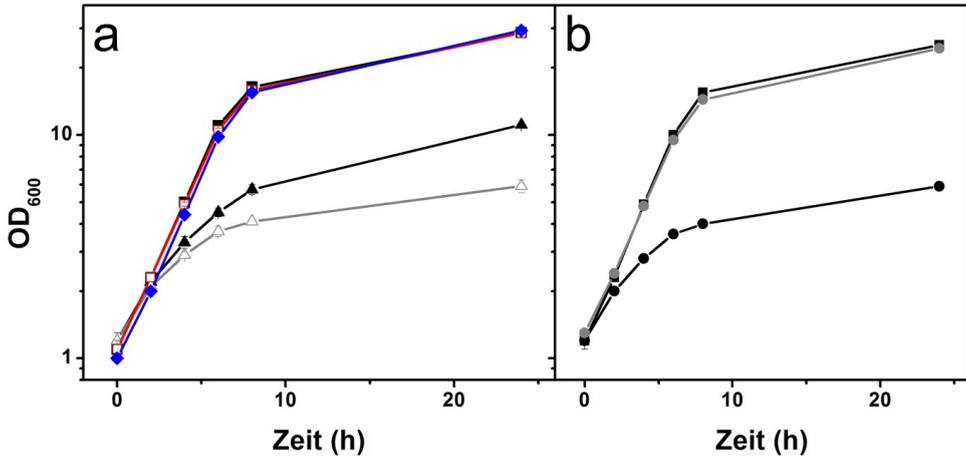


Abbildung 16. Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (schwarze Quadrate) und (a) der $\Delta d\text{op}$ -Mutante mit pVWEx1 (schwarze, gefüllte Dreiecke), mit pVWEx1-*dop* (graue, offene Dreiecke), mit pVWEx1-*dop* ohne Induktion (rote, offene Quadrate) und mit pVWEx1-*pup* (blaue, geschlossene Karos) oder (b) der Δarc -Mutante mit pVWEx1 (schwarze, gefüllte Kreise) bzw. pVWEx1-*arc*-Strep (graue Kreise) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μM Eisen(II)-sulfat). Stämmen mit Expressionsplasmiden wurden 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und, wenn nicht anders vermerkt, 1 mM IPTG zur Induktion der Genexpression zugesetzt. Die Messungen stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten dar.

Die $\Delta d\text{op}$ -Mutante erreichte rund 52% der finalen Biomasse des WT's (Abbildung 16a) bei einer verringerten Wachstumsrate von $0,27 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $0,38 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ für den WT. Im Vergleich zur Δpup -Mutante, die nur 23% der finalen Biomasse des WT's erreichte, hatte die Deletion der Depupylase einen geringeren, aber immer noch sehr deutlichen Einfluss auf das Wachstum unter Eisenmangel. Eine Plasmid-basierte Expression von *dop* in der *dop*-Deletionsmutante mit Induktion des *tac*-Promotors durch 1 mM IPTG führte interessanterweise zu einer nochmals verringerten finalen OD_{600} von $5,9 \pm 0,4$. Wenn jedoch der $\Delta d\text{op}$ -Stamm mit Plasmid-basierter Expression von *dop* ohne Induktion mit IPTG kultiviert wurde, erreichten Biomasse und Wachstumsrate wieder WT-Niveau (Abbildung 16a). Dazu ist anzumerken, dass P_{tac} eine basale Genexpression ohne den Induktor IPTG zulässt, da er durchlässig (engl. *leaky*) ist (Castagnoli *et al.*, 1993). Die Komplementation der *dop*-Deletion war also anscheinend sehr stark abhängig von der Menge an *dop*-Transkript. Dieser Effekt wurde für keines der anderen an der Pupylierung beteiligten Gene beobachtet und könnte dadurch erklärt werden, dass die Depupylierung dazu dient, einen Pool an freiem Pup aufrecht zu erhalten, ohne dass *pup*-Expression stattfindet. Es scheint demnach wichtig, dass Pup auch wieder von den Zielproteinen abgespalten wird. Wenn durch die Deletion von *dop* tatsächlich zu wenig freies Pup zur Verfügung stand, dann müsste die Plasmid-basierte Expression von *pup* in $\Delta d\text{op}$ wieder zu einem mit dem WT vergleichbaren Wachstum führen. Wie in Abbildung 16a gezeigt, erreichte eine $\Delta d\text{op}$ -Mutante mit dem Plasmid pVWEx1-*pup*

tatsächlich wieder eine finale OD_{600} ($29,4 \pm 0,2$) und Wachstumsrate ($\mu = 0,38 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$), die vergleichbar zum WT waren.

Eine Deletion von *arc* wirkte sich in *C. glutamicum* ähnlich stark auf das Wachstum aus wie von *pup*: Die Δarc -Mutante erreichte nur 27% der End- OD_{600} des WTs unter Eisenmangel (Abbildung 16b). Die Plasmid-basierte und IPTG-induzierte Expression von *arc* in der Δarc -Mutante stellte wieder Wachstum auf Niveau des WTs her. Das spricht dafür, dass, was auch immer mit pupylierten Proteinen in *C. glutamicum* unter Eisenmangel passiert, ARC dafür genauso wichtig scheint wie Pup. Das wiederum könnte bedeuten, dass die Pupylierung alleine noch keinen Effekt hat, sondern erst die anschließende Erkennung und/oder Entfaltung des pupylierten Proteins durch ARC. Deshalb wurde im Anschluss noch versucht, N-terminal Heptahistidin-getaggttes ARC-Protein unter Eisenmangel nativ über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie zu reinigen. Dadurch sollten eventuell nicht-kovalent gebundene, aber mit ARC interagierende Proteine identifiziert werden, die Hinweise auf das Schicksal pupylierter Proteine geben könnten.

3.4.5 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von ARC unter Eisenmangel

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von ARC wurde *arc* über das Plasmid pVWEx1-7xHis-*arc* in *C. glutamicum* Δarc unter Eisenmangel exprimiert, die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und 7xHis-ARC durch Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie angereichert (Abbildung 17). Dabei wurde ein Zielprotein der Pupylierung, der Elongationsfaktor G (FusA, Tabelle 5) gefunden. Um mehr über die Funktion von ARC herauszufinden, erschienen die Zentralstoffwechsellzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPc), Galactokinase und Phosphofructo-Kinase (PFK), zumal sie auch nicht pupyliert waren (Tabelle 5), weniger interessante Kandidaten für eine Interaktion mit ARC als die putativen Aminopeptidasen PepQ (Cg1826) und PepC (Cg1693), da Peptidasen womöglich die Funktion des Proteasoms einnehmen könnten. Zudem befindet sich das Gen *pepC* nur durch ein Gen getrennt stromaufwärts von *arc* (cg1691). Um einen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und der Pupylierung zu finden, wurden deshalb *in-frame*-Deletionsmutanten von beiden Genen hergestellt und unter Eisenmangel kultiviert. Allerdings wuchsen sowohl die $\Delta pepQ$ - als auch die $\Delta pepC$ -Mutante vergleichbar zum WT unter Eisenmangel, sowohl im Bezug auf die finale OD_{600} (zwischen 34,8 und 35,5) als auch auf die Wachstumsrate (μ zwischen 0,38 und 0,39 h^{-1}). Das spricht dafür, dass PepC und PepQ nicht relevant für die Funktion der Pupylierung unter Eisenmangel sind. Ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen Peptidasen und der Pupylierung bleibt noch zu untersuchen. Eventuell führt auch erst die Deletion beider Peptidasen zu einem Wachstumsdefekt.

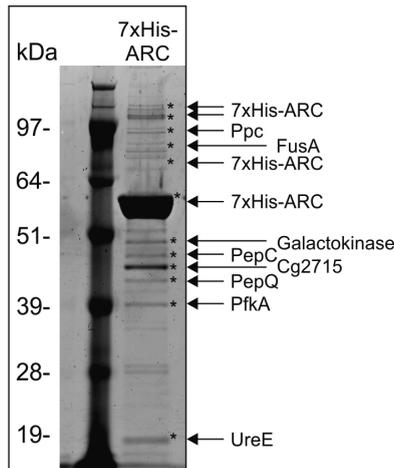


Abbildung 17. *In vivo* Co-Reinigungsexperiment mit der AAA+-ATPase ARC in *C. glutamicum*. *C. glutamicum* Δ arc pVWEx1-7xHis-arc wurde in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M FeSO₄) kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. 7xHis-ARC wurde aus Proteinrohextrakt über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie nativ gereinigt. Gezeigt ist das konzentrierte Eluat dieser Reinigung aufgetragen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel, gefärbt mit Coomassie. Links sind die Größen des Protein-Standards in kDa angegeben. Es wurden alle sichtbaren Banden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-Peptidmassen-Fingerprint-Analyse identifiziert (Tabelle A5 im Anhang). Gezeigt ist eines von zwei biologischen Replikaten. Die identifizierten Banden (*) waren wie folgt: 7xHis-ARC (Cg1691; 59,1 kDa); hypothetisches Protein Cg2715 (42,3 kDa); FusA, Elongationsfaktor G (Cg0583; 77,9 kDa); Galactokinase (Cg2452; 46,3 kDa); PepC, putative Aminopeptidase (Cg1693; 44,9 kDa); PepQ, putative Aminopeptidase (Cg1826; 38,9 kDa); PfkA, Phosphofruktokinase (Cg1409; 37,1 kDa); Ppc, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Cg1787; 103,2 kDa); UreE, akzessorisches Protein der Urease (Cg0116; 17,6 kDa).

3.5 Die pupylierten Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps

Die bisher gezeigten Ergebnisse werfen die Frage auf, woran es liegen könnte, dass die Pupylieung ausgerechnet unter Eisenlimitierung für *C. glutamicum* wichtig ist. Wie in Kapitel 3.4.2 erwähnt, waren einige Proteine pupyliert, die entweder Eisen-abhängig oder in die Speicherung von Eisen involviert sind. Eine naheliegende Vorstellung ist, dass die Pupylieung einen Einfluss auf die Speicherproteine Ftn und Dps hat.

3.5.1 Charakterisierung von Deletionsmutanten der Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps

Bevor weitere Untersuchungen zur Pupylieung von Ftn und Dps unter Eisenmangel gestartet wurden, sollten zuerst die zwei Eisenspeicherproteine charakterisiert werden. Eisenspeicherproteine kommen in Pro- und Eukaryoten vor und haben mindestens zwei wichtige Aufgaben (Andrews *et al.*, 2003). Einerseits speichern die Oligomere dieser Proteine, die eine kugelförmige Struktur ausbilden, in ihrem Inneren Eisen, um dieses, wenn die extrazellulären Mengen an Eisen gering sind, wieder freizugeben. Andererseits dienen diese Speicherproteine auch dem Schutz der Zelle vor freiem Eisen. Zuviel freies Eisen kann über die Fenton-Reaktion ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) unter aeroben Bedingungen die Bildung von Sau-

erstoffradikalen begünstigen (Bou-Abdallah, 2010). Deshalb schützen die Speicherproteine die Zelle durch Bindung von freiem, intrazellulärem Eisen. Für die weiteren Untersuchungen wurden daher die *in-frame*-Deletionsmutanten *C. glutamicum* Δftn und Δdps sowie eine $\Delta ftn\Delta dps$ -Doppeldeletionsmutante hergestellt. Die Deletionen von *ftn* und *dps* waren ohne Probleme möglich (Kapitel 2.6.11; Verhältnis der Klone nach der zweiten Rekombination: WT: Δftn 5:3, WT: Δdps 3:3, Δftn : $\Delta ftn\Delta dps$ 3:5). Zunächst wurde das Wachstum dieser Mutanten in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose untersucht. Mit Wachstumsraten zwischen $0,42$ - $0,44\text{ h}^{-1}$ und finalen OD_{600} -Werten zwischen $58,0$ und $59,2$ war das Wachstum aller drei Deletionsmutanten vergleichbar mit dem des WTs (Daten nicht gezeigt). Bei Eisenüberschuss in CGXII-Minimalmedium mit $150\ \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat gab es keinen Unterschied zwischen den Mutanten und dem WT (End- OD_{600} zwischen $56,4$ und $57,5$, Wachstumsraten bei $0,47$ - $0,48\text{ h}^{-1}$). Unter Eisenmangel in CGXII-Glucose-Minimalmedium mit $1\ \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat wuchsen sowohl die Δdps - als auch die Δftn -Mutante vergleichbar zum WT, während die $\Delta ftn\Delta dps$ -Mutante einen Wachstumsdefekt mit einer leicht reduzierten Wachstumsrate ($0,29 \pm 0,01\text{ h}^{-1}$ gegenüber $0,32 \pm < 0,01\text{ h}^{-1}$) sowie finale OD_{600} ($27,6 \pm 1,8$ gegenüber $31,8 \pm 1,7$) im Vergleich zum WT aufwies.

Im Hinblick auf Untersuchungen in *E. coli* (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999) und *M. tuberculosis* (Pandey & Rodriguez, 2012) zu Eisenspeicherproteinen sind diese Ergebnisse erstaunlich, da in *C. glutamicum* erst die Deletion von *ftn* und *dps* zusammen unter Eisenmangel zu einer um 10% reduzierten Wachstumsrate sowie einer um 12% reduzierten OD_{600} im Vergleich zum WT führte. Eventuell konnte unter den getesteten Bedingungen das jeweils andere Eisenspeicherprotein das fehlende ersetzen. In *M. tuberculosis* führte die Deletion des Ferritins *bfrB* unter Eisenüberschuss zu einem vergleichbar schlechten Wachstum wie unter Eisenmangel (Pandey & Rodriguez, 2012), wohingegen keine der Deletionen in *C. glutamicum* Auswirkungen auf das Wachstum hatte. Vielleicht schützt sich *C. glutamicum* vor zuviel Eisen in der Zelle durch Reprimierung der Gene für Eisentransporter (persönliche Kommunikation Julia Frunzke, FZ Jülich). Weitere Untersuchungen über die Mengen an Ferritin in einer Δdps -Mutante bzw. Dps in einer Δftn -Mutante müssen in Zukunft noch klären, ob es eventuell noch weitere, bisher unbekannte Eisenspeicherproteine in *C. glutamicum* gibt.

Die oben erwähnte Studie in *E. coli* konnte zeigen, dass der Wachstumsdefekt von Ferritin-Deletionsmutanten verstärkt werden konnte, wenn die Stämme zuerst in Eisen-reichem und danach in Medium, in dem Eisenchelatoren vorhanden waren, kultiviert wurden (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Zellen ohne das Eisenspeicherprotein hatten dabei einen Nachteil, da sie zuvor kein Eisen unter Eisen-reichen Bedingungen akkumulieren konnten. Ein weiteres Experiment zeigte, dass die zuvor gewählten Bedingungen noch keinen ausreichenden Stress für *C. glutamicum* darstellten, um in einer Δftn -Mutante einen Wachstumsdefekt aus-

zulösen. Dabei wurden, in Anlehnung an die Beobachtungen in *E. coli*, der WT und die Δftn -Mutante zuerst über Nacht in CGXII-Minimalmedium mit 1% (w/v) Glucose mit ausreichenden Eisenmengen ($36 \mu\text{M}$) kultiviert. Durch den niedrigeren Glucoseanteil sollten die Zellen früher in die stationäre Phase kommen, in der *E. coli*-Zellen gewöhnlich vermehrt Eisen einlagern (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Anschließend wurden die Stämme in Bezug auf Eisen ausgehungert, indem sie für 24 h in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose ohne Zugabe von Eisen kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose und $1 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat kultiviert. Da der WT während der Aushungerungsphase auf seine Eisenreserven in Ftn zurückgreifen konnte, wurde angenommen, dass dieser gegenüber der Δftn -Mutante einen Wachstumsvorteil unter Eisenmangel haben könnte. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt Abbildung 18.

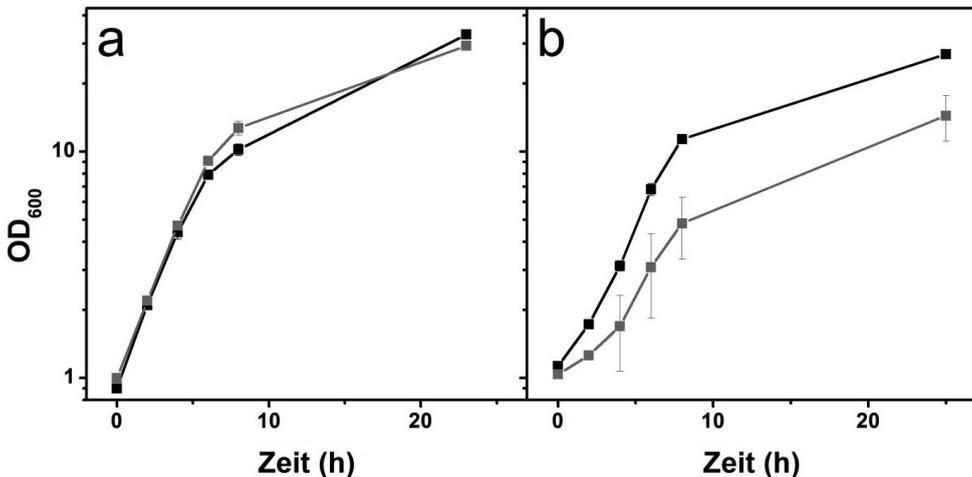


Abbildung 18. Wachstum von *C. glutamicum* WT (schwarz) und der Δftn -Mutante (grau) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose (a) ohne Zugabe von Eisen(II)-sulfat und anschließend (b) mit Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat. Die Zellen wurden vor (a) in CGXII-Minimalmedium mit 1% (w/v) Glucose und $36 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat vorkultiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

Es ist zu erkennen, dass die Wachstumsraten von WT und Δftn -Mutante während der „Aushungerungsphase“ (Abbildung 18a) vergleichbar waren (WT und $\Delta ftn \mu = 0,36 \text{ h}^{-1}$). Die erreichten finalen Biomassen der Δftn -Mutante waren im Vergleich zum WT leicht erniedrigt ($\text{OD}_{600} 29,4 \pm 0,5$ gegenüber $32,9 \pm 0,4$). Beim anschließenden Wachstum mit $1 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat zeigte sich ein deutlicher Wachstumsphänotyp der Δftn -Mutante im Vergleich zum WT (Abbildung 18b). Die Wachstumsrate ($0,26 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ gegenüber $0,32 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$) und die erreichte End- OD_{600} ($14,4 \pm 3,3$ gegenüber $27,0 \pm 1,0$) waren deutlich niedriger in der Δftn -Mutante als im WT.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in der Δftn -Mutante von *C. glutamicum* andere Effekte auftraten als in *E. coli*, weil die Abwesenheit von Ftn keinen Nachteil beim Wachstum in

Medium ohne Eisenzugabe brachte. Erst nach der Kultivierung in Eisen-freiem Medium konnten Unterschiede zwischen der *ftn*-Deletionsmutante und dem WT festgestellt werden. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Δftn -Mutante ist, dass die DtxR-vermittelte transkriptionale Antwort auf den Eisenmangel umso stärker ist, je weniger Eisen die Zellen in der Vorkultur zur Verfügung haben. Dadurch werden hochaffine Eisentransporter verstärkt exprimiert, welche am Beginn der Hauptkultur (1 μ M Eisen(II)-sulfat) schnell das zur Verfügung stehende Eisen(II) in die Zelle transportieren. Diese hohen intrazellulären Eisen(II)-Konzentrationen könnten in der Δftn -Mutante oxidativen Stress durch die Fenton-Reaktion ausgelöst haben. Durch DNA-Microarrays könnte unter diesen Bedingungen getestet werden, ob eine vermehrte Expression von Genen, die Schutz vor oxidativem Stress vermitteln (Katalase *katA* oder Superoxid-Dismutase *sod*), in der Δftn -Mutante stattfindet. Weitere Experimente zeigten, dass unter diesen Bedingungen die Deletion von *dps* keine Auswirkungen auf das Wachstum im Vergleich zum WT hatte und Dps somit eine untergeordnete Rolle für die Eisenspeicherung spielt (finale OD₆₀₀ = 29,4 \pm 0,8; μ = 0,3 \pm 0,02 h⁻¹).

3.5.2 Die Pupylierung von Ferritin und Dps unter Eisenmangel

Sowohl die Pupylierung als auch die Eisenspeicherproteine Ftn und Dps zusammen scheinen in den gezeigten Wachstumsexperimenten unter Eisenmangel eine Rolle für *C. glutamicum* zu spielen. Zusätzlich konnte in Kapitel 3.2.1 gezeigt werden, dass zwei der prominentesten Banden bei der Co-Reinigung von pupylierten Proteinen Ftn und Dps waren. Zudem zeigte die *in-vitro*-Pupylierung von Ftn (Kapitel 3.3.1), dass dieses Protein als Modells substrat der Pupylierung in *C. glutamicum* geeignet ist, und bestätigte, dass Ftn an K78 pupyliert wird. Eine Möglichkeit, um tatsächlich einen Einfluss der Pupylierung auf Ftn unter Eisenmangel feststellen zu können, war es, eine Mutante von *C. glutamicum* herzustellen, die chromosomal eine Mutation trägt, welche zu einem Austausch von K78 zu Alanin (K78→A) führt, wodurch Ftn nicht mehr pupyliert werden kann. Um zu beweisen, dass eine *ftn*-K78A-Mutante nicht mehr pupyliert werden kann, wurde eine Plasmid-basierte Expression von *ftn* bzw. dem Mutein *ftn*-K78A zusammen mit *pup* durchgeführt, um Ftn aufzureinigen. Zur Reinigung der beiden Proteine über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurde ihnen ein N-terminaler Heptahistidin-Tag angefügt. Als Expressionswirt wurde eine *C. glutamicum* $\Delta pup \Delta ftn$ -Mutante hergestellt, in der eine Pupylierung von chromosomal exprimiertem Ftn ausgeschlossen werden konnte. Sowohl 7xHis-Ftn als auch 7xHis-Ftn-K78A konnten gereinigt und anschließend mittels Peptidmassen-Fingerprint identifiziert werden (Tabelle A6 im Anhang). Sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-Gel als auch in einem Western-Blot mit Anti-Pup-Antikörpern konnte eine pupylierte Bande von Ftn detektiert werden, nicht jedoch von Ftn-K78A (Abbildung 19). Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass der Austausch von Lys78 tatsächlich zum Ausbleiben der Pupylierung von Ftn führte, und somit keine alternativen Lysin-Reste pupyliert wurden. Das hypothetische Protein

Cg2715, welches im SDS-Gel auftauchte, ist ein häufig co-gereinigtes Protein, welches vermutlich aufgrund eines HEHHHHRH-Motivs an die Ni²⁺-NTA-Agarose-Beads binden kann. Das 30S ribosomale Protein RpsA könnte mit Ferritin interagiert haben und aufgrund der vermehrten Expression von *ftn* über P_{tac} mit Ferritin co-gereinigt worden sein.

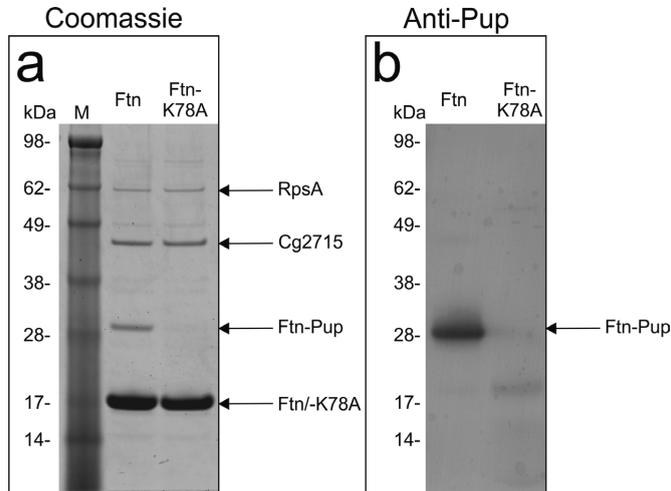


Abbildung 19. Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel (a) und Western-Blot (b; Anti-Pup-Antiserum, Kaninchen, 1:2.000) der vereinigten Elutionsfraktionen aus einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie mit Rohextrakten aus *C. glutamicum* $\Delta pup\Delta ftn$ pVWE1-Strep-pup-7xHis-ftn (Ftn) bzw. -7xHis-ftn-K78A (Ftn-K78A). M = Proteinstandard (Die Größen der Proteinstandards in kDa sind links gezeigt). Die markierten Proteinbanden wurden mittels MALDI-TOF(/TOF)-MS(/MS) identifiziert (siehe Tabelle A6 im Anhang). RpsA, 30S ribosomales Protein S1 (Cg1531; 54,0 kDa); hypothetisches Protein (Cg2715; 42,3 kDa); Ftn-Pup, pupyliertes Ferritin (Cg2782; 28,4 kDa); Ftn, Ferritin (18,1 kDa).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die *C. glutamicum*-Mutante *ftn*-K78A hergestellt, die für ein nicht pupylierbares Ftn kodierte. Diese Mutante wurde parallel mit dem WT, der Δpup - und der Δftn -Mutante als Referenz unter Eisenmangel kultiviert. Die Mutante *ftn*-K78A wuchs ähnlich schlecht wie die Δpup -Mutante (Abbildung 20). Sowohl die Wachstumsrate von $0,23 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ als auch die erreichte Biomasse von $8,15 \pm 0,07$ waren jedoch leicht höher als die der Δpup -Mutante ($0,21 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ bzw. $OD_{600} = 6,8 \pm 0,3$). Die Δftn -Mutante wuchs unter diesen Bedingungen wie der WT (Abbildung 20), während eine *ftn*-K78R-Mutante, bei der der Lysin-Rest 78 gegen einen Arginin-Rest ausgetauscht worden war, einen mit *ftn*-K78A vergleichbaren Phänotyp zeigte (Daten nicht gezeigt). Daher kann ein Verlust der Funktion in den Austausch-Mutanten *ftn*-K78A bzw. *ftn*-K78R ausgeschlossen werden, da eine Mutante, die zum Funktionsverlust von Ferritin führt, ein mit der Δftn -Mutante vergleichbares Wachstum zeigen hätte müssen. Das Wachstum der *ftn*-K78R-Mutante lieferte überdies ein zusätzliches Indiz dafür, dass Arginin-Reste *in vivo* nicht pupyliert werden.

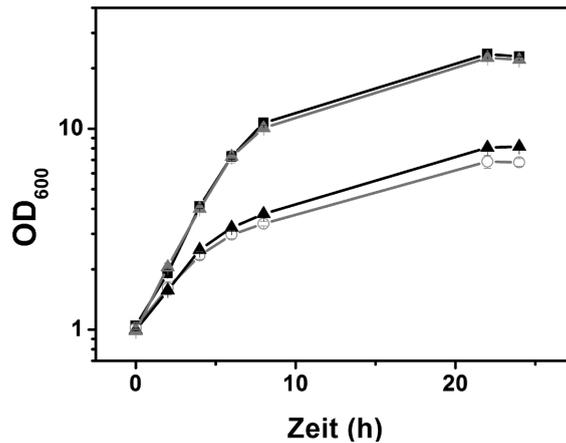


Abbildung 20. Wachstum von *C. glutamicum* WT (schwarze Quadrate), der Δftn -Mutante (graue Dreiecke), der *ftn*-K78A-Mutante (schwarze Dreiecke) und der Δpup -Mutante (graue offene Kreise) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Die *ftn*-K78A-Mutante trägt eine Mutation, die für einen Austausch des in Ftn pupylierten Lysin78 zu Alanin sorgt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten sind gezeigt.

Da die *ftn*-K78A-Mutation aufgrund der fehlenden Pupylieung von Ftn zu dem beobachteten Phenotyp unter Eisenlimitierung geführt hatte, könnte spekuliert werden, dass eine Deletion von *ftn* das Wachstum von Δpup verbessern sollte. Eine $\Delta pup\Delta ftn$ -Doppelmutante konnte ohne Probleme hergestellt werden. Tatsächlich wuchs diese Mutante besser als die Δpup -Mutante, allerdings hatte sie im Vergleich zum WT immer noch einen Wachstumsdefekt (Abbildung 21a) und erreichte nur 60-65% der Biomasse des WTs. Diese Verbesserung im Wachstum im Vergleich zur Δpup -Mutante unterstrich, dass die Pupylieung von Ftn unter Eisenmangel offensichtlich wichtig ist. Gleichzeitig verbesserte die Deletion von *dps* das Wachstum einer Δpup -Mutante unter Eisenmangel nicht. Eine $\Delta pup\Delta dps$ -Mutante wuchs vergleichbar mit der Δpup -Mutante. Das bedeutet, dass die Pupylieung von Dps unter Eisenmangel eine im Vergleich zu Ftn untergeordnete Rolle zu spielen scheint. In Kapitel 3.4.4 konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *arc*-Gens einen zu Δpup vergleichbaren Phenotyp unter Eisenmangel aufwies. Deshalb wurde eine $\Delta arc\Delta ftn$ -Mutante hergestellt, um festzustellen, ob ARC auch bei der Pupylieung von Ftn unter Eisenmangel eine Rolle spielte. Die Deletion von *ftn* in Δarc verbesserte das Wachstum im Vergleich zur Δarc -Mutante, ähnlich wie in der Δpup -Mutante (Abbildung 21a), was diese Annahme bestätigte.

Das Wachstum der $\Delta pup\Delta ftn$ -Mutante warf jedoch eine Frage auf: Warum wuchs diese nicht wieder wie der WT, zumal die Δftn -Mutante keinen Effekt auf das Wachstum hatte (Kapitel 3.5.1)? Es musste noch weitere pupylierte Zielproteine geben, die für diesen Wachstumsunterschied zwischen der $\Delta pup\Delta ftn$ -Mutante und dem WT verantwortlich sind. Auch wenn eine Deletion von *dps* den Wachstumsdefekt der Δpup -Mutante nicht verbessern konnte, wurde getestet, ob der Wachstumsdefekt der $\Delta pup\Delta ftn$ -Mutante auf der Anwesenheit von nicht

pupyliertem Dps zurückzuführen war. Deshalb wurde eine $\Delta pup\Delta ftn\Delta dps$ -Mutante hergestellt. In der Tat wuchs diese Mutante besser als die $\Delta pup\Delta ftn$ -Mutante und erreichte 80% statt 60-65% der Biomasse des WTs (Abbildung 21b). Der verbleibende Wachstumsdefekt der $\Delta pup\Delta ftn\Delta dps$ -Mutante war vergleichbar mit jenem, den die $\Delta ftn\Delta dps$ -Mutante unter Eisenmangel aufwies (Abbildung 21b und Kapitel 3.5.1). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Deletion von *ftn* und *dps* alle Defekte unter Eisenmangel, die durch die *pup*-Deletion verursacht worden waren, aufheben konnte und die Pupylierung von Ftn und Dps somit relevant für *C. glutamicum* ist. Dabei scheint die Pupylierung von Ftn, vermutlich aufgrund der größeren Kapazität, eine übergeordnete Rolle zu spielen, weil die fehlende Pupylierung von Ftn in der *C. glutamicum ftn-K78A*-Mutante einen vergleichbaren Wachstumsdefekt unter Eisenmangel erzeugte wie die *pup*-Deletion und die Deletion von *dps* den Defekt der Δpup -Mutante nicht verbessern konnte.

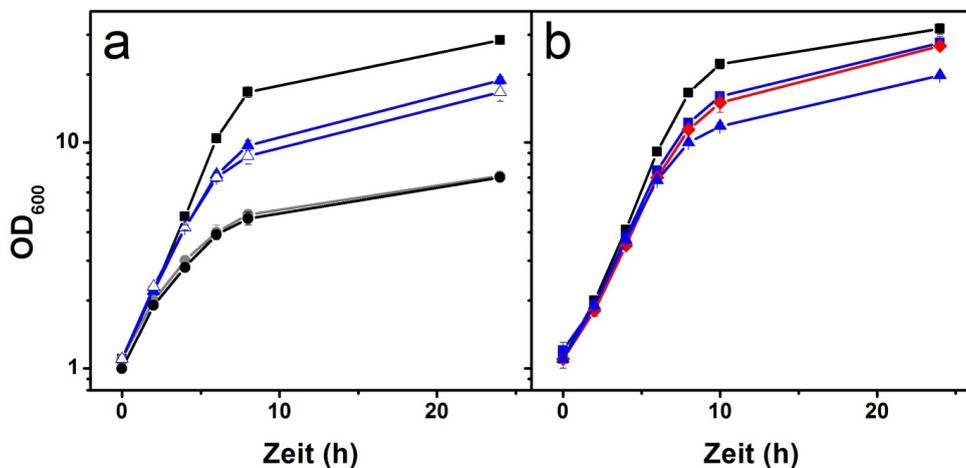


Abbildung 21. Wachstum von *C. glutamicum* WT (schwarze Quadrate) und der $\Delta pup\Delta ftn$ -Mutante (blaue, gefüllte Dreiecke), sowie (a) der $\Delta arc\Delta ftn$ - (blaue, offene Dreiecke), der Δpup - (graue Kreise) und der $\Delta pup\Delta dps$ -Mutante (schwarze Kreise) oder (b) der $\Delta ftn\Delta dps$ - (blaue Quadrate) und der $\Delta pup\Delta ftn\Delta dps$ -Mutante (rote Rauten) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat) in Vor- und Hauptkultur. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten gezeigt.

3.5.3 Stabilität von Ferritin in *C. glutamicum* WT und Δpup unter Eisenmangel

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Pupylierung von Ftn wichtig für das Wachstum bei limitierten Eisenkonzentrationen ist. In Abwesenheit eines Proteasoms in *C. glutamicum* stellte sich jedoch noch die Frage, was mit dem pupylierten Protein geschieht, wenn es durch ARC erkannt und möglicherweise entfaltet wurde. Deshalb sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden, ob Ftn in *C. glutamicum* eventuell Pup-abhängig abgebaut wird. Wenn dies der Fall wäre, müsste Ftn im Δpup -Stamm unter Eisenmangel akkumulieren. Die Proteinmengen in der Δpup -Mutante waren in den vergleichenden Proteom-

analysen unter Eisenmangel erniedrigt im Vergleich zum WT (Kapitel 3.4.3), jedoch waren die Δpup -Zellen dem Eisenmangel länger ausgesetzt als der WT. Deshalb konnten diese Ergebnisse nicht herangezogen werden und darum sollte mittels Western-Blots über mehrere Stunden einer Kultivierung unter Eisenmangel die Menge an Ftn in WT und Δpup bestimmt werden. Im ersten Ansatz wurde C-terminal Strep-getaggtetes Ftn in *C. glutamicum* Δftn bzw. $\Delta pup\Delta ftn$ Plasmid-basiert exprimiert (Abbildung 22a). Im zweiten Ansatz wurde das chromosomale *ftn* im WT und in der Δpup -Mutante gegen C-terminal Strep-getaggtetes *ftn* ausgetauscht (Abbildung 22b). Dabei wurden Proben am Ende der Vorkultur, sowie 2, 4 und 6 h nach Start der Hauptkultur genommen. Die Zellen wurden lysiert und gleiche Mengen an Protein wurden für einen Western-Blot eingesetzt. Die Detektion von Ftn erfolgte über ein Streptactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat.

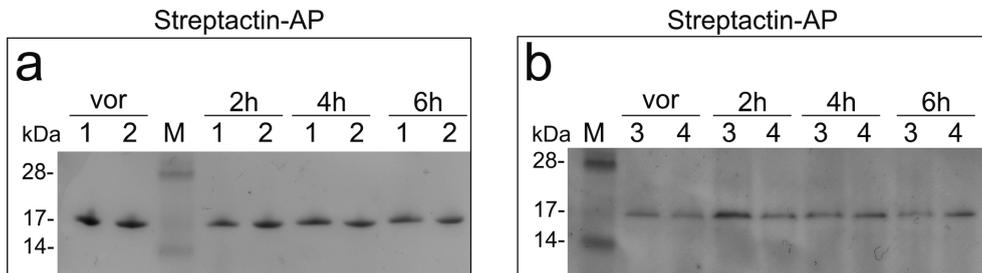


Abbildung 22. Quantitativer Western-Blot mit Rohextrakten von (a) *C. glutamicum* Δftn pVWEx1-ftn-Strep (1), $\Delta pup\Delta ftn$ pVWEx1-ftn-Strep (2) bzw. (b) *C. glutamicum* ftn-Strep (3), Δpup ftn-Strep (4). Es wurden (a) 90 μ g oder (b) 240 μ g Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Streptactin-Alkalische Phosphatase (1:3.500). Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat) kultiviert, die Induktion der Genexpression in (a) erfolgte mit 1 mM IPTG am Start der Vor- und Hauptkultur. Vor: Probe am Ende der Vorkultur (ebenfalls unter Eisenmangel), 2h, 4h, 6h: Proben 2, 4 oder 6 h nach Start der Hauptkultur. Es ist jener Bereich des Blots gezeigt, auf dessen Höhe die Ftn-Strep-Bande (18,3 kDa) lief. Die vollständigen Blots zeigt Abbildung A5 im Anhang. Die Abbildungen sind repräsentative Experimente von zwei biologischen Replikaten.

Die Experimente zeigten keine Anzeichen einer Akkumulation von Ftn(-Strep) unter diesen Bedingungen im Δpup -Stamm-Hintergrund. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass unter Eisenmangel Ftn im WT also nicht Pup-abhängig degradiert wurde. Weitere Experimente werden deshalb klären müssen, durch welchen Mechanismus die Pupylierung Ftn und auch Dps unter Eisenmangel beeinflusst.

4 Diskussion

4.1 Die Pupylierung in *Corynebacterium glutamicum*

Die Pupylierung ist eine in Bakterien bis vor kurzem völlig unbekannte posttranslationale Modifikation, mit der Proteine in Actinobakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis*, für den Abbau über ein Proteasom markiert werden (Pearce *et al.*, 2008, Burns *et al.*, 2008). Dieses System wird auch als Pup-Proteasom-System (PPS) bezeichnet. Allerdings existieren die Gene für die an der Pupylierung beteiligten Proteine auch in Actinobakterien, die kein Proteasom besitzen. Ein solcher Organismus ist *Corynebacterium glutamicum*, für den in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Pupylierung unabhängig von der Anwesenheit eines Proteasoms *in vivo* aktiv ist und eine physiologische Funktion besitzt.

Die Pupylierung ist in *C. glutamicum*, genauso wie das gesamte PPS in den meisten Actinobakterien, nicht essentiell unter Standard-Kultivierungsbedingungen (Knipfer & Shrader, 1997, De Mot *et al.*, 2007, Lamichhane *et al.*, 2006, Darwin *et al.*, 2003). Deletionsmutanten von *C. glutamicum*, denen die Gene *pup*, *dop* oder *arc* fehlten und die damit keine Pupylierung, Depupylierung bzw. Erkennung pupylierter Substrate durchführen konnten (Abbildung 8), zeigten in Bezug auf Wachstum, die Bildung organischer Säuren und die Mengen an zytosolischen Proteinen in Standard-Flüssigmedien keinen Unterschied im Vergleich zum WT (Kapitel 3.1). Die Beobachtungen in Bezug auf das Wachstum konnten auch in *M. tuberculosis* (Darwin *et al.*, 2003) und *M. smegmatis* (Imkamp *et al.*, 2010) für Stämme mit deletierten Genen der Pupylierungsmaschinerie, nämlich *pafA*- und *mpa*- (*M. tuberculosis*) bzw. *dop*-Deletionsmutanten (*M. smegmatis*), gemacht werden. Eine defekte Pupylierung hatte in *C. glutamicum* während der exponentiellen Wachstumsphase in Standard-Flüssigmedien außerdem kaum Auswirkungen auf das Transkriptom. Dies wurde auch in *M. tuberculosis* gezeigt. In diesem Organismus konnte jedoch in der beginnenden stationären Phase eine vermehrte Expression von Zink-abhängigen sowie eine erniedrigte Expression von Kupfer-abhängigen Regulons in den Mutanten im Vergleich zum WT festgestellt werden (Festa *et al.*, 2011). Warum Stämme mit defektem PPS diese Änderungen zeigen, muss jedoch noch weiter untersucht werden. Möglicherweise werden Kupfer- bzw. Zink-Bindeproteine im WT proteasomal abgebaut, um die gespeicherten divalenten Kationen freizugeben, wodurch in den untersuchten PPS-inaktiven Stämmen womöglich Kupfer- bzw. Zink-Mangel-ähnliche Bedingungen verursacht wurden (Festa *et al.*, 2011). Diese Beobachtung ist natürlich insofern interessant, als dass es sich hier um Regulationsmechanismen von zweiwertigen Kationen handelt, wie auch Eisen eines sein kann (Kapitel 4.3). Die Kultivierung von *C. glutamicum* in Minimalmedium ohne die Zugabe der Spurenelemente Zink und Kupfer hatte allerdings keinen Wachstumsunterschied zwischen WT und Δpup -Mutante ge-

zeigt (Kapitel 3.4.1). Das zytosolische Pupylom von *C. glutamicum* lässt ebenso keine Rückschlüsse auf eine Pupylierung von Proteinen der Kupfer- oder Zinkhomöostase zu (Tabelle 5). Ergänzende globale Transkriptomanalysen des *C. glutamicum* WT und der Δpup -Mutante während der stationären Wachstumsphase müssen deshalb klären, ob die Pupylierung auch einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des Kupfer- bzw. Zinkstoffwechsels hat.

Die Pupylierung ist jedoch in *C. glutamicum* aktiv und physiologisch relevant, wie einerseits das während dieser Arbeit aufgeklärte Pupylom mit 55 nachweislich pupylierten Proteinen sowie weiteren 51 putativ pupylierten Zielproteinen, wie auch die Wachstumsdefekte der Δpup -, Δdop - und auch Δarc -Mutanten unter Eisenmangel gezeigt haben.

4.1.1 Die Pup-Ligase PafA und Erkennung von Zielproteinen

PafA aus *C. glutamicum* führt die kovalente Verknüpfung von Pup an Substrate aus. Das zeigen die *in-vitro*-Pupylierungen von Ferritin (Ftn) bzw. der Seryl-tRNA-Synthetase (SerS) und der Endopeptidase O (PepO) mit heterolog in *E. coli* exprimiertem PafA und Pup (Abbildung 11 bzw. Abbildung 12). Auch in *M. tuberculosis* waren PafA und Pup-Q64E *in vitro* ausreichend, um Substrate zu pupylieren (Striebel *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte die heterologe *in-vitro*-Pupylierung von Zielproteinen aus *M. tuberculosis* parallel zu dieser Arbeit auch mit PafA und Pup aus *C. glutamicum* gezeigt werden (Özcelik *et al.*, 2012). Diese beiden Proteine sind sogar ausreichend, um in anderen Prokaryoten, die keine Pupylierungsmaschinerie besitzen, ein künstliches Pupylom zu erzeugen. Dies wurde gezeigt, indem *pafA* und *pup* aus *M. tuberculosis* in *E. coli* K12 exprimiert und Pup gereinigt wurde, wodurch ein 51 Proteine umfassendes Pupylom aus *E. coli* erhalten wurde (Cerdeira-Maira *et al.*, 2011). Ob PafA *in vivo* die einzige Pup-Ligase in *C. glutamicum* ist, könnte noch durch Reinigung von getaggttem Pup-Protein aus einer $\Delta pafA$ -Mutante geklärt werden. Dahingehende Experimente in *M. tuberculosis* konnten zeigen, dass ohne PafA kein Pupylom gereinigt werden kann, was für PafA als einzige Pup-Ligase in Actinobakterien spricht (Pearce *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Pupylierungsstudien konnten zeigen, dass Pupylierung in *C. glutamicum* an Lysin-Resten des Zielproteins stattfindet. Eine kovalente Verknüpfung von Pup durch PafA an Arginin-Reste wurde nicht bestätigt, obwohl die Auswertung einiger MS/MS-Spektren in der Pupylomstudie eine Pupylierung an Arginin-Resten gegenüber nahegelegenen Lysin-Resten favorisierte (Abbildung A2 im Anhang). Der Austausch der mutmaßlich pupylierten Arginin-Reste gegen Alanin-Reste in SerS und PepO verhinderte jedoch die Pupylierung dieser Proteine nicht, wohingegen die nächstgelegenen Lysin-Reste für eine Pupylierung essentiell waren (Abbildung 12).

Der Mechanismus der Erkennung des zu pupylierenden Proteins durch PafA ist bisher nicht aufgeklärt. Es ist kein Sequenzmuster bekannt, aufgrund dessen pupylierte Proteine vorhergesagt werden könnten. Eine *in-silico*-Vorhersage pupylierter Substrate ist durch mehrere

bioinformatische Programme, die auf Basis der bekannten pupylierten Proteine erstellt wurden, zumindest für mycobakterielle Proteine möglich (Chen *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2013). Die pupylierten Lysin-Reste der Zielproteine in *C. glutamicum* sind jedoch in homologen Puppylierungs substraten von anderen Actinobakterien schlecht konserviert (Tabelle 5). Eine bisher bekannte Gemeinsamkeit pupylierter Lysin-Reste ist ihre Lage an peripheren Untereinheiten bzw. Regionen der Proteine in α -Helices oder nicht gefalteten Bereichen (Watrous *et al.*, 2010). Das trifft auch auf die Proteine Ftn und Dps zu, für die erstmals in dieser Arbeit bewiesen werden konnte, dass deren Puppylierung physiologisch relevant ist und zumindest bei Ftn kein Proteolyse-Signal darstellt. Abbildung 23 zeigt, dass K78 in Ftn bzw. K14 in Dps in einem nicht gefalteten Bereich bzw. in einer α -Helix an der Oberfläche positioniert und somit vermutlich gut zugänglich sind (rote Lysin-Reste).

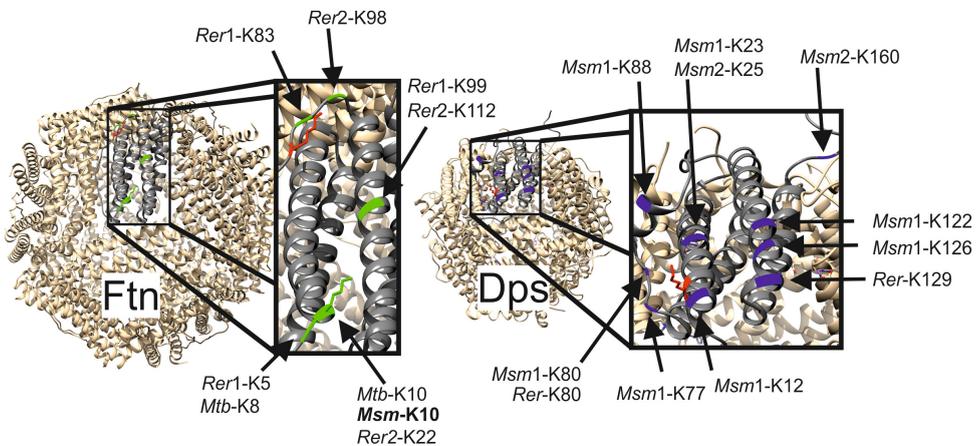


Abbildung 23. Puppylierung der Eisenspeicherproteine Ferritin (Ftn, Cg2782) und des mangelinduzierten DNA-Schutzproteins Dps (Cg3327). Die Strukturen stellen das 24-merer Ftn BfrB aus *M. tuberculosis* (PDB: 3OJ5) bzw. das 12-merer Dps aus *M. smegmatis* (PDB: 1VEQ) dar. Ein Monomer von BfrB wurde durch ein modelliertes Monomer von *C. glutamicum* Ftn (schwarze Struktur in Ftn) ersetzt. Die Struktur des Ftn-Monomers wurde durch ein Alignment der Aminosäuresequenz von Ftn mit der von BfrB modelliert. Dazu wurde die Software Chimera benutzt (Pettersen *et al.*, 2004). Das Gleiche wurde für *M. smegmatis* Dps mit Dps aus *C. glutamicum* durchgeführt (schwarze Struktur in Dps). Rot dargestellt sind K78 in Ftn und K14 in Dps, die in *C. glutamicum* puppyliert sind (Tabelle 5). Für die Puppylierung theoretisch zugängliche Positionen von Lysin-Resten aus Ftn- bzw. Dps-Homologen von *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998), *M. smegmatis* MC² 155 (Accession-Nr. NC_008596.1) oder *R. erythropolis* PR4 (Sekine *et al.*, 2006) sind in Ftn in grün bzw. in Dps in blau gezeigt. Für K10 aus BfrB von *M. smegmatis* konnte bereits eine Puppylierung bestätigt werden (Watrous *et al.*, 2010). Die Abkürzungen stehen für folgende Proteine: *Mtb*, *M. tuberculosis* BfrB (Genlocusnummer Rv3841); *Msm*, *M. smegmatis* BfrB (MSMEG_6422); *Rer1*, *R. erythropolis* Ftn1 (RER_01810); *Rer2*, *R. erythropolis* Ftn2 (RER_01740); *Rer*, *R. erythropolis* Dps (RER_12800); *Msm1*, *M. smegmatis* Dps1 (MSMEG_6467); *Msm2*, *M. smegmatis* Dps2 (MSMEG_3242).

Für Ftn konnte die Puppylierung eines Homologs, BfrB aus *M. smegmatis*, nachgewiesen werden (Watrous *et al.*, 2010). Allerdings ist es an einer anderen Position in der α -Helix 1 puppyliert, die ebenfalls gut zugänglich scheint (*Msm*-K10 in Abbildung 23). Außerdem ist zu erkennen, dass in allen Homologen der Eisenspeicherproteine aus *R. erythropolis*, *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* prinzipiell frei zugängliche Lysin-Reste an der Oberfläche

von Ferritin und Dps vorhanden sind. Die einzige Ausnahme bildet *M. tuberculosis*, das kein Homolog von Dps besitzt, sondern stattdessen ein Histon-ähnliches Protein zum Schutz seiner DNA einsetzt (Takatsuka *et al.*, 2011). Das könnte dafür sprechen, dass auch andere Actinobakterien ihre Eisenspeicherproteine über Pupylierung modifizieren, auch wenn die Positionen von denen in *C. glutamicum* abweichen.

4.1.2 Die regulatorische AAA+-ATPase ARC: Entfaltung ohne Proteolyse?

Die regulatorische AAA+-ATPase ARC ist für die Funktionalität der Pupylierung genauso wichtig wie Pup in *C. glutamicum*, denn das Fehlen von ARC bewirkte unter Eisenmangel einen ähnlichen Wachstumsdefekt wie das Fehlen von Pup (Abbildung 16a bzw. Abbildung 14). Die Pup-abhängige Regulation von Proteinen unter Eisenmangel muss somit auch die Erkennung der pupylierten Substrate und womöglich deren Entfaltung durch ARC umfassen. Der im Vergleich zur Deletion von *dop* stärkere Wachstumsdefekt unter Eisenmangel zeigt zusätzlich (Abbildung 16), dass die Rolle von ARC in *C. glutamicum* über die bereits gezeigte stimulierende Wirkung von Mpa bei der Depupylierung von Proteinen aus Mycobakterien *in vitro* (Imkamp *et al.*, 2010) und *in vivo* (Burns *et al.*, 2010a) hinausgeht. Sowohl die Ergebnisse aus der 2D-DIGE (Tabelle 9) als auch aus Western-Blot-Analysen (Abbildung 22) sprechen aber gegen eine Proteolyse von Ftn oder Dps unter Eisenmangel, weil im Δpup -Stammhintergrund Ftn unter Eisenmangel nicht akkumulierte. Inwiefern eine ARC-vermittelte Entfaltung von Ftn und Dps eine Rolle unter Eisenmangel spielen könnte, wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

In Bezug auf andere Substrate wäre es aber auch denkbar, dass ARC als AAA+-ATPase anstatt, wie in *Mycobacterium* sp., mit dem Proteasom in *C. glutamicum* mit einer anderen ATP-abhängigen Protease wie ClpP1P2 (Schweitzer, 2007) oder FtsH (Lüdke *et al.*, 2007) interagiert. Die Schnittmenge von pupylierten und mutmaßlich pupylierten Substraten (Tabelle 5 bzw. Tabelle A8 im Anhang) und FtsH-Substraten ist bezogen auf die Menge an pupylierten Proteinen relativ klein (3 Substrate), die von ClpP1 (11) und ClpP2 (12) etwas größer (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10. Überschneidungen zwischen (putativ) pupylierten Proteinen und putativen Substraten der Proteasen ClpP1P2 oder FtsH. Es ist der jeweilige Genlocus, der Proteinname und die Annotation gezeigt. Es sind Proteine aufgeführt, die als pupyliert bestätigt wurden (Tabelle 5) oder putativ pupyliert sind (Tabelle A8 im Anhang). Der Genlocus letzterer ist durch ein Sternchen markiert. Außerdem ist gezeigt, ob das jeweilige Protein ein mutmaßliches Substrat der ATP-abhängigen Proteasen ClpP1 oder ClpP2 (Schweitzer, 2007) bzw. FtsH (Lüdke *et al.*, 2007) ist. UE = Untereinheit

Gen-locus	Protein	Annotation	ClpP1	ClpP2	FtsH
Cg0310*	KatA	Katalase			x
Cg0583	FusA	Elongationsfaktor G	x	x	
Cg0587	Tuf	Elongationsfaktor Tu	x	x	
Cg1017	MetS	Methionyl-tRNA-Synthetase	x		
Cg1111	Eno	Enolase	x	x	

Gen-locus	Protein	Annotation	ClpP1	ClpP2	FtsH
Cg1145	Fum	Fumarase	x	x	x
Cg1157*	Fbp	Fructose-1,6-Bisphosphatase		x	
Cg1420	GatB	Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, UE B	x	x	
Cg1737	Acn	Aconitase		x	
Cg1789*	Tpi	Triosephosphat-Isomerase	x		
Cg2833	CysK	O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase	x	x	
Cg2958	ButA	L-2,3-Butandiol-Dehydrogenase/Acetoin-Reductase	x	x	
Cg3068	Fda	Fructose-Bisphosphat-Aldolase	x	x	
Cg3118	Cysl	Sulfit-Reductase (Hämoprotein)			x
Cg3255	UspA3	Universelles Stressprotein Nr. 3	x	x	
Cg3327	Dps	Mangelinduziertes DNA-Schutzprotein		x	

Die in dieser Arbeit untersuchten zytosolischen Proteome unter Standard- (Kapitel 3.1) und Eisenmangelbedingungen (Tabelle 9) zeigten jedoch keine Akkumulation dieser möglichen Zielproteine in der Δpup -Mutante. Eine Interaktion von ARC mit den Clp-Proteasen wurde bis jetzt nicht gezeigt. Eine Möglichkeit, Interaktionspartner von ARC wie die Clp-Protease zu finden, wäre eine Quervernetzung von ARC mit nicht-kovalenten Bindepartnern über Formaldehyd und anschließende Reinigung von ARC mittels Strep-Tag (Herzberg *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte über native Co-Reinigung ohne Quervernetzung mit Formaldehyd eine mögliche Interaktion von ARC mit den Aminopeptidasen PepC und PepQ festgestellt werden (Abbildung 17). Einen Einfluss auf das Wachstum unter Eisenmangel hatten die Einzeldelation dieser Peptidasen allerdings nicht, die Deletion beider Peptidasen zusammen muss noch untersucht werden. Proteom-Untersuchungen mit den Deletionsmutanten von *pepC* und *pepQ* könnten Aufschluss darüber geben, ob diese unter bestimmten Bedingungen in einen Pup-abhängigen Abbau von Proteinen in *C. glutamicum* involviert sind. Odx, DadA, AdhC, Adk und Cg1246 (Tabelle 9) schienen im wasserlöslichen Proteom durch fehlende Pupylierung unter Eisenmangel verändert, obwohl es keine Anzeichen einer Veränderung des mRNA-Gehalts unter Eisenmangel gab (Tabelle 7, Tabelle 8), was für eine posttranslationale Regulation sprechen könnte. In *C. glutamicum* wurden diese Proteine nicht als tatsächlich oder putativ pupyliert identifiziert (Tabelle 5 bzw. Tabelle A8 im Anhang), in *M. tuberculosis* wurde Adk und in *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* AdhC als pupyliert beschrieben (Tabelle A9 im Anhang).

4.1.3 Die Depupylase Dop und die Bedeutung des Pup-Recyclings

Die Depupylierung von mycobakteriellen Proteinen durch Dop aus *C. glutamicum* konnte in Zelllysaten und *in vitro* mit heterolog exprimiertem Enzym detektiert werden (Imkamp *et al.*, 2010). Auch die hier gezeigten Ergebnisse konnten beweisen, dass dieser Recyclingmechanismus eine wichtige Rolle für einen optimalen Ablauf der Pupylierung *in vivo* spielt (Abbildung 16b). Die Bedeutung von Dop könnte darin liegen, dass die vermutlich zu gerin-

gen Mengen an freiem Pup in einer Δdop -Mutante nicht ausreichen, um alle Zielproteine zu modifizieren. Die Tatsache, dass der durch die Deletion von *dop* ausgelöste Wachstumsdefekt in *C. glutamicum* unter Eisenmangel durch die zusätzliche Expression von *pup* komplementiert werden konnte, passt in dieses Bild (Abbildung 16b). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Dop bei PPS-vermitteltem Abbau von Substraten *in vitro* nicht zwingend notwendig ist (Striebel *et al.*, 2010). Ohne Dop findet die Pupylierung also weiterhin in *C. glutamicum* statt, doch verbleibt Pup nach der Entfaltung des Zielproteins durch ARC vermutlich am Zielprotein und ist für eine weitere Pupylierung nicht verfügbar. Vermutlich sind in der Zelle mehr Moleküle Ftn bzw. Dps als Pup vorhanden, wodurch deshalb nicht alle Zielproteine pupyliert und anschließend entfaltet werden können. Eine Expression von *dop* über den induzierten *tac*-Promotor führte in dieser Arbeit offensichtlich zu einer zu hohen Menge an Dop *in vivo* (Abbildung 16b). Dadurch wurden die Substrate womöglich depupyliert, bevor sie von ARC erkannt und entfaltet werden konnten. Dieser Effekt wurde bei einer *in-vitro*-Proteolyse des Modellsubstrats FabD aus *M. tuberculosis* bereits gezeigt. Die Zugabe von Dop zu einem Gemisch von pupyliertem FabD, Mpa und Proteasom bewahrte FabD vor dem Abbau (Burns *et al.*, 2010a). Geringere Mengen von Dop, die durch die basale Expression von *dop* durch P_{tac} ohne Zugabe des Induktors IPTG erreicht wurden bzw. *in vivo* vermutlich vorliegen, sind jedoch wichtig für das Recycling von Pup. *In vitro* konnte für das PPS aus *R. erythropolis* gezeigt werden, dass Dop Pup nicht nur vom Substrat abspaltet, sondern Pup selbst auch endoproteolytisch verdaut, wodurch nach der Depupylierung von Substraten *in vitro* kein freies Pup detektiert werden konnte (Yun *et al.*, 2012). Eine Proteolyse von Pup durch Dop würde jedoch die Menge an frei verfügbarem Pup nicht erhöhen, sondern vielmehr verringern. Dadurch wäre Dop in einem Proteasom-freien Organismus wie *C. glutamicum* für den durch Pup- und ARC-vermittelten Effekt nutzlos und die Deletion von *dop* hätte vermutlich keinen Effekt auf das Wachstum unter Eisenmangel gehabt. Deshalb erscheint diese Nebenaktivität von Dop in *C. glutamicum* unter Eisenmangel unwahrscheinlich, muss jedoch *in vitro* erst überprüft werden.

4.1.4 Der *pup*-Gencluster

Die Analyse von Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierungen zeigte, dass sich nicht nur die Organisation der Gene der Pupylierungsmaschinerie im Genom (Abbildung 3), sondern vermutlich auch die transkriptionelle Regulation dieser Gene in *C. glutamicum* von Actinobakterien mit Proteasom unterscheidet: *pup* bildet nämlich ein Operon mit *pafA*, welches unabhängig von *pafBC* transkribiert wird. Über die transkriptionelle Regulation von *pup* ist bisher wenig bekannt. In einer Studie zu einem *C. glutamicum* Stamm, in dem der Anti-Sigmafaktor *rshA* deletiert worden war, konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Mengen von *pup* und *pafA* um den Faktor 2 höher als im WT waren, was dafür spricht, dass die beiden Gene unter der Regulation des Sigmafaktors σ^H stehen, der an der transkriptionellen Antwort auf Hitzestress

und oxidativen Stress beteiligt ist (Busche *et al.*, 2012). Die in der Arbeit von Busche *et al.* (2012) vorhergesagte -35-Region überschneidet sich mit der -10-Region des proximalen Promotors von *pup* (Abbildung 7), die putative -10-Region des σ^H -abhängigen Promotors liegt schon im vom proximalen Promotor transkribierten Bereich von *pup*. Es könnte sich also um einen dritten Promotor vor *pup* handeln. Außerdem sind *pafB* und *pafC* in *C. glutamicum* als putative Transkriptionsfaktoren annotiert (Kalinowski *et al.*, 2003). Eine Analyse mit InterProScan 4 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) ergab, dass beide eine WYL-Domäne mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv besitzen. Transposonmutanten der beiden homologen Gene wurden in *M. tuberculosis* untersucht, die einen leichten Wachstumsdefekt bei nitrosativem Stress im Vergleich zum WT aufwiesen (Festa *et al.*, 2007). Außerdem zeigten Bakterien-Zwei-Hybrid-System-Analysen von Festa *et al.* (2007), dass die zwei Proteine miteinander interagieren. Das könnte bedeuten, dass diese Proteine funktional voneinander abhängig sind. Die Gene *pafB* (cg1687) und *pafC* (cg1686) bilden laut der Analysen der RNA-Sequenzierung in *C. glutamicum* mutmaßlich ein eigenes Operon unabhängig vom *pup-pafA*-Operon. In Experimenten einer Masterarbeit an diesem Institut wuchsen *C. glutamicum*-Deletionsmutanten dieser Gene unter Standard-Bedingungen, Eisenmangel oder der Anwesenheit von H_2O_2 allerdings wie der WT (Reuters, 2014). Somit sind weitere Untersuchungen, insbesondere Transkriptomanalysen dieser Mutanten notwendig, um ihre Rolle im Zusammenhang mit der Pupylierung zu klären. Weitere mögliche Transkriptionsregulatoren von *pup* sind der in die Antwort auf oxidativen Stress involvierte Regulator OxyR (Kim & Holmes, 2012, Teramoto *et al.*, 2013) bzw. der bereits erwähnte Eisen-abhängige Regulator DtxR (Brune *et al.*, 2006, Wennerhold & Bott, 2006). Für eine $\Delta oxyR$ -Mutante von *C. glutamicum* ATCC 13032 konnte gezeigt werden, dass quasi keine mRNA von *pup* bzw. *pafA* im Transkriptom detektierbar war (Jörn Kalinowski, Universität Bielefeld, persönliche Kommunikation). Da OxyR in *C. glutamicum* ein transkriptioneller Repressor von H_2O_2 -induzierbaren Genen unter Standardbedingungen ist (Teramoto *et al.*, 2013), spricht das Fehlen von *pup-pafA*-mRNA in der $\Delta oxyR$ -Mutante dafür, dass OxyR die Expression eines transkriptionellen Repressors von *pup* reprimiert, der dann wiederum in der $\Delta oxyR$ -Mutante aktiv exprimiert wird, an den Promotor von *pup* bindet und die Expression inhibiert. Ob es sich bei diesem Repressor um PafBC handelt, ist noch nicht geklärt, da die *pafBC*-mRNA-Mengen in der $\Delta oxyR$ -Mutante nicht verändert waren.

Für DtxR (Kapitel 3.4.2) konnte gezeigt werden, dass dieser Regulator an den *pup*-Promotor bindet (Reuters, 2014). Die *in silico* bestimmte Bindestelle 5'-TTGGGTTTGCTTTGCGTTC (CoryneRegNet, 2013) von DtxR befindet sich an Position 1576583 bis 1576601 im Genom von *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003). Es überlappt mit der kodierenden Sequenz von *pup*, weicht jedoch in sechs Positionen von der Konsensussequenz (5'-TWAGGTWAGSCTWACCTWA) für DtxR aus *C. diphtheriae* ab (Tao & Murphy, 1994),

die auch für *C. glutamicum* gilt (Wennerhold & Bott, 2006, Brune *et al.*, 2006). Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen zur Eisenspeicherung ist dieser Regulator ein interessanter Kandidat für die transkriptionelle Regulation der Pupylierung. Da sich jedoch die Transkriptmengen von *pup* unter Eisenmangel nicht von denen unter Standard-Bedingungen unterscheiden (Tabelle 7), sind weitere Experimente notwendig, um die Rolle von DtxR in Bezug auf die Expression von *pup* zu untersuchen.

4.2 Das Pupylom von *Corynebacterium glutamicum* im Vergleich mit dem anderer Actinobakterien

Durch die Reinigung von Polyhistidin-getaggetem Pup konnten 54 pupylierte Proteine durch die multidimensionale Proteinidentifizierungstechnik (MudPIT) identifiziert werden, sowie mittels MALDI-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) auch für Dps eine Pupylierung nachgewiesen werden. Somit ergibt sich eine Gesamtsumme von 55 pupylierten Proteinen in *C. glutamicum* unter den getesteten Bedingungen im BHI-Vollmedium (Tabelle 5).

Während dieser Arbeit wurden interessanterweise in *C. glutamicum* keine Enzyme als nachweislich oder putativ pupyliert gefunden, die in bisherigen Arbeiten als Modellsubstrate für die Pup-abhängige Proteindegradation in *Mycobacterium* sp. beschrieben worden waren, wie z. B. Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (PanB), Superoxid-Dismutase (SodA) oder *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase (Ino1) (Burns *et al.*, 2008, Pearce *et al.*, 2008), wovon für Ino1 jedoch eine ClpCP-abhängige Proteolyse in *C. glutamicum* postuliert wurde (Schweitzer, 2007). Es gibt trotzdem einige Überschneidungen zwischen den in dieser Arbeit gefundenen und den bisher publizierten Pupylomen: homologe Proteine von dreizehn in *C. glutamicum* gefundenen Pupylierungszielen wurden auch in anderen Actinobakterien als pupyliert gefunden (Tabelle 5). Wie im Venn-Diagramm in Abbildung 24 ersichtlich, sind Homologe zu zehn in dieser Arbeit gefundenen Proteine auch in anderen Actinobakterien pupyliert, bei denen das Pupylom durch homologe Expression von Pup gereinigt werden konnte, und zwar in *C. glutamicum* (diese Arbeit), *M. tuberculosis* (Festa *et al.*, 2010), *M. smegmatis* (Watrous *et al.*, 2010) und *R. erythropolis* (Yun *et al.*, 2012). Jedoch gibt es kein Protein, für das in allen vier Organismen eine Pupylierung bestätigt werden konnte.

Eine vollständige Liste aller pupylierten Proteine aus den Organismen in Abbildung 24 befindet sich in Tabelle A9 im Anhang. Der größte Anteil aller bestätigten pupylierten Proteine scheint spezifisch für jeden Organismus zu sein, der größte Überlappungsbereich besteht zwischen den engsten Verwandten *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* (20 Proteine). Es ist schwierig, eine Erklärung für diese Beobachtung abzugeben, weil gezeigt wurde, dass die Pupylome dynamisch sind (Poulsen *et al.*, 2010) und die Wachstumsbedingungen zur Isolierung der einzelnen Pupylome nicht identisch waren.

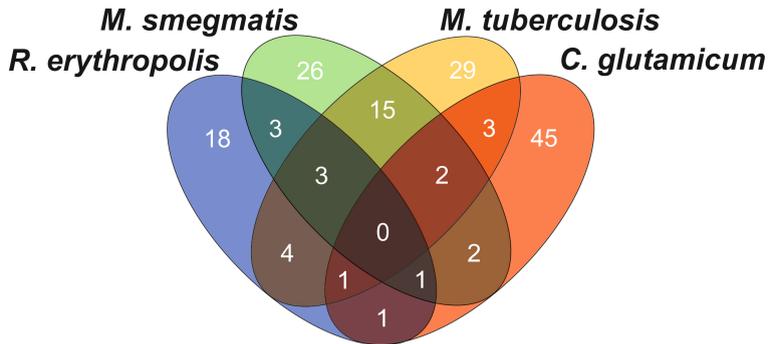


Abbildung 24. Venn-Diagramm der Überlappungen zwischen homologen, pupylierten Proteinen aus *R. erythropolis*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* aus Tabelle A9 im Anhang. Die Abbildung wurde mit Venny erstellt (<http://bioinfogg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

C. glutamicum weist die geringsten Überlappungen mit den anderen drei Organismen in Bezug auf die pupylierten Proteine auf. Möglicherweise hat die An- und Abwesenheit eines Proteasoms in diesen Organismen auch die Evolution des Pupyloms beeinflusst. Natürlich kann eine weitere Erklärung sein, dass von manchen Proteinen, deren Homologe in einem Actinobakterium pupyliert sind, aufgrund von schwacher Ionisierung bei der massenspektrometrischen Detektion kein pupyliertes Peptid identifiziert werden konnte. Ein Beispiel hierfür ist Dps, das in dieser Arbeit z. B. nur mittels MALDI-TOF/TOF-MS als pupyliert identifiziert werden konnte (Tabelle 5). Wie aber die Daten aus dieser und den erwähnten anderen Studien deutlich zeigen, scheinen die durch die Pupylieung betroffenen Stoffwechselwege innerhalb der Actinobakterien konserviert zu sein. Vergleichbar mit den vier publizierten Pupylomen aus *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, and *R. erythropolis* (Watrous *et al.*, 2010, Festa *et al.*, 2010, Poulsen *et al.*, 2010, Yun *et al.*, 2012) sind mehr als die Hälfte der pupylierten Proteine aus *C. glutamicum* in den Metabolismus (Abbildung 10) oder die Translation involviert. Erwähnenswert ist, dass, im Gegensatz zu den beiden Mycobakterien, in *C. glutamicum* fast keine pupylierten Proteine aus dem Lipid-Metabolismus gefunden werden konnten. Die einzige Ausnahme davon bildet die Acyl-CoA-Synthase FadD2, die in *C. glutamicum* ein putatives Ziel ist (Tabelle A8 im Anhang). Dazu ist jedoch anzumerken, dass z. B. in *M. smegmatis* sechs von sieben Proteinen des Genclusters der Typ-II-Fettsäuresynthese pupyliert sind (Watrous *et al.*, 2010), während *C. glutamicum* nur zwei Typ-I-Fettsäuresynthasen besitzt (Radmacher *et al.*, 2005).

Um ein möglichst vollständiges Bild der pupylierten Proteine in diesem Organismus zu erhalten, wäre es notwendig, Pupylome unter verschiedensten Wachstumsbedingungen zu reinigen und mittels MS/MS zu untersuchen, da Pupylome, wie bereits erwähnt, dynamisch sind. Während dieser Arbeit wurde eine *in-vitro*-Pupylieung mit rekombinant hergestelltem Pup und PafA etabliert. Damit können in Zukunft auch Proteine, für die keine pupylierten Peptide

nachgewiesen werden können, auf eine Pupylierung untersucht werden. Die *in-vitro*-Pupylierung könnte auch helfen, Pup-abhängige Regulation von Enzymaktivitäten zu untersuchen. *In vitro*-Untersuchungen mit Enzymen aus *R. erythropolis* konnten zeigen, dass die pupylierte Pyrophosphatase eine um die Hälfte geringere Aktivität als die depupylierte Variante aufwies (Yun *et al.*, 2012). Das könnte bedeuten, dass die Pupylierung teilweise eine nur modulierende Wirkung auf Enzymaktivitäten unabhängig von einer Erkennung durch ARC hat, ähnlich wie die Phosphorylierung (Kapitel 1.1). Bei der großen Zahl an pupylierten Enzymen der Glycolyse, des Citratzyklus und der Aminosäurebiosynthese wäre es eine interessante Vorstellung, wenn die Pupylierung Stoffflüsse beeinflusst. Eine Beobachtung in Bezug auf die Δpup -Mutante war, dass diese, bezogen auf die Zellmasse, im Vergleich zum WT neunmal so viel Acetat sekretierte (Tabelle 6). Einerseits könnte das der Reprimierung von *ackA* und *pta* durch RipA geschuldet sein, andererseits sind die Acetat-Kinase und auch die Acetyl-CoA:CoA-Transferase Act (Veit *et al.*, 2009), die CoA von Acetyl-CoA auf Succinat übertragen kann, Ziele der Pupylierung. Eventuell hat die fehlende Regulation durch Pup die Enzymaktivitäten dieser Acetat-bildenden Enzyme beeinflusst. Messungen von Enzymaktivitäten der bekannten pupylierten Enzyme aus WT und Δpup -Mutante bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen sowie die Bestimmung von gereinigten, *in vitro* pupylierten Enzymen könnten darüber neue Aufschlüsse bringen.

Bei der Vielzahl an gefundenen pupylierten oder mutmaßlich pupylierten Proteinen (Tabelle 5 bzw. Tabelle A8 im Anhang) könnte sich schließlich auch die Frage aufdrängen, unter welchen Bedingungen deren Pupylierung eine physiologische Rolle in *C. glutamicum* hat. Sind dies experimentelle Artefakte durch die Überexpression von *pup*, da man auch ein künstliches Pupylom aus *E. coli* reinigen konnte (Cerdeira-Maira *et al.*, 2011)? In Bezug auf die Pupylierung von Ftn und Dps unter Eisenmangel trifft dies jedenfalls nicht zu.

4.3 Physiologische Untersuchungen von *C. glutamicum* unter Eisenmangel

4.3.1 Die Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps in *C. glutamicum*

Eisen ist essentiell für die Zelle, da eine Vielzahl von wichtigen Zentralstoffwechsellenzymen, wie die des Citratzyklus (Bott, 2007) oder der verzweigten Atmungskette (Niebisch & Bott, 2001), von Eisen abhängig sind. Die Gründe für die Bedeutung von Eisen sind die große Variabilität der möglichen Redoxpotentiale je nach Art des Cofaktors (-500 bis +600 mV) und die Eigenschaft, leicht Elektronen aufzunehmen oder abzugeben (Andrews *et al.*, 2003). Bei Anwesenheit von Sauerstoff kann jedoch eine Eisen-katalysierte Haber-Weiß-Reaktion ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \xrightarrow{\text{Fe}} \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{O}_2$) ablaufen, bei der für die Zelle schädliche Hydroxylradikale entstehen. Eisenspeicherproteine oxidieren freies Eisen(II) kontrolliert zu Eisen(III) und lagern es einfach verfügbar in ihrem Kern. Dadurch kann die Zelle die schlechte Löslichkeit

von Eisen(III) von rund 10^{-18} M bei pH 7 und die Radikalbildung durch freies Eisen(II) in der Zelle umgehen (Bou-Abdallah, 2010). Diese Eisenspeicherproteine dienen einerseits dem Schutz vor oxidativem Stress und andererseits als Eisenspeicher, der unter Eisen-reichen Bedingungen Eisen einlagert, um als Depot für Eisenmangelbedingungen verfügbar zu sein (Andrews *et al.*, 2003). Die Aufgabe der Speicherung wird vornehmlich von den „großen“, 24-meren Ferritinen, von denen *C. glutamicum* eines besitzt, übernommen (Andrews *et al.*, 2003). *C. glutamicum* besitzt zusätzlich zu Ferritin das DNA-Schutzprotein Dps, das im Gegensatz zu den „großen“ Ferritinen nur 12-mer ausbildet (Ilari *et al.*, 2000). Dps schützt beispielsweise in *E. coli* die DNA hauptsächlich vor oxidativen Schäden, indem es an diese bindet, Eisen abfängt und für die Oxidation des Eisens H_2O_2 benutzt (Zhao *et al.*, 2002). Diese wichtigen Aufgaben legten vor dieser Arbeit natürlich nahe, dass die Deletion eines oder beider Eisenspeicherproteine Auswirkungen auf das Wachstum von *C. glutamicum* sowohl bei hohen als auch bei geringen Eisenmengen haben müsste.

Unter Standard-Eisenkonzentrationen (36 μ M Eisen(II)-sulfat) und unter erhöhten Eisenkonzentrationen (150 μ M Eisen(II)-sulfat) zeigten weder die Δ *ftn*-, noch die Δ *dps*- oder die Δ *ftn* Δ *dps*-Mutante ein gegenüber dem WT verändertes Wachstum. Dass die Abwesenheit von Ferritinen aber nicht zwangsläufig Auswirkungen auf das Wachstum unter normalen und erhöhten Eisenkonzentrationen haben muss, ist auch von der Δ *ftnA*-Mutante aus *E. coli* bekannt, die selbst in Anwesenheit von 1 mM Eisencitrat keinen Wachstumsdefekt aufwies (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Eine Ferritin-Deletionsmutante (Δ *bfrB*) von *M. tuberculosis* erreichte im Gegensatz dazu in Gegenwart hoher Eisenkonzentrationen ($> 80 \mu$ M Fe^{3+}) nur rund 40% der Biomasse des WTs (Pandey & Rodriguez, 2012). In *C. glutamicum* könnte die DtxR-abhängige Repression der Eisenaufnahmesysteme (Brune *et al.*, 2006, Wennerhold & Bott, 2006) dafür sorgen, dass bei erhöhten intrazellulären Eisenkonzentrationen unabhängig von der Eisenkonzentration im Medium die Aufnahme von Eisen(III), Häm, Siderophoren und sonstigen Eisenquellen gestoppt wird. Somit könnte die Zelle einen intrazellulären Eisenüberschuss-Stress verhindern oder zumindest minimieren.

Interessanterweise führte in *C. glutamicum* unter Eisenmangel bei Anwesenheit von 1 μ M Eisen(II)-sulfat erst die Doppeldeletion in der Δ *ftn* Δ *dps*-Mutante zu einem Wachstumsdefekt mit einer um 10% niedrigeren Wachstumsrate als der des WTs (Kapitel 3.5.1). Das spricht dafür, dass eventuell eines der Speicherproteine das andere ersetzen kann, oder dass es noch weitere Eisenspeicherproteine in *C. glutamicum* gibt, die bisher unbekannt sind. Es wird deutlich, dass sowohl Dps als auch Ftn wichtig für die Eisenspeicherung sind. Der Wachstumsdefekt von *C. glutamicum* Δ *ftn* Δ *dps* war vergleichbar mit dem der *ftnA*-Deletion in *E. coli*, die zu einer leicht niedrigeren Wachstumsrate (95% des WTs) führte (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). In *M. tuberculosis* hatte die *bfrB*-Deletionsmutante jedoch unter Eisenmangel

(< 2 μM Eisen(III)) einen Wachstumsdefekt, wie schon unter Eisenüberschuss, und erreichte nur 40% der Biomasse des WT's (Pandey & Rodriguez, 2012). Wie in Kapitel 3.5.1 erwähnt, könnte *C. glutamicum* unter den gewählten Eisenmangelbedingungen am Beginn der Hauptkultur einem intrazellulären Eisenüberschuss ausgesetzt sein, da die Zellen am Beginn der Kultivierung vermehrt Eisen(II) über hochaffine Transporter aufnehmen, die sie wegen der Eisenmangelbedingungen am Ende der Vorkultur verstärkt exprimiert hatten. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass bei stärkeren Mangelbedingungen (keine Zugabe von Eisen(II) zum Medium in der Vorkultur) auch die Δftn -Mutante einen Wachstumsdefekt im Vergleich zum WT aufwies (Abbildung 18). Das würde bedeuten, dass Ftn und in Abwesenheit von Ftn auch Dps bei wechselnder Eisenverfügbarkeit Schutzmechanismen vor oxidativem Stress darstellen, der durch hohe intrazelluläre Eisenkonzentrationen in Anwesenheit von Sauerstoff entsteht. Es kann nicht pauschal gesagt werden, dass ein Ferritin oder Bacterioferritin für Eisenspeicherung als Depot oder als Schutz vor oxidativem Stress geeignet ist. Zwar konnte das z. B. für *Campylobacter jejuni*-Ferritin gezeigt werden (Wai *et al.*, 1996), es konnte aber kein Einfluss der Deletion von *ftnA* in *E. coli* auf Eisendetoxifizierung oder Redoxstress-Resistenz gezeigt werden (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von 10 mM Nitrit der mRNA-Spiegel von *ftn* im Vergleich zur Kontrolle von *C. glutamicum* ohne Nitrit vierfach erhöht war, was ein Hinweis für eine Reaktion auf durch Nitrit verursachten oxidativen oder nitrosativen Stress sein könnte und Eisen-unabhängig geschieht (Platzen *et al.*, 2014). Wie Ftn und Dps in die Antwort auf nitrosativen und oxidativen Stress involviert sind, könnte durch das Wachstum der in dieser Arbeit hergestellten Eisenspeicher-Deletionsmutanten in Anwesenheit von Nitrit weiter untersucht werden.

4.3.2 Die Rolle der Pupylierung unter Eisenmangel

Bei genauerer Betrachtung der bisherigen Ergebnisse stellt sich die Frage, warum eine *pup*-Deletion *C. glutamicum* unter Eisenlimitierung vor größere Probleme stellt als die Abwesenheit der Eisenspeicherproteine Ftn, Dps oder beider (Abbildung 21). Sowohl das Transkriptom als auch das zytosolische Proteom von *C. glutamicum* Δpup lieferten unter Eisenmangel Hinweise auf niedrigere intrazelluläre Eisenspiegel in der Mutante als im WT. Transkriptionell war eine DtxR-/RipA-abhängige Regulation (Tabelle 8) bzw. im Proteom geringere Mengen an Eisen-haltigen Proteinen wie SdhA, IlvD, KatA oder CysI (Tabelle 9) zu beobachten. Durch die Experimente dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsdefekt der Δpup -Mutante unter Eisenmangel hauptsächlich auf die fehlende Pupylierung bzw. Funktionalität von Ftn und Dps zurückzuführen war.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass nicht-pupyliertes Ftn und Dps Eisen zwar einlagern können, aber nicht wieder freisetzen, was erst durch die Pupylierung vermittelt wird. Wie in

Kapitel 4.3.1 erwähnt, könnte *C. glutamicum*, das Eisenmangel ausgesetzt war, nach Zugabe von frischem Eisen(II) dieses sehr schnell aufnehmen und so hohen intrazellulären Eisen(II)-Konzentrationen ausgesetzt sein. Durch Aufnahme von Eisen(II) in die Eisenspeicherproteine verhindern die Zellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Wenn nun Eisen(II) aus dem Medium verbraucht ist, könnte *C. glutamicum* Eisen(III) über Pupylierung wieder aus Ftn oder Dps freisetzen. Ohne Pupylierung hätte *C. glutamicum* demnach weniger Eisen zur Verfügung, da dieses in den Eisenspeicherproteinen verbleiben würde und nicht für den Stoffwechsel zur Verfügung stünde.

Über die Freisetzung von Eisen aus Eisenspeicherproteinen ist allgemein noch nicht viel bekannt. In den Gram-negativen Organismen *E. coli* und *Pseudomonas putida* konnten zwei Proteine entdeckt werden, die mutmaßlich für die Übertragung von Elektronen auf den Eisenkern und damit die Freisetzung von Eisen(II) zuständig sind (Weeratunga *et al.*, 2009, Quail *et al.*, 1996). Dies sind ein Bacterioferritin-assoziiertes Ferredoxin sowie eine NADPH-abhängige Ferredoxin-Reductase, wobei das Ferredoxin mit Bacterioferritin einen Komplex bildet, sodass der Eisen-Schwefel-Cluster des Ferredoxins Elektronen auf das Bacterioferritin übertragen kann (Yao *et al.*, 2012). Die Freisetzung von Eisen aus den Speichern wird mutmaßlich über die Transkription und dadurch die Menge an Eisen-freisetzenden Enzymen gesteuert, da unter Eisenmangel die Gene von Ferredoxin sowie der Ferredoxin-Reductase vermehrt exprimiert werden (Palma *et al.*, 2003). Für ähnliche Mechanismen in *C. glutamicum* käme als Oxidoreductase z. B. das als Bacterioferritin-assoziiertes Protein annotierte Cg2736-Protein in Frage. Dessen mRNA-Spiegel waren jedoch unter Eisenmangel im WT oder einer Δpup -Mutante nicht verändert (Tabelle 7 bzw. Tabelle 8). Eine durch Pupylierung regulierte Freisetzung von in Ftn gespeichertem Eisen würde einen völlig neuartigen Mechanismus darstellen, der jedoch trotzdem die Reduktion der Eisen-Ionen durch Ferredoxine und Oxidoreductasen wie Bcp einschließen könnte.

Um das Wachstumsverhalten der hier diskutierten Stämme unter Eisenmangel besser vergleichen zu können, wurden die Zahl der Verdopplungen sowie die Wachstumsraten dieser miteinander verglichen (Abbildung 25). Es wurden die Werte jedes einzelnen Experiments einer Mutante im Vergleich zum Mittelwert des im jeweiligen Experiment zusätzlich kultivierten biologischen Triplikats des WTs in Prozent berechnet. Der WT wurde jedes Mal erneut kultiviert, um den Vergleich unabhängig von Effekten des Mediums, wie z.B. schwankender Eisenkonzentrationen, durchzuführen. Ein Vergleich der so erhaltenen Prozentsätze ergab, dass die untersuchten Stämme nach der Anzahl der Verdopplungen in sechs Gruppen und im Hinblick auf die Wachstumsraten in vier Gruppen eingeteilt werden können (Abbildung 25).

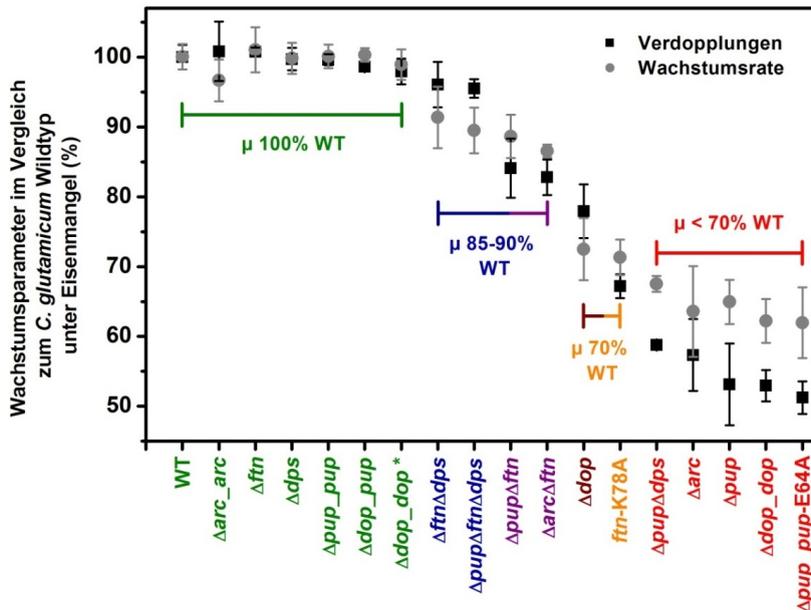


Abbildung 25. Vergleich der Wachstumsparameter Anzahl der Verdopplungen und Wachstumsrate μ aller in dieser Arbeit erstellten Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Den Stämmen mit Plasmid wurden 25 μ g/ml Kanamycin sowie 1 mM IPTG zugesetzt, mit Ausnahme des Stammes mit Sternchen, der ohne IPTG kultiviert wurde. Es wurden folgende Stämme untersucht: *C. glutamicum* ATCC 13032 WT, Δ pup, Δ arc, Δ dop, Δ ftn, Δ dps, ftn-K78A, Δ ftn Δ dps, Δ pup Δ ftn, Δ arc Δ ftn, Δ pup Δ dps sowie Δ pup Δ ftn Δ dps. Außerdem wurden Stämme mit Plasmiden, die Gene von arc, dop und pup(-E64A) trugen, eingesetzt. Für jeden Stamm wurden mindestens drei biologische Replikate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte, die in Prozent zum Mittelwert des in jedem Vergleich mitkultivierten WT-Stammes berechnet wurden, sowie die entsprechende Standardabweichung. Die Stämme wurden basierend auf Unterschieden in der Wachstumsrate in vier Gruppen (gezeigt durch Balken und μ) und nach Anzahl der Verdopplungen in sechs Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (grün), Gruppe 2 (dunkelblau), Gruppe 3 (lila), Gruppe 4 (braun), Gruppe 5 (gelb), Gruppe 6 (rot).

Die sechs Gruppen unterscheiden sich untereinander in Bezug auf die Anzahl der Verdopplungen und diese Wachstumsunterschiede lassen sich von den funktionalen Unterschieden ableiten: Stämme aus der größten Gruppe, Gruppe 1, hatten mindestens ein funktionelles Eisenspeicherprotein, sowie immer eine funktionierende Pupylierungsmaschinerie und zeigten ein mit dem WT vergleichbares Wachstum. Gruppe 2 beinhaltet Stämme ohne die Eisenspeicherproteine Ftn und Dps mit oder ohne funktionale Pupylierung. In dieser Gruppe sind erste Wachstumsdefekte erkennbar, welche durch das Fehlen der Eisenspeicherproteine verursacht werden. Den Mutanten in Gruppe 3 fehlte Ftn und diese hatten eine defekte Pupylierung, erzeugt durch die Deletion von pup oder arc. Dabei wurde erkennbar, dass in Abwesenheit von Ftn die Pupylierung von Dps, im Vergleich zu Gruppe 2, eine Rolle für die Zellen unter Eisenmangel spielt. In diesen Stämmen wurde vermutlich Eisen in Dps eingelagert und konnte nicht mehr freigegeben werden. Die Δ dop-Mutante bildet Gruppe 4, besitzt keine funktionelle Depupylierung und zeigt, dass alleine der Verlust der Depupylierung dras-

tische Auswirkungen hat, auch wenn die Eisenspeicherproteine vorhanden sind und pupyliert werden können. Das ist, wie in Kapitel 4.1.3 besprochen, wahrscheinlich auf das fehlende Recycling von Pup zurückzuführen. Gruppe 5 wird ebenfalls nur durch einen Stamm definiert, *C. glutamicum ftn-K78A*, der ein nicht pupylierbares Ftn chromosomal integriert hat. Dieser Stamm lagerte vermutlich Eisen in Ftn ein, das er aufgrund der fehlenden Pupylierung nicht mehr freigeben konnte. Die *ftn-K78A*-Mutante konnte jedoch in Dps gespeichertes Eisen durch Pupylierung freigeben und erreichte vermutlich dadurch höhere Biomassen als die Stämme in Gruppe 6. Diese bilden die zweitgrößte Gruppe und hatten immer eine defekte/gestörte Pupylierungsmaschinerie, verursacht durch Deletion von *pup* oder *arc* oder Überexpression von *dop*. Da diese Stämme Ftn oder Dps besaßen, ist ersichtlich, dass das Fehlen der Pupylierung einen negativen Effekt hatte, weil die Stämme sowohl in Ftn als auch in Dps Eisen einlagern, aber vermutlich nicht wieder freigeben konnten. Die Tatsache, dass die Rolle von Dps dabei der von Ftn untergeordnet scheint, könnte mit der Größe der Speicherkapazität zu tun haben. Während in Ftn > 4500 Eisenatome gespeichert werden können, sind es in Dps nur in der Größenordnung von 500 (Bou-Abdallah, 2010). Das bedeutet, dass Ftn natürlich viel mehr Eisen speichern kann, welches dann für Eisen-haltige Proteine nicht verfügbar ist. Wenn weder Ftn noch Dps vorhanden waren, verursachte die Deletion von *pup* keine zusätzliche Verschlechterung des Wachstums mehr, was bedeutet, dass dadurch sämtliche Wachstumsdefekte aufgrund fehlender Pupylierung aufgehoben worden waren.

4.4 Putativer Pup-vermittelter Mechanismus der Eisenfreisetzung aus Ftn und Dps

Doch wie könnte ein Mechanismus aussehen, über den Pupylierung Eisen aus Eisenspeicherproteinen freisetzt? Da die 2D-Gele (Tabelle 9) und Western-Blots (Abbildung 22) aus dieser Arbeit keine Akkumulation von Ftn im Δpup -Stammhintergrund zeigten, muss über Degradations-unabhängige Mechanismen nachgedacht werden. Dies soll anhand von Ftn diskutiert werden, wobei der beschriebene Modell-Mechanismus genauso auf Dps anwendbar ist. Bei genauerer Betrachtung der Bindestelle von Pup an Ftn fällt auf, dass diese sich an einer Schleifen-Region zwischen Helix 2 und 3 eines Ftn-Monomers befindet (Abbildung 23). Dies ist ein von außen gut zugänglicher Bereich an der Proteinoberfläche, selbst wenn sich Oligomere ausbilden. Ein mögliches Szenario wäre eine Regulation von Ftn durch die Pupylierung ähnlich wie sie für Mpa in *M. tuberculosis* beschrieben wurde (Delley *et al.*, 2012). Die Pupylierung von Mpa führt zu einer Dissoziation von Mpa-Hexameren vom Proteasom. Dadurch wird das Mpa-Hexamer selbst von anderen Mpa-Hexameren erkannt, wodurch das pupylierte Mpa deoligomerisiert wird. Dies bildet vermutlich einen *feedback*-Mechanismus, der verhindert, dass der Abbau pupylierter Proteine permanent andauert (Kapitel 1.3.2). Durch das „Herausziehen“ und die Entfaltung eines pupylierten Monomers von

Ftn könnte eine Pore entstehen und diese den Zugang von Proteinen, die durch Übertragung von Elektronen auf den Eisenkern an der Freisetzung von Eisen beteiligt sind, in das Ftn-Oligomer erleichtern (die Bindung von Ftn an ARC ist in Abbildung 26 gezeigt). Vielleicht zerfällt durch die Entfaltung eines oder mehrerer Monomere auch das gesamte Ftn- bzw. Dps-Oligomer und macht so den Eisenkern zugänglich. Die Monomere des deoligomerisierten Eisenspeicherproteins könnten daraufhin nach einer Depupylierung wieder assemblieren.

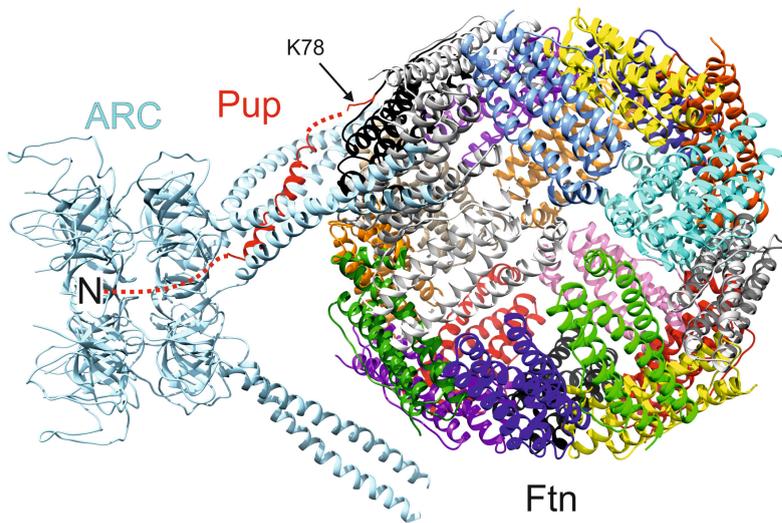


Abbildung 26. Schema der Erkennung von pupyliertem Ferritin durch ARC. An Lys78 pupyliertes Ferritin wird durch ARC erkannt, indem eine der drei *Coiled-Coil*-Strukturen Pup bindet. Daraufhin wird der N-terminale Teil von Pup in die zentrale Pore von ARC eingefädelt (Kapitel 1.3.2). Es sind die Strukturen des ARC-Homologs Mpa (ohne ATPase-Domänen, hellblau) mit dem erkannten Teil von Pup (rot) aus *M. tuberculosis* (PDB: **3M9D**) sowie das Ferritin-Homolog BfrB (PDB: **3OJ5**) dargestellt. Ein Monomer von BfrB wurde durch ein modelliertes Monomer von *C. glutamicum* Ftn (Cg2782, schwarz) ersetzt. Die Struktur des Ftn-Monomers wurde durch ein *Alignment* der Aminosäuresequenz von Ftn mit der von BfrB modelliert. Dazu wurde die Software Chimera benutzt (Pettersen *et al.*, 2004). Ein Pfeil markiert den pupylierten Lysin-Rest in Ftn. Durch rote Punkte sind jene N-terminalen (N) bzw. C-terminalen Abschnitte von Pup gezeigt, die in der Struktur nicht enthalten sind.

Wodurch dieser postulierte Mechanismus speziell ausgelöst wird, sodass Eisen freigesetzt wird, oder ob die Freisetzung einfach permanent abläuft, und so eine besondere physiologische Relevanz unter Eisenmangelbedingungen hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht beantwortet werden. Die Transkriptomanalysen dieser Arbeit unter Eisenmangel sprechen gegen eine transkriptionelle Regulation der Pupylierungsmaschinerie, da es keine signifikanten Veränderungen der Transkriptmengen von *pup*, *dop*, *arc* oder *pafA* gab (Tabelle 7, Tabelle 8). Eine Möglichkeit, die Freisetzung zu steuern, wäre eine Komplexbildung von PafA und Mpa/ARC, denn vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Mpa und PafA aus *M. smegmatis* *in vitro* und *in vivo* einen Komplex bilden können (Forer *et al.*, 2013). Dem-

nach könnte eine Freisetzung vermehrt stattfinden, wenn Ftn durch PafA pupyliert und sofort von ARC erkannt und entfaltet wird.

Der hier vorgeschlagene Mechanismus würde sicherstellen, dass *C. glutamicum* sofort auf schwankende Eisen-Konzentrationen reagieren kann. Wenn nach einer Phase der Eisenlimitierung größere Eisenmengen zur Verfügung stehen und schnell ins Cytoplasma transportiert werden, können Ferritin und Dps jederzeit Eisen einlagern, welches später durch Pupylie- rung wieder freigesetzt werden kann. Dadurch kann *C. glutamicum* sich vor durch freies Ei- sen(II) ausgelöstem oxidativem Stress schützen, aber dennoch soviel Eisen wie nötig auf- nehmen, um seine Enzyme optimal mit diesem zu versorgen.

In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass es theoretisch eine Reihe von Lysin-Resten in den homologen Proteinen von Ftn und Dps aus anderen Actinobakterien gibt, die an der Oberflä- che der Eisenspeicherproteine liegen, auch wenn bis dato nur die Pupylie- rung von BfrB aus *M. smegmatis* eindeutig nachgewiesen werden konnte (Watrous *et al.*, 2010). Das könnte bedeuten, dass die Pupylie- rung und anschließende Eisenspeicherung durch Entfaltung auch in anderen Actinobakterien, besonders unter Eisenmangel, notwendig ist, speziell in *M. tuberculosis*, das als intrazellulärer, pathogener Organismus auf Eisen des Wirtsorganis- mus und gute Eisenspeicherproteine angewiesen ist (Reddy *et al.*, 2012). Deshalb beinhaltet z. B. ein Teil der humanen Immunantwort auch den Interferon- γ -vermittelten Entzug von Ei- sen in Makrophagen (Byrd & Horwitz, 1993). Ob die Pupylie- rung in *M. tuberculosis* ebenfalls die Eisenspeicherung aus den Speicherproteinen kontrolliert, muss untersucht werden, um gegebenenfalls neue Möglichkeiten für die Bekämpfung dieses humanpathogenen Erregers zu erhalten.

ACCIDIT IN PUNCTO QUOD NON SPERATUR IN ANNO

5 Literaturverzeichnis

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y.S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., *et al.*, (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**: 1415-1428.
- Abe, S., Takayama, K.I. & Kinoshita, S., (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Ajinomoto Co., I., (2013a) 1H-FY2013 Market and other information. http://www.ajinomoto.com/en/ir/pdf/1H-FY13_data_E.pdf.
- Ajinomoto Co., I., (2013b) Feed-Use Amino Acids Business. <http://www.ajinomoto.com/en/ir/pdf/Feed-useAA-Oct2013>.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J., (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodriguez-Quinones, F., (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 215-237.
- Barandun, J., Delley, C.L., Ban, N. & Weber-Ban, E., (2013) Crystal structure of the complex between prokaryotic ubiquitin-like protein and its ligase PafA. *J. Am. Chem. Soc.* **135**: 6794-6797.
- Barandun, J., Delley, C.L. & Weber-Ban, E., (2012) The pupylation pathway and its role in mycobacteria. *BMC Biol.* **10**: 95.
- Bianchi, D., Bertrand, O., Haupt, K. & Coello, N., (2001) Effect of gluconic acid as a secondary carbon source on non-growing L-lysine producers cells of *Corynebacterium glutamicum*. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Enzyme. Microb. Technol.* **28**: 754-759.
- Bosco, G., (2011). Doktorarbeit: Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum*. Durchgeführt am IBG-1, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Bott, M., (2007) Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends Microbiol.* **15**: 417-425.

- Bott, M. & Brocker, M., (2012) Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1131-1150.
- Bou-Abdallah, F., (2010) The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**: 719-731.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brazma, A., (2009) Minimum information about a microarray experiment (MIAME) - Successes, Failures, Challenges. *ScientificWorldJournal* **9**: 420-423.
- Brune, I., Werner, H., Hüser, A.T., Kalinowski, J., Pühler, A. & 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.
- Burkovski, A., (2008) *Corynebacteria: genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Burns, K.E., Cerda-Maira, F.A., Wang, T., Li, H., Bishai, W.R. & Darwin, K.H., (2010a) "Depupylation" of prokaryotic ubiquitin-like protein from mycobacterial proteasome substrates. *Mol. Cell* **39**: 821-827.
- Burns, K.E. & Darwin, K.H., (2010) Pupylation versus ubiquitylation: tagging for proteasome-dependent degradation. *Cell. Microbiol.* **12**: 424-431.
- Burns, K.E., Liu, W.T., Boshoff, H.I.M., Dorrestein, P.C. & Barry, C.E., (2008) Proteasomal protein degradation in mycobacteria is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein. *J. Biol. Chem.* **284**: 3069-3075.
- Burns, K.E., Pearce, M.J. & Darwin, K.H., (2010b) Prokaryotic ubiquitin-like protein provides a two-part degron to *Mycobacterium* proteasome substrates. *J. Bacteriol.* **192**: 2933-2935.
- Busche, T., Šilar, R., Pičmanová, M., Pátek, M. & Kalinowski, J., (2012) Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **13**: 445.

- Bussmann, M., Baumgart, M. & Bott, M., (2010) RosR (Cg1324), a hydrogen peroxide-sensitive MarR-type transcriptional regulator of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **285**: 29305-29318.
- Byrd, T.F. & Horwitz, M.A., (1993) Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *J. Clin. Investig.* **91**: 969-976.
- Castagnoli, L., Vetriani, C., Gonfloni, S., Felici, F., Vispo, N.S. & Cesareni, G., (1993) Selection from a peptide library of the antigenic determinants of a protein. *Year Immunol.* **7**: 41-49.
- Cerda-Maira, F. & Darwin, K.H., (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* proteasome: more than just a barrel-shaped protease. *Microbes Infect.* **11**: 1150-1155.
- Cerda-Maira, F.A., McAllister, F., Bode, N.J., Burns, K.E., Gygi, S.P. & Darwin, K.H., (2011) Reconstitution of the *Mycobacterium tuberculosis* pupylation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO Rep.* **12**: 863-870.
- Cerda-Maira, F.A., Pearce, M.J., Fuortes, M., Bishai, W.R., Hubbard, S.R. & Darwin, K.H., (2010) Molecular analysis of the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) conjugation pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **77**: 1123-1135.
- Chater, K.F., (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361**: 761-768.
- Chen, X., Qiu, J.D., Shi, S.P., Suo, S.B. & Liang, R.P., (2013) Systematic analysis and prediction of pupylation sites in prokaryotic proteins. *PLoS One* **8**: e74002.
- Chen, X., Solomon, W.C., Kang, Y., Cerda-Maira, F., Darwin, K.H. & Walters, K.J., (2009) Prokaryotic ubiquitin-like protein Pup is intrinsically disordered. *J. Mol. Biol.* **392**: 208-217.
- Ciechanover, A., Hod, Y. & Hershko, A., (2012) A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. 1978. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**: 565-570.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.*, (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.

- CoryneRegNet, (2013) Database and platform for corynebacterial transcription factors and gene regulatory networks. <http://www.coryneregnet.de>.
- Cuanalo-Contreras, K., Mukherjee, A. & Soto, C., (2013) Role of protein misfolding and proteostasis deficiency in protein misfolding diseases and aging. *Int. J. Cell Biol.* **2013**: 638083.
- Darwin, K.H., (2009) Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 485-491.
- Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Weich, N. & Nathan, C.F., (2003) The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science* **302**: 1963-1966.
- De Mot, R., Schoofs, G. & Nagy, I., (2007) Proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants affected in the proteasome system reveals changes in stress-responsive proteins. *Arch. Microbiol.* **188**: 257-271.
- Delley, C.L., Striebel, F., Heydenreich, F.M., Özcelik, D. & Weber-Ban, E., (2012) Activity of the mycobacterial proteasomal ATPase Mpa is reversibly regulated by pupylation. *J. Biol. Chem.* **287**: 7907-7914.
- Eggeling, L. & Bott, M., (2005) *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M. & 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 sigmaH. *Mol. Microbiol.* **52**: 285-302.
- Festa, R.A., Jones, M.B., Butler-Wu, S., Sinsimer, D., Gerads, R., Bishai, W.R., *et al.*, (2011) A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **79**: 133-148.
- Festa, R.A., McAllister, F., Pearce, M.J., Mintseris, J., Burns, K.E., Gygi, S.P. & Darwin, K.H., (2010) Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **5**: e8589.
- Festa, R.A., Pearce, M.J. & Darwin, K.H., (2007) Characterization of the proteasome accessory factor (*pag*) operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **189**: 3044-3050.

- Flores-Valdez, M.A., Morris, R.P., Laval, F., Daffé, M. & Schoolnik, G.K., (2009) *Mycobacterium tuberculosis* modulates its cell surface via an oligopeptide permease (Opp) transport system. *FASEB J.* **23**: 4091-4104.
- Follmann, M., Ochrombel, I., Krämer, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Rückert, C., *et al.*, (2009) Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* **10**: 621.
- Forer, N., Korman, M., Elharar, Y., Vishkautzan, M. & Gur, E., (2013) Bacterial proteasome and PafA, the Pup ligase, interact to form a modular protein tagging and degradation machine. *Biochemistry* **52**: 9029-9035.
- Fränzel, B., Trötschel, C., Rückert, C., Kalinowski, J., Poetsch, A. & Wolters, D.A., (2010) Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. *Proteomics* **10**: 445-457.
- Frunzke, J., Bramkamp, M., Schweitzer, J.E. & Bott, M., (2008) Population Heterogeneity in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 caused by prophage CGP3. *J. Bacteriol.* **190**: 5111-5119.
- Gao, B. & Gupta, R.S., (2012) Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 66-112.
- Gupta, R.S., (2001) The branching order and phylogenetic placement of species from completed bacterial genomes, based on conserved indels found in various proteins. *Int. Microbiol.* **4**: 187-202.
- Guth, E., Thommen, M. & Weber-Ban, E., (2011) Mycobacterial ubiquitin-like protein ligase PafA follows a two-step reaction pathway with a phosphorylated Pup intermediate. *J. Biol. Chem.* **286**: 4412-4419.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hermann, T., (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172.
- Hernández-Pando, R., Jeyanathan, M., Mengistu, G., Aguilar, D., Orozco, H., Harboe, M., *et al.*, (2000) Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* **356**: 2133-2138.

- Herzberg, C., Weidinger, L.A., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. & Commichau, F.M., (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* **7**: 4032-4035.
- Hochstrasser, M., (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**: 422-429.
- Ikeda, M. & Nakagawa, S., (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 99-109.
- Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E. & Tsernoglou, D., (2000) The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 38-43.
- Imkamp, F., Rosenberger, T., Striebel, F., Keller, P.M., Amstutz, B., Sander, P. & Weber-Ban, E., (2009) Deletion of *dop* in *Mycobacterium smegmatis* abolishes pupylation of protein substrates *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **75**: 744-754.
- Imkamp, F., Striebel, F., Sutter, M., Özcelik, D., Zimmermann, N., Sander, P. & Weber-Ban, E., (2010) Dop functions as a depupylase in the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway. *EMBO Rep.* **11**: 791-797.
- Iyer, L.M., Burroughs, A.M. & Aravind, L., (2008) Unraveling the biochemistry and provenance of pupylation: a prokaryotic analog of ubiquitination. *Biol. Direct* **3**: 45.
- Jackson, S.E., (2006) Ubiquitin: a small protein folding paradigm. *Org. Biomol. Chem.* **4**: 1845-1853.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G. & Wohlleben, W., (1992) Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **174**: 5462-5465.
- Jones, B.N. & Gilligan, J.P., (1983) *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* **266**: 471-482.
- Kabus, A., Niebisch, A. & Bott, M., (2007) Role of cytochrome *bd* oxidase from *Corynebacterium glutamicum* in growth and lysine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 861-868.

- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., *et al.*, (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.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H., (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.
- Kim, J.S. & Holmes, R.K., (2012) Characterization of OxyR as a negative transcriptional regulator that represses catalase production in *Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS One* **7**: e31709.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M., (1957) Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Klaffl, S., Brocker, M., Kalinowski, J., Eikmanns, B.J. & Bott, M., (2013) Complex regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* and characterization of its GntR-type regulator IoIR as a repressor of *myo*-inositol utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **195**: 4283-4296.
- Knipfer, N. & Shrader, T.E., (1997) Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **25**: 375-383.
- Koch-Koerfges, A., Kabus, A., Ochrombel, I., Marin, K. & Bott, M., (2012) Physiology and global gene expression of a *Corynebacterium glutamicum* ΔF_1F_0 -ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**: 370-380.
- Lamichhane, G., Raghunand, T.R., Morrison, N.E., Woolwine, S.C., Tyagi, S., Kandavelou, K. & Bishai, W.R., (2006) Deletion of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue gene produces a slow-growing strain that persists in host tissues. *J. Infect. Dis.* **194**: 1233-1240.
- Lanéelle, M.A., Tropis, M. & Daffé, M., (2013) Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 9923-9930.
- Liao, S., Shang, Q., Zhang, X., Zhang, J., Xu, C. & Tu, X., (2009) Pup, a prokaryotic ubiquitin-like protein, is an intrinsically disordered protein. *Biochem. J.* **422**: 207-215.

- Liu, Z., Ma, Q., Cao, J., Gao, X., Ren, J. & Xue, Y., (2011) GPS-PUP: computational prediction of pupylation sites in prokaryotic proteins. *Mol. Biosyst.* **7**: 2737-2740.
- Lüdke, A., Krämer, R., Burkovski, A., Schluesener, D. & Poetsch, A., (2007) A proteomic study of *Corynebacterium glutamicum* AAA+ protease FtsH. *BMC Microbiol.* **7**: 6.
- MacMicking, J., Xie, Q.W. & Nathan, C., (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.
- Maldonado, A.Y., Burz, D.S., Reverdatto, S. & Shekhtman, A., (2013) Fate of Pup inside the Mycobacterium Proteasome Studied by in-Cell NMR. *PLoS One* **8**: e74576.
- Maupin-Furlow, J.A., (2013) Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends Microbiol.* **21**: 31-38.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- Niebisch, A. & 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. & 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.
- Özcelik, D., Barandun, J., Schmitz, N., Sutter, M., Guth, E., Damberger, F.F., *et al.*, (2012) Structures of Pup ligase PafA and depupylase Dop from the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway. *Nat. Commun.* **3**: 1014.
- Palma, M., Worgall, S. & Quadri, L.E., (2003) Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Arch. Microbiol.* **180**: 374-379.
- Pandey, R. & Rodriguez, G.M., (2012) A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice. *Infect. Immun.* **80**: 3650-3659.
- Pappin, D.J., Hojrup, P. & Bleasby, A.J., (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**: 327-332.

- Pearce, M.J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S.P. & Darwin, K.H., (2008) Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **322**: 1104-1107.
- Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Mockel, B., Sahm, H. & Eikmanns, B.J., (2001) Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 295-300.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E., (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**: 1605-1612.
- Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Rückert, C. & Kalinowski, J., (2013) Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genomics* **14**: 888.
- Platzen, L., Koch-Koerfges, A., Weil, B., Brocker, M. & Bott, M., (2014) Role of flavohaemoprotein Hmp and nitrate reductase NarGHJI of *Corynebacterium glutamicum* for coping with nitrite and nitrosative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **350**: 239-248.
- Polen, T., Schluesener, D., Poetsch, A., Bott, M. & Wendisch, V.F., (2007) Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**: 109-119.
- Polen, T. & Wendisch, V.F., (2004) Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**: 215-232.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G., (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M. & Guilhot, C., (2004) A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 314-319.
- Poulsen, C., Akhter, Y., Jeon, A.H.-W., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Stefanski, A., et al., (2010) Proteome-wide identification of mycobacterial pupylation targets. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 386.

- Quail, M.A., Jordan, P., Grogan, J.M., Butt, J.N., Lutz, M., Thomson, A.J., *et al.*, (1996) Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 635-642.
- Radmacher, E., Alderwick, L.J., Besra, G.S., Brown, A.K., Gibson, K.J., Sahm, H. & Eggeling, L., (2005) Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **151**: 2421-2427.
- Reddy, P.V., Puri, R.V., Khera, A. & Tyagi, A.K., (2012) Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection. *J. Bacteriol.* **194**: 567-575.
- Rehm, N., Georgi, T., Hiery, E., Degner, U., Schmiedl, A., Burkovski, A. & Bott, M., (2010) L-Glutamine as a nitrogen source for *Corynebacterium glutamicum*: derepression of the AmtR regulon and implications for nitrogen sensing. *Microbiology* **156**: 3180-3193.
- Reuters, S., (2014). Masterarbeit: Regulation des *pup*-Operons in *Corynebacterium glutamicum*. Durchgeführt am IBG-1, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Rhee, K.Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Nathan, C.F., (2005) S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 467-472.
- Sambrook, J., MacCallum, P. & Russell, D.W., (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sauer, R.T. & Baker, T.A., (2011) AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 587-612.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & 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., *et al.*, (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 4404-4422.

- Schreiner, M.E., Fiur, D., Holátko, J., Pátek, M. & Eikmanns, B.J., (2005) E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects. *J. Bacteriol.* **187**: 6005-6018.
- Schreiner, M.E., Riedel, C., Holátko, J., Pátek, M. & Eikmanns, B.J., (2006) Pyruvate:quinone oxidoreductase in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *pqo* gene, significance of the enzyme, and phylogenetic aspects. *J. Bacteriol.* **188**: 1341-1350.
- Schröder, J. & Tauch, A., (2010) Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 685-737.
- Schultz, C., Niebisch, A., Gebel, L. & Bott, M., (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 691-700.
- Schweitzer, J.-E., (2007). Doktorarbeit: Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum*. Durchgeführt am IBG-1, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N., *et al.*, (2006) Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ. Microbiol.* **8**: 334-346.
- Skerra, A. & Schmidt, T.G., (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**: 271-304.
- Smirnov, D., Dhall, A., Sivanesam, K., Sharar, R.J. & Chatterjee, C., (2013) Fluorescent probes reveal a minimal ligase recognition motif in the prokaryotic ubiquitin-like protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**: 2887-2890.
- Spasser, L. & Brik, A., (2012) Chemistry and biology of the ubiquitin signal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**: 6840-6862.
- Striebel, F., Hunkeler, M., Summer, H. & Weber-Ban, E., (2010) The mycobacterial Mpa-proteasome unfolds and degrades pupylated substrates by engaging Pup's N-terminus. *EMBO J.* **29**: 1262-1271.

- Striebel, F., Imkamp, F., Özcelik, D. & Weber-Ban, E., (2014) Pupylation as a signal for proteasomal degradation in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 103-113.
- Striebel, F., Imkamp, F., Sutter, M., Steiner, M., Mamedov, A. & Weber-Ban, E., (2009) Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 647-651.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A., (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Sutter, M., Damberger, F.F., Imkamp, F., Allain, F.H.T. & Weber-Ban, E., (2010) Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is coupled to substrates via the side chain of its C-terminal glutamate. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 5610-5612.
- Sutter, M., Striebel, F., Damberger, F.F., Allain, F.H.T. & Weber-Ban, E., (2009) A distinct structural region of the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is recognized by the N-terminal domain of the proteasomal ATPase Mpa. *FEBS Lett.* **583**: 3151-3157.
- Takatsuka, M., Osada-Oka, M., Satoh, E.F., Kitadokoro, K., Nishiuchi, Y., Niki, M., *et al.*, (2011) A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One* **6**: e20985.
- Tao, X. & Murphy, J.R., (1994) Determination of the minimal essential nucleotide sequence for diphtheria tox repressor binding by in vitro affinity selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 9646-9650.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A. & Kalinowski, J., (2002) Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr. Microbiol.* **45**: 362-367.
- Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H., (2013) OxyR acts as a transcriptional repressor of hydrogen peroxide-inducible antioxidant genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *FEBS J.* **280**: 3298-3312.
- Tropis, M., Meniche, X., Wolf, A., Gebhardt, H., Strelkov, S., Chami, M., *et al.*, (2005) The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae*. *J. Biol. Chem.* **280**: 26573-26585.

- Veit, A., Rittmann, D., Georgi, T., Youn, J.W., Eikmanns, B.J. & Wendisch, V.F., (2009) Pathway identification combining metabolic flux and functional genomics analyses: acetate and propionate activation by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **140**: 75-83.
- Vogt, M., Haas, S., Klaffl, S., Polen, T., Eggeling, L., van Ooyen, J. & Bott, M., (2014) Pushing product formation to its limit: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction. *Metab. Eng.* **22**: 40-52.
- Wai, S.N., Nakayama, K., Umene, K., Moriya, T. & Amako, K., (1996) Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: Contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **20**: 1127-1134.
- Wang, T., Darwin, K.H. & Li, H., (2010) Binding-induced folding of prokaryotic ubiquitin-like protein on the Mycobacterium proteasomal ATPase targets substrates for degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 1352-1357.
- Washburn, M.P., Wolters, D. & Yates, J.R., 3rd, (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**: 242-247.
- Watrous, J., Burns, K., Liu, W.-T., Patel, A., Hook, V., Bafna, V., *et al.*, (2010) Expansion of the mycobacterial "PUPylome". *Mol. Biosyst.* **6**: 376-385.
- Weeratunga, S.K., Gee, C.E., Lovell, S., Zeng, Y., Woodin, C.L. & Rivera, M., (2009) Binding of *Pseudomonas aeruginosa* apobacterioferritin-associated ferredoxin to bacterioferritin B promotes heme mediated electron delivery and mobilization of core mineral iron. *Biochemistry* **48**: 7420-7431.
- Weltgesundheitsorganisation, (2013) Global Tuberculosis Report 2013. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr13_main_text.pdf.
- Wennerhold, J. & Bott, M., (2006) The DtxR regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **188**: 2907-2918.
- Wennerhold, J., Krug, A. & Bott, M., (2005) The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under iron limitation and is itself repressed by DtxR. *J. Biol. Chem.* **280**: 40500-40508.
- Wieschalka, S., Blombach, B. & Eikmanns, B.J., (2012) Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 449-459.

- Wolters, D.A., Washburn, M.P. & Yates, J.R., 3rd, (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **73**: 5683-5690.
- Yao, H., Wang, Y., Lovell, S., Kumar, R., Ruvinsky, A.M., Battaile, K.P., *et al.*, (2012) The structure of the BfrB-Bfd complex reveals protein-protein interactions enabling iron release from bacterioferritin. *J. Am. Chem. Soc.* **134**: 13470-13481.
- Yukawa, H. & Inui, M., (2013) *Corynebacterium glutamicum Biology and Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Yun, H.Y., Tamura, N. & Tamura, T., (2012) *Rhodococcus* prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is degraded by deaminase of Pup (Dop). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 1959-1966.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E. & Chasteen, N.D., (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**: 27689-27696.
- Zhao, X., Dai, J., Ning, Q., Ma, Z., Yin, M. & Sun, P., (2013) Position-specific analysis and prediction of protein pupylation sites based on multiple features. *Biomed Res. Int.* **2013**: 109549.

6 Anhang

6.1 MALDI-TOF/TOF-MS-Daten

Tabelle A1. Peptidmassenfingerprintanalyse von Proteinbanden aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel der angereicherten Proteine 10xHis-TEV-Pup bzw. -Pup-E64A plus aller daran kovalent und nicht-kovalent gebundenen Proteine aus *C. glutamicum* Δ pup pVWEx1-pup bzw. pVWEx1-pup-E64A. *m/z*, gemessenes Verhältnis Masse/Ladung des bestimmten Peptids; Δ ppm, Abweichung zwischen der gemessenen und errechneten Masse; Position, Position des identifizierten Peptids im Protein; Zugeordnetes Peptid (des identifizierten Proteins); Sequenzabdeckung (durch alle detektierten Peptide auf identifizierten Protein); Mod., gefundene Modifikationen am Peptid.

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
1	Aconitase (Cg1737; 102,5 kDa)				9%
	913,5515	5	45 - 52	K.VLGENLLR.T	
	1579,7335	-1	146 - 157	K.NVEIEYERNEER.Y	
	1216,5432	4	163 - 172	R.WGSESFNFR.V	
	2062,1529	4	173 - 191	R.VVPPGTGIVHQVNIIEYLAR.V	
	1874,0009	0	326 - 342	R.LTGRPEEQVALVEAYAK.A	
	1547,8203	2	771 - 784	R.LQNQLVDIAGGYTR.D	
	1448,7044	2	903 - 915	K.ENGDVVEFDVAVVR.I	
2	Putatives Peptidyl-Dipeptidase A Protein (Cg2527; 73,9 kDa)				41%
	1840,9593	8	98 - 114	K.LSAHSDAIFHNAALFAR.I	
	1543,7344	7	115 - 128	R.IEAVEAPADEESQR.L	
	1107,5933	13	159 - 168	R.LSALSEQFGR.N	
	1983,946	8	176 - 193	R.DLAVNFEESELAGFSEAR.I	
	3863,9946	10	194 - 231	R.ISAAADYAAAAVGTEGYVVPLELPTVQSEQAVLTESASR.A	
	1514,8623	6	242 - 255	R.GASLNKDVLLLETVR.L	
	944,5589	19	248 - 255	K.DVLLLETVR.L	
	2837,3684	7	261 - 286	R.ATLLGYDTHADYVIEEETADDVAAVR.A	
	2061,9496	7	302 - 317	K.AEYKLSAEAEHEGQK.V	Pup (K)
	1451,7225	7	332 - 343	R.ARDYALDETEL.N	
	1224,5903	13	334 - 343	R.DYALDETEL.N	
	1263,6999	12	344 - 353	R.NYFPLNQVLR.D	
	996,5073	18	354 - 362	R.DGVFFAANR.L	
	1528,8654	11	363 - 375	R.LYGITVEPRDLR.G	
	1452,7668	5	468 - 480	K.VRYPSPFSGTSVPR.D	
	1197,6031	11	470 - 480	R.YPSFSGTSVPR.D	
	2496,2062	9	481 - 501	R.DYVEFPSQINENWAFDPVAVR.N	
	2137,09	6	506 - 525	R.HVDTGDIIPDLSLEAVEASR.Q	
	1005,6042	20	638 - 645	K.FRDLVLSR.G	
	1529,6991	8	646 - 659	R.GAASDYSNAFEELR.G	
	998,6163	17	662 - 670	R.SKDLGPLLR.R	
3	S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (Cg0860; 52,6 kDa)				25%
	1101,6013	10	9 - 19	K.VADLSLAEAGR.H	
	1550,7815	7	24 - 36	R.LAEYEMPGLMQLR.K	
	1566,7761	7	24 - 36	R.LAEYEMPGLMQLR.K	Oxidation (M)
	1582,7729	8	24 - 36	R.LAEYEMPGLMQLR.K	2 Oxidation (M)
	2694,5043	7	50 - 75	R.IAGSIHMTVQTAVLIETLTALGAEVR.W	
	2710,4968	6	50 - 75	R.IAGSIHMTVQTAVLIETLTALGAEVR.W	Oxidation(M)
	3014,423	5	152 - 178	R.EYEQAGLVPPAEANDSDEYIAFLGMLR.E	Oxidation(M)
	1286,6439	8	197 - 208	K.GVTEETTTGVHR.L	
	1024,5678	14	242 - 250	R.HSLIDGINR.A	
	1826,9415	7	365 - 380	R.TTIKPQVDEFTFSTGR.S	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)					Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	<i>Appm</i>	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.	
	973,5899	23	381 - 389	R.SIIVLSEGR.L		
4	Aspartat-Aminotransferase (Cg0294; 46,5 kDa)				65%	
	1353,6486	15	2 - 13	M.SSVSLQDFDAER.I		
	1227,7019	14	14 - 23	R.IGLFHEDIKR.K		
	2115,128	15	40 - 59	R.GKPSSEQLDFADELLALPGK.G		
	1291,6815	14	72 - 83	R.NYGGLDGIIVDIR.Q		
	2537,3171	12	182 - 204	K.GMWVVPVFSNPTGFTVTEDEVAKR.L		
	2553,312	12	182 - 204	K.GMWVVPVFSNPTGFTVTEDEVAKR.L	Oxidation (M)	
	1308,6391	11	205 - 216	R.LSAMETAAPDFR.V		
	1324,639	14	205 - 216	R.LSAMETAAPDFR.V	Oxidation (M)	
	3681,8862	18	217 - 250	R.VVWDNAYAVHTLTDEFPEVIDIVGLGEEAGNPNR.F		
	1074,5482	21	251 - 259	R.FWAFTSTSK.I		
	1853,9961	11	260 - 277	K.ITLAGAGVSFFLTSAENR.K		
	1982,0938	12	260 - 278	K.ITLAGAGVSFFLTSAENR.K.W		
	1188,6441	14	278 - 287	R.KWYTGHAIR.G		
	1060,5503	17	279 - 287	K.WYTGHAIR.G		
	1474,8417	12	288 - 301	R.GIGPNKVNQLAHAR.Y		
	908,5225	18	294 - 301	K.VNQLAHAR.Y		
	1013,4873	18	302 - 310	R.YFGDAEGVR.A		
	944,5531	13	327 - 334	K.VLEILDSR.L		
	3024,5938	16	335 - 363	R.LAEYGAQWTPAGGYFISLDVVPGTASR.V		
	1562,8341	11	370 - 385	K.EAGIALTGAGSSYPLR.Q		
	2274,1592	10	370 - 391	K.EAGIALTGAGSSYPLRQDPENK.N		
	3734,0647	46	392 - 426	K.NLRLAPSLPPVEELEVAMDG VATCVLLAAAEHYAN.-		
5	Histidinol-Dehydrogenase (Cg2305; 46,8 kDa)				40%	
	2407,2927	13	24 - 45	R.GGTDVWSVLPVQPVEDVQNR.G		
	2302,1872	13	46 - 66	R.GAEAAALDYGEKFDHIRPASVR.V		
	1197,6666	15	57 - 66	K.FDHIRPASVR.V		
	1878,0569	13	67 - 84	R.VPAEVIAAAENTLDPLVR.E		
	962,5	22	85 - 92	R.ESIEESIR.R		
	1118,5952	14	85 - 93	R.ESIEESIRR.V		
	2618,3542	14	96 - 119	R.KVHAEQKPEHTELTSPGGVTTER.F		
	2490,2544	13	97 - 119	K.VHAEQKPEHTELTSPGGVTTER.F		
	3718,9333	18	308 - 342	R.GAQSGIVLVDDISVGIQVADQYAAEHLEHTENAR.A		
	3973,0628	23	343 - 382	R.AVAEQITNAGAIIVGDFSPVPLGDYSAGSNHVLPTSGSAR.F		
	1363,6635	11	431 - 442	R.ARFENLPTTDEA.-		
6	Adenylosuccinat-Synthetase (Cg3063; 46,8 kDa)				28%	
	3734,0647	10	54 - 89	K.LLPAGVLSETATPILGNGVVINLEALFEEIDGLEAR.G		
	1921,9871	9	98 - 114	R.ISANAHLVAPYHQVMDR.V		
	1937,9886	12	98 - 114	R.ISANAHLVAPYHQVMDR.V	Oxidation(M)	
	1334,7168	16	147 - 157	R.VQDIFDESILR.Q		
	2115,128	8	178 - 195	R.KAIVAEIIVQYFLSYADR.L		
	1987,0333	8	179 - 195	K.AIVAEIIVQYFLSYADR.L		
	2374,2059	-11	331 - 352	K.LDLVTGIGEIPICVAYDVGVR.H		
	1030,5752	11	399 - 407	R.RLEELSGAR.F		
	1052,5671	14	408 - 417	R.FSYIGVGPGR.D		
7	Diaminopimelat-Decarboxylase (Cg1334; 47,4 kDa)				28%	
	1879,9705	14	2 - 17	M.ATVENFNELPAHWPR.N		
	3591,7847	13	22 - 54	R.QEDGVVTVAGVPLPLDAEEYGTPLFVVDDEDFR.S		
	2998,588	12	85 - 113	R.WVDEEGLALDIASINELGIALAAGFPASR.I		
	2374,2059	12	165 - 185	R.VKPGIEAHTHEFIATSHEDQK.F		
	1078,5297	12	359 - 368	R.FAEGDPVSTR.I		
	1479,8247	12	412 - 424	R.YNAFTRPAVVSVR.A		
	1937,9886	-22	412 - 429	R.YNAFTRPAVVSVRAGSSR.L		
8	Elongationsfaktor Tu (Cg0587; 43,9 kDa)				34%	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)	Sequenz- abdeckung			
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	2698,4232	-15	9 - 34	R.TKPHVNIGTIGHVDHGKTTTTAAITK.V	
	3097,4617	-12	35 - 61	K.VLADTYPELNEAFAFDSIDKAPEEKER.G	
	1887,9792	-7	62 - 77	R.GITINISHVEYQTEKR.H	
	2227,1623	-14	233 - 252	R.VERGLTNVNDVDIIGIKEK.S	
	2074,0095	-1	251 - 266	K.EKSTSTTVTGIEMFRK.L	Oxidation (M); Pup(K)
	1445,6817	-9	253 - 265	K.STSTTVTGIEMFRK.K	Oxidation (M)
	1573,7706	-12	253 - 266	K.STSTTVTGIEMFRK.L	Oxidation (M)
	2034,9359	-12	322 - 336	R.HTPPFDNYRPQFYFR.T	
	935,5067	1	377 - 384	R.FAIREGSR.T	
	1242,7822	-6	385 - 396	R.TVAGRVTKIIK.-	
9	Histidinolphosphat-Aminotransferase (Cg2304; 39,9 kDa)				31%
	1554,8868	1	4 - 16	K.ITLSDLPLREELR.G	
	1639,819	0	17 - 31	R.GEHAYGAPQLNVDIR.L	
	1706,8987	2	67 - 81	R.DAVELRDELAAYITK.Q	
	1303,6633	5	148 - 158	R.IDMDVALEEIR.A	
	2928,442	-6	159 - 185	R.AKQPDIVFVTPNPTGDVTSDDVER.I	
	2729,3268	0	161 - 185	K.QPDIVFVTPNPTGDVTSDDVER.I	
	1996,0656	-3	237 - 254	R.LGYFVANPAFIDAVMLVR.L	
	2012,0628	-2	237 - 254	R.LGYFVANPAFIDAVMLVR.L	Oxidation (M)
	1894,0869	-2	255 - 272	R.LPYHLSALSQAAIVALR.H	
10	Acetylmithin-Aminotransferase (Cg1583; 41,2 kDa)				9%
	1408,7287	16	91 - 103	R.FSLDDATLAAQTR.V	
	1177,6791	17	129 - 139	R.ILAAVHGFHGR.T	
	1502,851	5	354 - 367	K.HGVILNAPADNIIR.L	
11	Aspartat-Aminotransferase (Cg0294; 46,5 kDa)				23%
	1227,6909	5	14 - 23	R.IGLFHEDIKR.K	
	1291,673	7	72 - 83	R.NYGGLDGIVDIR.Q	
	1853,971	-2	260 - 277	K.ITLAGAGVSFFL TSAENR.K	
	1982,0644	-3	260 - 278	K.ITLAGAGVSFFL TSAENR.K.W	
	1188,6406	11	278 - 287	R.KWYTG HAGIR.G	
	1060,5452	12	279 - 287	K.WYTG HAGIR.G	
	3024,5345	-4	335 - 363	R.LAEYGVAQWTV PAGGYFISLDVVP GTASR.V	
	1562,8202	2	370 - 385	K.EAGIALTGAGSSYPLR.Q	
	2274,1279	-4	370 - 391	K.EAGIALTGAGSSYPLRQDPENK.N	
12	Aspartat-Aminotransferase (Cg0294; 46,5 kDa)				47%
	1353,647	14	2 - 13	M.SSVSLQDFDAER.I	
	1227,6969	10	14 - 23	R.IGLFHEDIKR.K	
	2115,1353	18	40 - 59	R.GKPSSEQLDFADELLALPGK.G	
	1291,6828	14	72 - 83	R.NYGGLDGIVDIR.Q	
	3681,8559	10	217 - 250	R.VVWDNAYAVHTLTDEFPEVIDIVGLGEAAGPNR.F	
	1074,5505	23	251 - 259	R.FWAFTSTSK.I	
	1853,9947	10	260 - 277	K.ITLAGAGVSFFL TSAENR.K	
	1982,0919	11	260 - 278	K.ITLAGAGVSFFL TSAENR.K.W	
	1188,6463	16	278 - 287	R.KWYTG HAGIR.G	
	1060,5483	15	279 - 287	K.WYTG HAGIR.G	
	908,5044	-2	294 - 301	K.VNQLAHAR.Y	
	1013,482	13	302 - 310	R.YFGDAEGVR.A	
	944,5532	13	327 - 334	K.VLEILDSR.L	
	3024,5772	10	335 - 363	R.LAEYGVAQWTV PAGGYFISLDVVP GTASR.V	
	1562,8394	14	370 - 385	K.EAGIALTGAGSSYPLR.Q	
	2274,1733	16	370 - 391	K.EAGIALTGAGSSYPLRQDPENK.N	
13	Histidinol-Dehydrogenase (Cg2305; 46,8 kDa)				46%
	2407,271	4	24 - 45	R.GGTDVWSVLPVQPVEDVQNR.G	
	1197,658	8	57 - 66	K.FDHIRPASVR.V	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1878,0295	-2	67 - 84	R.VPAEVIAAAENTLDPLVR.E	
	2618,3246	3	96 - 119	R.KVHAEQKPSEHTTELSPPGGTVTER.F	
	2490,2286	3	97 - 119	K.VHAEQKPSEHTTELSPPGGTVTER.F	
	1101,5825	16	284 - 292	K.DVNREIEAR.Y	
	3718,8603	-2	308 - 342	R.GAQSGIVLVDDISVGIQVADQYAAEHLEIHTENAR.A	
	3972,9791	2	343 - 382	R.AVAEQITNAGAI FVGDFSPVPLGDYSAGSNHVLPTSGSAR.F	
	2792,463	0	383 - 407	R.FSAGLSTHTFLRPVNLIEYDEAALK.D	
	2465,2454	1	408 - 430	K.DVSQVVINFANAEDLPAHGEAIR.A	
14	Seryl-tRNA-Synthetase (Cg3201; 46,5 kDa)				34%
	1101,5825	-7	40 - 49	R.EAIKAADDLR.A	
	2124,0987	3	59 - 78	K.IGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2628,3208	2	102 - 127	K.LSNVVS GAPAGGEDDFVLETIGEPR.T	
	1291,6727	1	303 - 313	K.EMLAAIEVPYR.V	
	1307,6666	0	303 - 313	K.EMLAAIEVPYR.V	Oxidation (M)
	1371,7121	-8	314 - 328	R.VIDVAGGDLGASAAR.K	
	1856,8853	2	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQD TYR.E	
	2390,2438	1	363 - 384	R.YRDENKPKQIAATLNGTLATTR.W	
	3049,6529	2	385 - 412	R.WLVAILENNQQADG SVVPEALRPFVKG.D	
15	Enolase (Cg1111; 44,9 kDa)				30%
	1236,6209	28	1 - 10	-.MAEIMHVFAR.E	2 Oxidation (M)
	1073,5935	35	2 - 10	M.AEIMHVFAR.E	
	3598,6984	-5	17 - 52	R.GNPTVEAEVFLDDGSHGVAGVPSGASTGVHEAHEL.R.D	
	2386,0814	-8	66 - 87	K.AVENVNEEIGDELAGLEADDQR.L	
	1188,6363	-1	120 - 131	K.AAADSAGLPLFR.Y	
	1864,9038	0	196 - 215	K.GLSTGLGDEGGFAPSVGSTR.E	
	1735,8617	-2	304 - 318	K.VQIVGDDFFVTNPER.L	
	1461,769	0	404 - 417	R.IEQLLGDAGVYAGR.S	
16	Hypothetisches Protein (Cg2715; 42,4 kDa)				30%
	1749,0361	5	30 - 45	K.IQQVVEAVIPGDVLLR.T	
	1652,8014	7	59 - 71	K.LHVDAQHEHHHR.H	
	1795,0309	5	138 - 155	R.QLNPGLIAASPIALGFGR.I	
	1156,6266	17	229 - 238	K.DTEGRPNIVR.A	
	921,5377	24	239 - 246	R.AILFNTSR.S	
	1712,8591	8	253 - 267	R.TLVQLEANVDDQDPR.L	
	1369,7643	12	314 - 326	K.TALFAATTTFGIR.S	
	1751,8185	6	357 - 371	R.DDQVISAQSEFEDIR.S	
	1073,6142	18	372 - 382	R.SAAVALGISER.E	
17	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (Cg0403; 38,1 kDa)				15%
	1779,9647	-6	2 - 19	M.TSLLVTGGAGFIGANFVR.Q	
	1361,7072	0	155 - 166	K.AGSDHLVHAWIR.S	
	1408,7029	-14	307 - 317	R.KGLEQTIDWYR.E	
	1280,6254	-1	308 - 317	K.GLEQTIDWYR.E	
	1286,6253	-2	318 - 327	R.ENEAWWRPAK.N	
18	Ferritin (Cg2781; 18,1 kDa)				62%
	1397,7188	12	46 - 57	K.AQSKEELEHAQK.F	
	999,5622	25	58 - 65	K.FAQHLLDR.D	
	3697,8293	2	66 - 97	R.DYTPQIGDIAPPKLDVTS AIEAFEASLAHEQK.I	Pup (K)
	1723,8304	10	104 - 118	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	2703,3817	11	119 - 141	R.ALIDWFLNEQIEEEATVGEIIDR.L	
	1045,5851	20	144 - 154	R.IAGDSGSGILR.I	
19	Mangelinduziertes DNA-Schutzprotein (Cg3327; 18,4 kDa)				40%
	2801,4396	25	2 - 24	M.ANYTVPGINENDAKQLIDGLQER.L	Pup (K)
	1833,9627	9	72 - 90	R.ISTLGGAPVGTPEGHVADR.T	
	1522,7879	10	98 - 111	R.NAGNVQAHLTDLNR.V	
	1135,6649	16	112 - 121	R.VYTQVLTGVR.E	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
20	Mangelinduziertes DNA-Schutzprotein (Cg3327; 18,4 kDa)				41%
	1071,5931	13	16 - 24	K.QLIDGLQER.L	
	1009,4679	9	63 - 71	R.GYADEVAER.I	
	1833,949	2	72 - 90	R.ISTLGGAPVGTPEGHVADR.T	
	906,4915	26	91 - 97	R.TPLQYER.N	
	1522,78	5	98 - 111	R.NAGNVQAHLTDLNR.V	
	1135,6577	9	112 - 121	R.VYTQVLTGVR.E	
21	Akzessorisches Protein der Urease (Cg0116; 14,7 kDa)				63%
	2325,1473	2	1 - 20	-.MIITAIDTNIYDQPEFVEGR.D	
	1134,63	13	27 - 35	R.FEDLVLDKR.I	
	1210,6897	9	39 - 50	R.VALPGGEELGLR.L	
	1056,6218	15	51 - 59	R.LNHGHPILR.E	
	1681,8964	3	103 - 117	R.HLPAQFSKPGELTEK.A	
	2837,3615	2	118 - 141	K.AAMIVQYDHTVVSFLDEHGIEYQR.T	Oxidation (M)
	1168,6849	11	142 - 151	R.TELVPIPF.R.H	
22	Akzessorisches Protein der Urease (Cg0116; 14,7 kDa)				35%
	1134,6259	9	27 - 35	R.FEDLVLDKR.I	
	1210,6903	9	39 - 50	R.VALPGGEELGLR.L	
	1056,6182	11	51 - 59	R.LNHGHPILR.E	
	1681,9132	13	103 - 117	R.HLPAQFSKPGELTEK.A	
	1168,6819	8	142 - 151	R.TELVPIPF.R.H	
23	Ferritin (Cg2781; 18,1 kDa)				33%
	1009,4679	-9	42 - 49	R.DWMKAQSK.E	Oxidation (M)
	999,5554	18	58 - 65	K.FAQHLLDR.D	
	2395,2391	-1	58 - 78	K.FAQHLLDRDYTPQIGDIAPK.L	
	1723,8119	-1	104 - 118	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	1045,5733	9	144 - 154	R.IAGDSGSGILR.I	
24	Prokaryotisches ubiquitin-ähnliches Protein (Cg1689; 6,8 kDa)				28%
	1225,5952	10	2 - 11	M.AHHHHHHNAK.Q	
	1004,5083	14	12 - 21	K.QTQIMGGGGR.D	

Tabelle A2. Peptidmassenfingerprintanalyse der *in-vitro*-Pupplierung von Ferritin und DtxR. *m/z*, gemessenes Verhältnis Masse/Ladung des bestimmten Peptids; Δ ppm, Abweichung zwischen der gemessenen und errechneten Masse; Position, Position des identifizierten Peptids im Protein; Zugeordnetes Peptid (des identifizierten Proteins); Sequenzabdeckung (durch alle detektierten Peptide auf identifizierten Protein); Mod., gefundene Modifikationen am Peptid.

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
1	Chaperon Hsp70 (<i>E. coli</i> BL21(DE3); 69,1 kDa)				18%
	2653,3611	23	1 - 25	-.MGKIIGIDLGTNSCVAIMDGTTPR.V	2 Oxidation (M)
	2869,426	13	126 - 151	K.TAEDYLGEVTEAVITVPAYFNDAQR.Q	
	1485,8409	9	303 - 315	R.AKLESLVEDLVNR.S	
	2441,2943	2	322 - 345	K.VALQDAGLSVSDIDDVILVGGQTR.M	
	1179,6214	5	353 - 362	K.VAEFFGKEPR.K	
	1149,64	12	528 - 536	R.KFEELVQTR.N	
	1277,6662	25	537 - 547	R.NQGDHLLHSTR.K	
2	Pup-Ligase (Cg1688; 54,9 kDa)				44%
	963,5106	0	2 - 10	M.STVESALTR.R	
	1097,6393	-3	30 - 38	K.KLRPDEIAR.R	
	969,5482	1	31 - 38	K.LRPDEIAR.R	
	1019,571	0	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	
	1035,5654	0	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	Oxidation (M)

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	m/z	Δppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1441,6986	-6	48 - 60	K.YSSSNIFIPNGSR.L	
	1162,6722	-4	147 - 155	K.RLMPFLITR.Q	Oxidation (M)
	990,5778	-3	148 - 155	R.LMPFLITR.Q	
	1531,7047	-6	186 - 199	R.SDHVWEGVSSATTR.S	
	956,5643	1	200 - 207	R.SRPINTR.D	
	1313,5452	-4	208 - 218	R.DEPHADSHSYR.R	
	2050,0895	-11	219 - 237	R.RLHVIVGDANMAEPSIALK.V	Oxidation (M)
	1893,9847	-14	220 - 237	R.LHVIVGDANMAEPSIALK.V	Oxidation (M)
	3186,6851	-4	238 - 267	K.VGSTALLVLEMIEADFGLPSELANDIASIR.E	
	3202,6664	-8	238 - 267	K.VGSTALLVLEMIEADFGLPSELANDIASIR.E	Oxidation (M)
	1105,6035	-6	272 - 282	R.DATGSTLLSLK.D	
	2365,0707	-7	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	
	2381,0619	-9	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	Oxidation (M)
	928,4562	-19	362 - 370	R.GNLGLDDPK.L	
	1753,9217	-7	371 - 385	K.LAQVDLTYHDIRPGR.G	
	1006,5682	0	386 - 394	R.GLFSVLQSR.G	
	2046,9941	-2	400 - 418	R.WTTDEAILAAVDTPDTTR.A	
3	Ferritin (Cg2781; 18,1 kDa)				48%
	1397,6744	-20	46 - 57	K.AQSKEELEHAQK.F	
	999,5327	-4	58 - 65	K.FAQHLLDR.D	
	3697,7665	-15	66 - 97	R.DYTPQIGDIAPPKLDVTSIAIEAFEASLAHEQK.I	Pup (K)
	1723,788	-15	104 - 118	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	1045,5541	-9	144 - 154	R.IAGDSGSGILR.I	
4	Diphtherietoxin-Repressor (Cg2103; 25,5 kDa)				56%
	1646,7302	-28	1 - 13	-.MKDLVDITTEMYLR.T	2 Oxidation (M)
	1371,6086	-27	3 - 13	K.DLVDITTEMYLR.T	Oxidation (M)
	1660,8441	-21	14 - 27	R.TIYELEEEGIVPLR.A	
	1472,7401	-21	34 - 47	R.LEQSGPTVSQTVAR.M	
	1094,5366	-20	51 - 60	R.DGLVHVSPDR.S	
	1035,4568	-20	61 - 69	R.SLEMTPEGR.S	Oxidation (M)
	1350,7346	-11	115 - 125	R.RLVEVLDDVHR.S	
	1194,6213	-22	116 - 125	R.LVEVLDDVHR.S	
	2637,2418	-14	126 - 151	R.SPFGNPIPLGELDQADEPDSGVR.A	
	1182,6447	-24	152 - 162	R.AIDLPLGENLK.A	
	2245,1509	-19	202 - 222	R.VVITHNGSSVELIDDLAHAVR.V	
5	Ferritin (Cg2781; 18,1 kDa)				54%
	999,5352	-2	58 - 65	K.FAQHLLDR.D	
	2395,2162	-10	58 - 78	K.FAQHLLDRDYTPQIGDIAPPK.L	
	2059,0055	-14	79 - 97	K.LDVTSIAIEAFEASLAHEQK.I	
	1723,7941	-11	104 - 118	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	2703,3104	-15	119 - 141	R.ALIDWFLNEQIEEATVGEIIDR.L	
	1045,563	-1	144 - 154	R.IAGDSGSGILR.I	
6	Prokaryotisches ubiquitin-ähnliches Protein (Cg1689; 6,8 kDa)				14%
	1004,5031	9	12 - 21	K.QTQIMGGGGR.D	
	1020,4955	6	12 - 21	K.QTQIMGGGGR.D	Oxidation (M)

Tabelle A3. Peptidmassenfingerprintanalyse der *in-vitro*-Pupylierung von SerS-7xHis, SerS-K58A-7xHis und SerS-R67A-7xHis bzw PepO-7xHis, PepO-K398A-7xHis und PepO-R402A-7xHis. *m/z*, gemessenes Verhältnis Masse/Ladung des bestimmten Peptids; Δ ppm, Abweichung zwischen der gemessenen und errechneten Masse; Position, Position des identifizierten Peptids im Protein; Zugeordnetes Peptid (des identifizierten Proteins); Sequenzabdeckung (durch alle detektierten Peptide auf identifizierten Protein); Mod., gefundene Modifikationen am Peptid.

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz-
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	abdeckung
					Mod.
1	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)				22%
	2495,2931	8	58 - 78	K.KIGQASPEDRPALLEGSNELK.A	Pup (K)
	2628,3407	10	102 - 127	K.LSNVVGAPAGGEDDFVLETIGEPR.T	
	1307,6842	14	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	Oxidation (M)
	1856,8927	6	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDTYR.E	
	2390,2479	2	363 - 384	R.YRDENKPKQIAATLNGTLATTR.W	
2	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)				29%
	1230,666	6	6 - 15	K.FLRDNPVVR.A	
	1815,8691	5	22 - 38	R.GEDPALVDELISADESR.R	
	1971,971	5	22 - 39	R.GEDPALVDELISADESRR.E	
	2495,3015	11	58 - 78	K.KIGQASPEDRPALLEGSNELK.A	Pup (K)
	2124,1096	8	59 - 78	K.IGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2628,3488	13	102 - 127	K.LSNVVGAPAGGEDDFVLETIGEPR.T	
	1291,6814	8	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	
	1307,6722	4	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	Oxidation (M)
	1371,7332	8	314 - 328	R.VIDVAGDGLGASAAR.K	
	1856,8972	9	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDTYR.E	
		1234,5527	4	420 - 429	K.QAGHHHHHHH.-
3	Pup-Ligase (Cg1688; 54,9 kDa)				36%
	963,5249	15	2 - 10	M.STVESALTR.R	
	1097,656	12	30 - 38	K.KLRPDEIAR.R	
	969,5614	14	31 - 38	K.LRPDEIAR.R	
	1019,5823	11	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	
	1035,5773	11	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	Oxidation (M)
	1441,7101	2	48 - 60	K.YSSSNIFIPNGSR.L	
	990,5892	9	148 - 155	R.LMPFLITR.Q	
	1006,5823	7	148 - 155	R.LMPFLITR.Q	Oxidation (M)
	1531,722	6	186 - 199	R.SDHVWEGVSSATTR.S	
	956,5781	15	200 - 207	R.SRPIINTR.D	
	1313,5587	6	208 - 218	R.DEPHADSHSYR.R	
	1469,6618	7	208 - 219	R.DEPHADSHSYRR.L	
	3202,7025	3	238 - 267	K.VGSTLLVLEIEADFGLPSELANDIASIR.E	Oxidation (M)
	2365,1002	5	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	
	2381,0865	2	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	Oxidation (M)
	1753,941	4	371 - 385	K.LAQVDLTYHDIRPGR.G	
	2047,0079	5	400 - 418	R.WTTDEAILAAVDTPDTR.A	
	1646,8158	-3	428 - 442	K.AADTLGVPVTVDMWR.H	Oxidation (M)
4	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)				44%
	1230,6555	-3	6 - 15	K.FLRDNPVVR.A	
	1815,8526	-4	22 - 38	R.GEDPALVDELISADESR.R	
	1971,9487	-7	22 - 39	R.GEDPALVDELISADESRR.E	
	2252,1889	0	58 - 78	K.KIGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2124,0954	1	59 - 78	K.IGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2628,313	-1	102 - 127	K.LSNVVGAPAGGEDDFVLETIGEPR.T	
	1685,8217	-12	135 - 149	K.DHLELGESLGLIDMK.R	Oxidation (M)
	1291,6712	0	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	
	1307,6643	-2	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	Oxidation (M)
		1371,7258	2	314 - 328	R.VIDVAGDGLGASAAR.K

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1856,8789	-1	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDQTYR.E	
	2390,2272	-6	363 - 384	R.YRDENGKPKQIAATLNGTLATTR.W	
	3049,6492	1	385 - 412	R.WLVAILENNQQADGQVSVVPEALRPFVKG.D	
	1234,5448	-2	420 - 429	K.QAGHHHHHHH.-	
5	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)				50%
	1230,6587	0	6 - 15	K.FLRDNPDVVR.A	
	1815,8481	-7	22 - 38	R.GEDPALVDELISADESR.R	
	1971,942	-10	22 - 39	R.GEDPALVDELISADESR.R.E	
	2252,1844	-2	58 - 78	K.KIGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2124,0877	-3	59 - 78	K.IGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2628,3115	-1	102 - 127	K.LSNVVSGAPAGGEDDFVLETIGEPR.T	
	1685,82	-13	135 - 149	K.DHLELGESLGLIDMK.R	Oxidation (M)
	2694,2368	-40	159 - 182	R.FYYLTGDGAMLQLGMLMLAAQKAR.E	2 Oxidation (M)
	1291,6699	-1	303 - 313	K.EMLAAIEVPYR.V	
	1307,6595	-5	303 - 313	K.EMLAAIEVPYR.V	Oxidation (M)
	1371,7177	-4	314 - 328	R.VIDVAGGDLGASAAR.K	
	1856,8734	-4	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDQTYR.E	
	2390,2298	-5	363 - 384	R.YRDENGKPKQIAATLNGTLATTR.W	
	3049,6393	-2	385 - 412	R.WLVAILENNQQADGQVSVVPEALRPFVKG.D	
	1234,5418	-5	420 - 429	K.QAGHHHHHHH.-	
6	Pup-Ligase (Cg1688; 54,9 kDa)				46%
	963,5066	-4	2 - 10	M.STVESALTR.R	
	2131,0249	-6	11 - 29	R.RIMGIEYGLTFVDGDSK.K	
	1097,6373	-5	30 - 38	K.KLRPDEIAR.R	
	969,544	-4	31 - 38	K.LRPDEIAR.R	
	1019,5657	-5	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	
	1035,561	-4	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	Oxidation (M)
	1441,6922	-10	48 - 60	K.YSSSNIFIPNGSR.L	
	1179,5936	32	96 - 106	R.MAVDAEESLAK.E	Oxidation (M)
	990,5752	-5	148 - 155	R.LMPFLITR.Q	
	1070,5666	-7	164 - 172	R.IHHPNPLDK.G	
	1531,7029	-7	186 - 199	R.SDHVWEGVSSATTR.S	
	956,5607	-3	200 - 207	R.SRPINTR.D	
	1313,5412	-7	208 - 218	R.DEPHADSHSYR.R	
	1469,635	-11	208 - 219	R.DEPHADSHSYRR.L	
	3186,6937	-1	238 - 267	K.VGSTLLVLEMIEADFGPLSLELANDIASIR.E	
	3202,6764	-5	238 - 267	K.VGSTLLVLEMIEADFGPLSLELANDIASIR.E	Oxidation (M)
	2365,076	-5	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	
	2381,067	-7	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	Oxidation (M)
	1753,9214	-7	371 - 385	K.LAQVDLTYHDIRPGR.G	
	1006,5659	-2	386 - 394	R.GLFSVLQSR.G	
	2046,9967	-1	400 - 418	R.WTTDEAILAAVDTPDTR.A	
	1630,8165	-6	428 - 442	K.AADTLGVPVTVDWMR.H	
	1646,8013	-12	428 - 442	K.AADTLGVPVTVDWMR.H	Oxidation (M)
7	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-K58A-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)				33%
	1815,8466	-8	22 - 38	R.GEDPALVDELISADESR.R	
	2195,1169	-6	58 - 78	K.AIGQASPEDRPALLEGSNELK.A	
	2628,3012	-5	102 - 127	K.LSNVVSGAPAGGEDDFVLETIGEPR.T	
	1291,6632	-6	303 - 313	K.EMLAAIEVPYR.V	
	1307,6566	-7	303 - 313	K.EMLAAIEVPYR.V	Oxidation (M)
	1371,7121	-8	314 - 328	R.VIDVAGGDLGASAAR.K	
	1856,8682	-7	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDQTYR.E	
	1728,7659	-12	330 - 343	K.FDTEAWVPTQDQTYR.E	
	3049,6335	-4	385 - 412	R.WLVAILENNQQADGQVSVVPEALRPFVKG.D	
	1234,5333	-11	420 - 429	K.QAGHHHHHHH.-	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)					Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.	
8	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-R67A-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)					33%
	1230,6716	10	6 - 15	K.FLRDNPDVVR.A		
	1815,8649	2	22 - 38	R.GEDPALVDELISADESR.R		
	1971,9683	3	22 - 39	R.GEDPALVDELISADESRR.E		
	2410,2164	3	58 - 78	K.KIGQASPEDAPALLEGSNELK.A	Pup (K)	
	2628,3447	11	102 - 127	K.LSNVVSGAPAGGEDDFVVLETIGEPR.T		
	1291,6816	8	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V		
	1307,673	5	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	Oxidation (M)	
	1371,7313	6	314 - 328	R.VIDVAGGDLGASAAR.K		
	1856,8951	7	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDTYR.E		
	3049,6917	15	385 - 412	R.WLVAILENNQQADGSSVVPEALRPFVKG.D		
9	Pup-Ligase (Cg1688; 54,9 kDa)					33%
	1097,645	2	30 - 38	K.KLRPDEIAR.R		
	969,5473	0	31 - 38	K.LRPDEIAR.R		
	1019,5719	1	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y		
	1035,5654	0	40 - 47	R.MFRPIVEK.Y	Oxidation (M)	
	1441,6962	-8	48 - 60	K.YSSSNIFPNGSR.L		
	990,5801	0	148 - 155	R.LMPFLITR.Q		
	1531,7033	-7	186 - 199	R.SDHVWEGVSSATTR.S		
	956,5638	0	200 - 207	R.SRPIINTR.D		
	1313,5441	-5	208 - 218	R.DEPHADSHSYR.R		
	1469,6388	-9	208 - 219	R.DEPHADSHSYRR.L		
	3202,6608	-10	238 - 267	K.VGSTLLVLEMIEADFGPLSLELANDIASIR.E	Oxidation (M)	
	2365,0766	-5	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V		
	2381,0625	-8	303 - 322	K.WLEQRPEPEFSGTSNTEMAR.V	Oxidation (M)	
	1753,9163	-10	371 - 385	K.LAQVDLTYHDIRPGR.G		
	1006,5694	1	386 - 394	R.GLFSVLQSR.G		
	2046,9795	-9	400 - 418	R.WTTDEAILAAVDTPDTR.A		
10	Seryl-tRNA-Synthetase, SerS-R67A-7xHis (Cg3201; 47,6 kDa)					60%
	1230,6562	-2	6 - 15	K.FLRDNPDVVR.A		
	1815,8465	-8	22 - 38	R.GEDPALVDELISADESR.R		
	1971,9483	-7	22 - 39	R.GEDPALVDELISADESRR.E		
	1116,5678	3	44 - 53	K.AADDLRAEQK.A		
	2167,1011	-11	58 - 78	K.KIGQASPEDAPALLEGSNELK.A		
	2039,0125	-8	59 - 78	K.IGQASPEDAPALLEGSNELK.A		
	1430,7	-9	81 - 94	K.VKDAEAAQEAQAAK.V		
	2628,3163	0	102 - 127	K.LSNVVSGAPAGGEDDFVVLETIGEPR.T		
	2550,2266	-7	128 - 149	R.TDFEPKDHLELGESLGLIDMK.R	Oxidation (M)	
	1669,8301	-10	135 - 149	K.DHLELGESLGLIDMK.R		
	1685,8271	-9	135 - 149	K.DHLELGESLGLIDMK.R	Oxidation (M)	
	1841,9152	-15	135 - 150	K.DHLELGESLGLIDMKR.G	Oxidation (M)	
	3291,6042	-1	219 - 248	R.DDMYLVGTSEVALAGYHKDEIIDLNEGPVK.Y		
	1291,6688	-2	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V		
	1307,6602	-5	303 - 313	K.EMLAIEVPYR.V	Oxidation (M)	
	1371,7198	-2	314 - 328	R.VIDVAGGDLGASAAR.K		
	1856,8752	-3	329 - 343	R.KFDTEAWVPTQDTYR.E		
	1728,781	-3	330 - 343	K.FDTEAWVPTQDTYR.E		
	2071,0649	-6	365 - 384	R.DENGKQIAATLNGTLATTR.W		
	3049,6571	3	385 - 412	R.WLVAILENNQQADGSSVVPEALRPFVKG.D		
	3829,142	1	385 - 419	R.WLVAILENNQQADGSSVVPEALRPFVKGDKVLKPKV.Q		
	1234,5446	-2	420 - 429	K.QAGHHHHHHH.-		
11	Putative Endopeptidase O, PepO-7xHis (Cg0193; 72,3 kDa)					52%
	1910,9735	-1	7 - 22	R.FVNGLWLDTHIIPDDR.A		
	1667,8185	-3	31 - 44	K.LRDDAEEDVHEIVK.E		
	2226,054	-4	31 - 49	K.LRDDAEEDVHEIVKEDTGR.A		

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)	Sequenz- abdeckung				
		<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
		2853,3844	4	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	
		2869,3697	1	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	Oxidation (M)
		1867,9544	0	78 - 95	R.LSVANSSFFAAALGELDR.E	
		2720,2834	5	109 - 133	K.DSSSNESVAYVIQSGGLPDEAYYR.E	
		1982,9524	-2	134 - 150	R.EEAHAETLAAYKEHVER.M	
		1068,5232	8	151 - 159	R.MLGYLDNSR.L	
		1084,5125	3	151 - 159	R.MLGYLDNSR.L	Oxidation (M)
		1134,6308	4	160 - 171	R.LFGLSAASAAAR.I	
		2014,0507	-5	189 - 207	K.TRDAVATYNPTL GALPPK.V	
		1756,897	-8	191 - 207	R.DAVATYNPTL GALPPK.V	
		1257,6813	1	210 - 221	R.TLLSSAGLPDQR.L	
		2104,0133	-5	258 - 276	R.AGLL TEEISQANFDYGTK.L	
		1904,9725	33	277 - 288	K.LSGATEQKDRWK.R	2 Pup (K)
		1018,5055	7	297 - 305	R.MVGEEIGQR.F	
		1821,9161	-2	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAYR.D	
		1837,9044	-6	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAYR.D	Oxidation (M)
		1689,7985	-23	332 - 345	R.DRISNLEWMPATR.E	
		1418,7106	1	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	
		1434,6978	-5	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	Oxidation (M)
		1034,5459	4	359 - 366	K.IGYDPKWR.S	
		1787,8053	-2	367 - 382	R.SYEGLEFGSDLVDNSR.K	
		1464,7427	-4	383 - 395	R.KGS AFLHDYELGK.I	
		1038,533	11	483 - 491	R.SAFEQLTSR.L	
		3426,6231	4	545 - 575	R.GQTFETSPVQKFEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
		2224,0257	5	556 - 575	K.FEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
		2439,252	-3	588 - 608	K.IRPQMAVQYL AIDPHSPA EFR.C	
		2455,2481	-3	588 - 608	K.IRPQMAVQYL AIDPHSPA EFR.C	Oxidation (M)
12	Putative Endopeptidase O, PepO-7xHis (Cg0193; 72,3 kDa)					49%
		1910,9709	-3	7 - 22	R.FVNGLWLDTHIIPDDR.A	
		1667,822	-1	31 - 44	K.LRDDAEEDVHEIVK.E	
		2853,3838	4	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	
		2869,3709	1	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	Oxidation (M)
		1867,9565	1	78 - 95	R.LSVANSSFFAAALGELDR.E	
		3223,6684	8	78 - 108	R.LSVANSSFFAAALGELDREGV GAVGVFWVEK.D	
		1374,7034	-1	96 - 108	R.EGVGAPVGVFWVEK.D	
		2720,2883	7	109 - 133	K.DSSSNESVAYVIQSGGLPDEAYYR.E	
		1068,5203	6	151 - 159	R.MLGYLDNSR.L	
		1084,5148	5	151 - 159	R.MLGYLDNSR.L	Oxidation (M)
		1134,6324	5	160 - 171	R.LFGLSAASAAAR.I	
		1257,6848	4	210 - 221	R.TLLSSAGLPDQR.L	
		2104,0157	-4	258 - 276	R.AGLL TEEISQANFDYGTK.L	
		1904,977	35	277 - 288	K.LSGATEQKDRWK.R	2 Pup (K)
		1018,5044	6	297 - 305	R.MVGEEIGQR.F	
		1821,9204	0	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAYR.D	
		1837,9069	-5	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAYR.D	Oxidation (M)
		1418,7093	0	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	
		1434,7026	-1	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	Oxidation (M)
		1034,5494	7	359 - 366	K.IGYDPKWR.S	
		1787,8081	0	367 - 382	R.SYEGLEFGSDLVDNSR.K	
		1464,7385	-7	383 - 395	R.KGS AFLHDYELGK.I	
		1038,5316	10	483 - 491	R.SAFEQLTSR.L	
		3426,6234	4	545 - 575	R.GQTFETSPVQKFEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
		2224,0229	3	556 - 575	K.FEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
		2439,2715	5	588 - 608	K.IRPQMAVQYL AIDPHSPA EFR.C	
		2455,2483	-3	588 - 608	K.IRPQMAVQYL AIDPHSPA EFR.C	Oxidation (M)

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1461,7115	-2	639 - 649	R.LAIWHHHHHHH.-	
13	Putative Endopeptidase O, PepO-K398A-7xHis (Cg0193; 72,3 kDa)				57%
	1910,9726	-2	7 - 22	R.FVNGWLWLDTHIIPDDR.A	
	1667,8186	-3	31 - 44	K.LRDDAEEDVHEIVK.E	
	2853,3841	4	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	
	2869,369	-1	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	Oxidation (M)
	1867,9523	-1	78 - 95	R.LSVANSSFFAAALGELDR.E	
	3223,6592	5	78 - 108	R.LSVANSSFFAAALGELDREGVGVGAPVGFVVEK.D	
	1374,7012	-3	96 - 108	R.EGVGAPVGFVVEK.D	
	2720,2792	4	109 - 133	K.DSSSNESVAYVIQSGGLPDEAYYR.E	
	1982,9605	2	134 - 150	R.EEAHAETLAAYKEHVER.M	
	2226,047	2	134 - 150	R.EEAHAETLAAYKEHVER.M	Pup (K)
	1068,525	10	151 - 159	R.MLGYLNSR.L	
	1084,5151	5	151 - 159	R.MLGYLNSR.L	Oxidation (M)
	1134,6323	5	160 - 171	R.LFGLSAASAAAR.I	
	1851,005	2	172 - 188	R.IVALETEIAAGHWVVK.T	
	2014,0637	2	189 - 207	K.TRDAVATYNPTLALGALPPK.V	
	1756,8973	-8	191 - 207	R.DAVATYNPTLALGALPPK.V	
	1257,6833	3	210 - 221	R.TLLSSAGLPDQR.L	
	2104,0164	-3	258 - 276	R.AGLL TEEISQANFDYFGTK.L	
	1904,9688	31	277 - 288	K.LSGATEQKDRWK.R	2 Pup (K)
	1018,507	8	297 - 305	R.MVGEEIGQR.F	
	1821,9167	-2	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAAYR.D	
	1837,9041	-6	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAAYR.D	Oxidation (M)
	1418,7102	0	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	
	1434,7017	-2	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	Oxidation (M)
	1034,5486	7	359 - 366	K.IGYDPKWR.S	
	1787,8051	-2	367 - 382	R.SYEGLEFGSDLVNSR.K	
	1464,7385	-7	383 - 395	R.KGS AFLHDYELGK.I	
	1038,5322	10	483 - 491	R.SAFEQLTSR.L	
	3426,6301	6	545 - 575	R.GQTFETSPVQKFEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
	2224,0226	3	556 - 575	K.FEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
	2439,2667	3	588 - 608	K.IRPQMAVQYLAI DPHSPA EFR.C	
	2455,2521	-1	588 - 608	K.IRPQMAVQYLAI DPHSPA EFR.C	Oxidation (M)
	1461,713	-1	639 - 649	R.LAIWHHHHHHH.-	
14	Putative Endopeptidase O, PepO-R402A-7xHis (Cg0193; 72,3 kDa)				39%
	1667,8407	10	31 - 44	K.LRDDAEEDVHEIVK.E	
	2853,4117	14	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	
	2869,4047	13	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	Oxidation (M)
	1867,9799	13	78 - 95	R.LSVANSSFFAAALGELDR.E	
	2720,3163	18	109 - 133	K.DSSSNESVAYVIQSGGLPDEAYYR.E	
	1068,5368	21	151 - 159	R.MLGYLNSR.L	
	1084,5325	22	151 - 159	R.MLGYLNSR.L	Oxidation (M)
	1134,6482	19	160 - 171	R.LFGLSAASAAAR.I	
	1257,6998	16	210 - 221	R.TLLSSAGLPDQR.L	
	2104,045	10	258 - 276	R.AGLL TEEISQANFDYFGTK.L	
	1018,5221	23	297 - 305	R.MVGEEIGQR.F	
	1837,9328	10	317 - 331	K.EHMLELVDYLVAAAYR.D	Oxidation (M)
	1034,5541	12	359 - 366	K.IGYDPKWR.S	
	1787,8281	11	367 - 382	R.SYEGLEFGSDLVNSR.K	
	1464,7643	11	383 - 395	R.KGS AFLHDYELGK.I	
	1038,548	26	483 - 491	R.SAFEQLTSR.L	
	3426,662	16	545 - 575	R.GQTFETSPVQKFEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
	2224,0542	18	556 - 575	K.FEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
	2455,2738	8	588 - 608	K.IRPQMAVQYLAI DPHSPA EFR.C	Oxidation (M)

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
15	Putative Endopeptidase O, PepO-R402A-7xHis (Cg0193; 72,3 kDa)				55%
	1910,9709	-3	7 - 22	R.FVNGLWLDTHIIPDDR.A	
	1667,819	-3	31 - 44	K.LRDDAEEDVHEIVK.E	
	2853,3825	4	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	
	2869,3701	1	50 - 77	R.AGTLYASFMDTDAINAAGVAPLDADLNR.L	Oxidation (M)
	1867,9541	0	78 - 95	R.LSVANSSFFAAALGELDR.E	
	3223,6584	5	78 - 108	R.LSVANSSFFAAALGELDREGVGVGAPVGFVWEK.D	
	1374,7038	-1	96 - 108	R.EGVGAPVGFVWEK.D	
	2720,2786	4	109 - 133	K.DSSSNESVAYVIQSGGLPDEAYYR.E	
	1068,5188	4	151 - 159	R.MLGYLDNSR.L	
	1084,5171	7	151 - 159	R.MLGYLDNSR.L	Oxidation (M)
	1134,631	4	160 - 171	R.LFGLSAASAAAR.I	
	1850,9956	-3	172 - 188	R.IVALETEIAAGHWVVK.T	
	1257,6819	2	210 - 221	R.TLLSSAGLPDQR.L	
	2104,0111	-6	258 - 276	R.AGLLTEEISQANFDYFGTK.L	
	1104,5722	7	277 - 286	K.LSGATEQKDR.W	
	1904,9648	29	277 - 288	K.LSGATEQKDRWK.R	2 Pup (K)
	1018,5049	6	297 - 305	R.MVGEEIGQR.F	
	1821,9149	-3	317 - 331	K.EHMLELVLDYLVAAYR.D	
	1837,9061	-5	317 - 331	K.EHMLELVLDYLVAAYR.D	Oxidation (M)
	1418,7073	-2	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	
	1434,6988	-4	334 - 345	R.ISNLEWMPATR.E	Oxidation (M)
	1034,5451	3	359 - 366	K.IGYDPKWR.S	
	1787,8051	-2	367 - 382	R.SYEGLEFGSDLVDNSR.K	
	3944,0414	5	396 - 431	K.IGKPADADEWVTTPTQVNAFYNPVVNDITFPAAILR.A	
	1038,5289	7	483 - 491	R.SAFEQLTSR.L	
	3426,6257	5	545 - 575	R.GQTFETSPVQKFEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
	2224,0202	2	556 - 575	K.FEAEGAEGLAEQEFNGLQR.L	
	2439,262	1	588 - 608	K.IRPQMAVQYLAIIDPHSPAIFR.C	
	2455,2497	-2	588 - 608	K.IRPQMAVQYLAIIDPHSPAIFR.C	Oxidation (M)
	1461,7121	-2	639 - 649	R.LAIWHHHHHHHH.-	

Tabelle A4. Peptidmassenfingerprintanalyse von Proteinspots aus einer 2D-DIGE-Analyse von zytosolischen Proteinrohextrakten aus *C. glutamicum* Δ pup-Mutante im Vergleich zum WT in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Alle Spots aus dem 2D-Gel wurden ausgeschnitten und identifiziert, die gezeigten Nummern entsprechen den identifizierten Spots aus Tabelle 9. *m/z*, gemessenes Verhältnis Masse/Ladung des bestimmten Peptids; Δ ppm, Abweichung zwischen der gemessenen und errechneten Masse; Position, Position des identifizierten Peptids im Protein; Zugeordnetes Peptid (des identifizierten Proteins); Sequenzabdeckung (durch alle detektierten Peptide auf identifizierten Protein); Mod., gefundene Modifikationen am Peptid.

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
1	Häm-Oxygenase (Cg2445; 24,2 kDa)				48%
	1576,805	-8	2 - 16	M.TSIASNSDLSEALR.T	
	905,4993	-11	40 - 47	K.LDAQAFIK.L	
	1568,7479	-5	101 - 115	R.DNVTATAATASYVER.L	
	1375,7124	-7	116 - 127	R.LESIEAAKDFPR.L	
	994,557	-1	128 - 135	R.LVAHHYVR.Y	
	1348,7105	-8	136 - 148	R.YLGDLSGGQVIAR.L	
	1196,6358	-5	172 - 180	K.LKPYKDNYR.A	
	1459,7169	-7	181 - 193	R.AELDALELTAERA	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1278,6244	-6	194 - 205	R.AALLDEASDAFR.F	
2	Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein (Cg3118; 63,3 kDa)				18%
	1473,7303	-2	57 - 70	K.QGFSSAPDDIAPR.F	
	2577,411	-1	175 - 200	R.VILGSPVSGVAEELIDATPAIDAIR.E	
	1560,7809	0	203 - 214	R.YLDKEEFHNLPR.K	
	1501,7977	-2	326 - 339	K.LIDGPVVTNPGYR.D	
	1727,815	2	407 - 421	R.DLDEIGLYSSPSEFR.R	
	1315,6771	2	444 - 454	R.AIELVDELEER.L	
	1350,6879	-2	522 - 533	K.VIADEVGEYVTR.V	
3	Putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), Substratbindendes Lipoprotein (Cg3404; 36,7 kDa)				34%
	2309,0834	-9	49 - 71	R.LFSTADSATAALGSDAEPGQFPR.T	
	1286,6191	-11	78 - 88	R.GETTLEQQPQR.V	
	2592,4074	-16	89 - 114	R.VVVLDSGEIDQVLSLGVTPVGIASPK.D	
	1590,807	-19	184 - 198	K.ENFLLTADALGLEGK.A	
	1842,9132	-12	199 - 214	K.AVEVLNEYQTHVDAVR.E	
	1415,7186	-13	215 - 227	R.ETIDGSPEISLVR.F	
	1408,8014	-13	235 - 247	R.LYGNLSFIGAILK.D	
4	Oxalacetat-Decarboxylase (Cg1458; 29,1 kDa)				41%
	2715,121	-18	6 - 30	R.IATPDGMCFCFSIEGEGDDVANLTAR.E	Oxidation (M)
	1042,5466	-21	46 - 53	R.EWPLKDVR.L	
	1420,6907	-22	69 - 80	R.NYADHVAEVFKK.S	
	2605,4105	-5	81 - 105	K.SAESLPPTLFLKPPTAVTGPESPIR.I	
	1774,9137	-15	113 - 128	K.VEFEGELAVVIGKPKCK.N	
	1606,8602	-12	137 - 151	K.SVVLGFTIINDVSSR.D	
	1306,5908	-20	152 - 162	R.DLQFADGQWAR.A	
5	Putative D-Aminosäure-Dehydrogenase (Cg3340; 44,7 kDa)				23%
	2372,148	-18	171 - 190	R.LENPQELAPMLNEQIQVAYR.L	Oxidation (M)
	1989,0526	-14	196 - 213	R.FIEPGPYVQSLADAVVKR.G	
	1145,5802	-14	286 - 294	K.HSVYLPHHR.M	
	2211,0655	14	286 - 303	K.HSVYLPHHRMACTPYEGR.F	
	2051,9197	-20	306 - 323	R.IAGTMEFRGPDEPFQQR.V	Oxidation (M)
	2490,2565	-20	389 - 410	K.YLAELMATGNTNPIIKPFDPLR.-	Oxidation (M)
6a	Thiamin-Biosyntheseprotein (Cg1476; 65,2 kDa)				30%
	1257,6345	2	20 - 30	K.DGLEVPETEIR.L	
	2669,2782	3	20 - 43	K.DGLEVPETEIRLDDSPSPNEPFR.I	
	1430,6599	4	31 - 43	R.LDDSPSPNEPFR.I	
	966,4708	7	70 - 78	R.GDVATYQGR.E	
	1010,5015	4	129 - 136	R.EMEFVALR.E	Oxidation (M)
	1101,5362	3	137 - 145	R.EHVDAEFVR.S	
	2117,0742	-3	153 - 171	R.AIIPNNVNHPESEPMIIGR.K	Oxidation (M)
	1825,9974	-5	227 - 243	R.NSPVPIGTVPPIQALEK.V	
	3436,7132	0	258 - 287	R.DTIIEQCEQGVDMYTIHAGVLLAYIPLTTR.R	Oxidation (M)
	917,5117	7	356 - 363	K.TIGELTQR.A	
	935,5082	3	441 - 448	K.EHLGLPNR.D	
	1392,7247	1	441 - 452	K.EHLGLPNRDDVK.T	
	2744,2059	-3	540 - 567	R.DMFGDQIAELGMPGVGDSSSAVASSGAR.E	2 Oxidation (M)
	1454,7408	2	574 - 586	K.SREFIAGGAEVYR.R	
	1211,6112	5	576 - 586	R.EFIAGGAEVYR.R	
6b	CTP-Synthetase (Cg1606; 61,0 kDa)				26%
	1383,8343	2	26 - 39	K.GLTAASLGQLLIAR.G	
	1366,7391	-3	201 - 212	K.TKPTQHSVAELR.G	
	1236,7711	3	213 - 224	R.GIGILPDALVLR.C	
	1143,6216	5	267 - 275	R.EHLDTFIIR.R	
	1822,9632	3	311 - 326	K.YIDLDPDAYLSVVEAVR.A	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	m/z	Δppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1009,4927	8	327 - 335	R.AAGYANWTR.T	
	1641,9366	3	355 - 371	K.ALSGLDAIVVPGFGIR.G	
	2491,3627	4	385 - 406	R.EHKIPLLGLCLGLQCTVIEAAR.Q	
	2097,1575	1	388 - 406	K.IPLLGLCLGLQCTVIEAAR.Q	
	2755,3859	7	449 - 474	R.LGAYPATLEEGSLVAELYGTTEVSER.H	
	1321,6464	5	477 - 486	R.HRYEVNNAYR.A	
7	Alkohol-Dehydrogenase, Klasse C (Cg0400; 37,8 kDa)				30%
	1450,6914	-21	38 - 50	K.AAGICHSDIHTIR.N	
	2988,232	-7	86 - 111	R.VGVGCLVNSCGECEQCQVAGFENNCLR.G	
	3338,6596	-6	141 - 170	R.FLCSIPEELNFDVAAPLLCAGITTYSPIAR.W	
	931,4937	-29	199 - 207	K.GAEVTLSR.S	
	2218,9976	-19	310 - 330	K.HGLGAMIEVTGVNDVDAAYDR.V	Oxidation (M)
	990,5114	-26	331 - 339	R.VVAGDVQFR.V	
8	Adenylat-Kinase (Cg0648; 19,4 kDa)				73%
	1425,7279	-40	24 - 36	K.LGIPHISTGDLFR.A	
	1369,677	-40	37 - 50	R.ANIGEGTPLGIEAK.Q	
	971,5319	-21	58 - 66	K.LVPTDVTAR.M	
	1807,8184	-37	72 - 88	R.LAESDAAEGFLLDGFPR.T	
	3773,7946	-30	89 - 123	R.TVEQADILANLLSEAGQTLDGVVNYQVSEDEVVVER.M	
	1275,5454	-37	128 - 138	R.GRADDNEETIR.T	
	2061,9536	-34	141 - 158	R.LGVYRDETAPLIDHYGDK.I	
	1798,857	-34	159 - 174	K.IINIEAEGEVEEINAR.T	
9	Putatives Membranprotein (Cg1246; 20,2 kDa)				26%
	1891,96	18	28 - 43	R.EVDTFKVTDFGLYMAR.G	
	1188,5665	-4	34 - 43	K.VTDFGLYMAR.G	Oxidation (M)
	904,4863	8	65 - 71	R.ANIFHFR.K	
	1384,6752	1	78 - 88	R.QDYIIDVAEIR.V	
	1443,7781	-1	136 - 149	R.AIDATLNAVEGITR.H	
10	Homoserin-Dehydrogenase (Cg1337; 46,5 kDa)				68%
	2105,0585	-23	14 - 35	K.GPGSAVGIALLGFGTVGTEVMR.L	Oxidation (M)
	1434,6383	-21	36 - 47	R.LMTEYGDELAHR.I	
	1450,6315	-22	36 - 47	R.LMTEYGDELAHR.I	Oxidation (M)
	1142,6286	-21	56 - 66	R.GIAVSDISKPR.E	
	1972,9821	-21	67 - 84	R.EGVAPELLTEDAFALIER.E	
	3855,9294	-16	67 - 101	R.EGVAPELLTEDAFALIEREDVIVVEVIGGIEYPR.E	
	1901,9519	-18	85 - 101	R.EDVDIVVEVIGGIEYPR.E	
	3732,9042	-15	120 - 157	K.ALVAHAHSAELADAAEAANVDLYFEAAVAGAIPVVGPLR.R	
	3888,987	-19	120 - 158	K.ALVAHAHSAELADAAEAANVDLYFEAAVAGAIPVVGPLRR.S	
	2016,864	-25	200 - 219	R.LGYAEADPTADVEGHDAASK.A	
	1270,7017	-20	220 - 231	K.AAILASIAFHTR.V	
	3147,4368	-17	232 - 261	R.VTADDVYCEGISNISAADIEAAQAGHTIK.L	
	1808,9951	-24	282 - 298	R.VHPTLLPVSHPLASVNK.S	
	1481,7082	-20	299 - 312	K.SFNAIFVEAEAAGR.L	
	2438,1626	-21	313 - 338	R.LMFYNGAGGAPTASAVLGDVVGGAAR.N	Oxidation (M)
	2211,0198	-17	346 - 366	R.APGESTYANLPIADFGETTTR.Y	
	1292,6012	34	367 - 376	R.YHLDMDVEDR.V	
	1308,5221	-23	367 - 376	R.YHLDMDVEDR.V	Oxidation (M)
	1989,0661	-18	377 - 395	R.VGVLAELASLFSEGGISLR.T	
	1639,8676	-21	408 - 422	R.LIVVTHSALESLSR.T	
11	Dihydroxysäure-Dehydratase (Cg1432; 65,2 kDa)				51%
	2923,526	-7	29 - 54	K.ENEFGKPIVAIVNSYTFVPGHVHLK.N	
	1128,5934	-7	55 - 65	K.NVGDIVADAVR.K	
	1256,6847	-9	55 - 66	K.NVGDIVADAVRK.A	
	2683,2221	-10	73 - 97	K.FENTIAVDDGIAMGHGGMLYSLPSR.E	2 Oxidation (M)
	1730,8851	-17	136 - 152	R.LNIPVVFVSGGPMEAGK.A	Oxidation (M)

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1133,5568	-5	237 - 246	K.AGETVVVLCR.R	
	1612,743	-11	247 - 259	R.RYYGEEDESVLPR.G	
	1456,6465	-9	248 - 259	R.YYGEEDESVLPR.G	
	1685,7128	-12	316 - 329	K.VAPNSDYHMEDVHR.A	Oxidation (M)
	1280,7192	-10	330 - 342	R.AGGIPALLGELNR.G	
	1769,9015	-9	372 - 388	K.TTEVATELFHAAPGGIR.T	
	2300,01	-9	389 - 408	R.TTEAFSTENRWDELDTDAAK.G	
	2201,0951	-8	409 - 428	K.GCIRDVEHAYTADGGLVVLR.G	
	1714,8586	-10	413 - 428	R.DVEHAYTADGGLVVLR.G	
	1776,8388	-9	440 - 455	K.SAGIEEELWNFTGPAR.V	
	1630,8651	-15	456 - 470	R.VVESQEEAVSVILTK.T	
	1184,6879	-10	471 - 481	K.TIQAGEVLVVR.Y	
	2279,0153	-14	482 - 502	R.YEGPSGGPGMQEMLHPTAFLK.G	2 Oxidation (M)
	3854,9254	-4	518 - 556	R.FSGSSGLSIGHVSPEAAHGGVIGLIENGDIVSIDVHNR.K	
	1572,8084	-9	557 - 569	R.KLEVQVSDEELQR.R	
	1444,7123	-11	558 - 569	K.LEVQVSDEELQR.R	
	1600,8342	3	558 - 570	K.LEVQVSDEELQRR.R	
	1742,8423	8	572 - 586	R.DAMNASEKPWQPVNR.N	
	1758,7975	-14	572 - 586	R.DAMNASEKPWQPVNR.N	Oxidation (M)
12	50S ribosomales Protein L10 (Cg0572; 17,9 kDa)				77%
	958,5173	-3	6 - 14	R.NEAAALAEK.A	
	1543,7495	-9	17 - 29	R.FAETDTVVLTLEYR.G	
	1188,6492	-8	30 - 40	R.GLTVAQTTELK.K	
	1316,7395	-10	30 - 41	R.GLTVAQTTELK.A	
	1425,7539	-14	41 - 53	R.KALGFDVQYSVAK.N	
	1297,6661	-10	42 - 53	K.ALGFDVQYSVAK.N	
	2485,3016	-7	59 - 83	K.IAANEAGVEGLDLLTGPTAVAFIK.G	
	3256,6746	-6	59 - 91	K.IAANEAGVEGLDLLTGPTAVAFIKGEAVDTAK.V	
	1267,6493	-15	96 - 106	K.FGEENKAFVVK.G	
	2422,1097	-9	107 - 129	K.GGYMDGNALTAEQVNAIAELDNR.E	
	2438,1024	-9	107 - 129	K.GGYMDGNALTAEQVNAIAELDNR.E	Oxidation (M)
	3081,4596	-6	107 - 135	K.GGYMDGNALTAEQVNAIAELDNRETTLAK.L	Oxidation (M)
	1372,7172	-12	147 - 160	K.AAGLFNAPASQVAR.L	
13	Dihydroxysäure-Dehydratase (Cg1432; 65,2 kDa)				34%
	1128,6022	1	55 - 65	K.NVGDIVADAVR.K	
	1256,6937	-2	55 - 66	K.NVGDIVADAVRK.A	
	1730,8941	-12	136 - 152	R.LNIPVVFVSGGPMEAGK.A	Oxidation (M)
	1133,5638	2	237 - 246	K.AGETVVVLCR.R	
	1612,7606	0	247 - 259	R.RYYGEEDESVLPR.G	
	1456,6541	-3	248 - 259	R.YYGEEDESVLPR.G	
	1685,7223	-7	316 - 329	K.VAPNSDYHMEDVHR.A	Oxidation (M)
	1280,7325	0	330 - 342	R.AGGIPALLGELNR.G	
	1769,915	-2	372 - 388	K.TTEVATELFHAAPGGIR.T	
	1714,8735	-1	413 - 428	R.DVEHAYTADGGLVVLR.G	
	1184,7009	1	471 - 481	K.TIQAGEVLVVR.Y	
	2279,0363	-5	482 - 502	R.YEGPSGGPGMQEMLHPTAFLK.G	2 Oxidation (M)
	3854,9395	-1	518 - 556	R.FSGSSGLSIGHVSPEAAHGGVIGLIENGDIVSIDVHNR.K	
	1572,8189	-2	557 - 569	R.KLEVQVSDEELQR.R	
	1758,812	-6	572 - 586	R.DAMNASEKPWQPVNR.N	Oxidation (M)
14	Katalase (Cg0310; 58,7 kDa)				61%
	3189,592	-12	26 - 56	R.HNGAPVPSENISATAGPQGNVNDIHLIEK.L	
	1481,7456	-10	57 - 68	K.LAHFNRENVPER.I	
	2089,9533	-14	74 - 92	K.GHAFAGELHITEDVSEYTK.A	
	1637,7399	-9	108 - 122	R.FSTVAGEEQGSPDWR.D	
	914,4812	-3	123 - 130	R.DVHGFALR.F	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	2497,1502	-7	131 - 151	R.FYTEEGNYDIVGNNTPTFFLR.D	
	1565,7261	-10	152 - 164	R.DGMKFPDFIHSQK.R	Oxidation (M)
	1690,7522	-20	184 - 198	R.APESAHQVTYLMGDR.G	Oxidation (M)
	1122,5092	-7	248 - 257	K.VAGENADYQR.E	
	1627,7171	-15	276 - 288	K.VQIMPFEDAENYR.W	Oxidation (M)
	1679,8997	-9	302 - 315	K.DYPLIPVGYFILNR.N	
	2767,4173	-9	319 - 344	R.NFFAQIEQLALDPGNIVPGVGLSPDR.M	
	1111,5449	-7	350 - 358	R.IFAYADQQR.Y	
	1886,9472	-13	367 - 382	R.DLPVNRPINVENTYSR.E	
	2699,1248	-12	383 - 405	R.EGSMQYIFDAEGEPSYSPNRYDK.G	Oxidation (M)
	3908,6892	-9	406 - 442	K.GAGYLDNGTDSSNHTSYGQADDIYVNPDPHGTDLVR.A	
	1831,8373	-13	448 - 462	K.HQDDDDFIQPGILYR.E	
	2032,9421	-9	473 - 491	R.LADNISNAMQGISATEPR.V	Oxidation (M)
15	Putative flavin-enthaltende Monooxygenase (Cg3195; 67,0 kDa)				35%
	1107,5359	-20	68 - 76	R.NTWPSISIFR.N	
	1785,8251	-20	77 - 93	R.NVELKGEPADGEGDVTR.V	
	1326,5455	-25	94 - 104	R.VHFSCESADFK.C	
	1018,5487	-19	116 - 124	K.AWTLTTSAR.E	
	1757,7533	-26	136 - 150	R.NREMGVVHGGQNEPTR.N	Oxidation (M)
	1487,6175	-25	138 - 150	R.EMGVVHGGQNEPTR.N	Oxidation (M)
	2611,3817	-15	160 - 186	R.QAALGVTEQPYTLIIGGGQGIALGAR.L	
	1194,7337	-19	189 - 199	K.RLGVPALIIDK.A	
	1038,6377	-17	190 - 199	R.LGVPALIIDK.A	
	1072,5077	-19	200 - 208	K.ASRPGDQWR.S	
	1925,8618	-19	267 - 282	R.ASYNEDTKQWDVTVNR.D	
	1017,5206	9	275 - 282	K.QWDVTVNR.D	
	1535,6531	-20	321 - 334	R.HSSEHPGGDVDRDK.N	
	3242,5389	-20	335 - 364	K.NVVVLGANNSAHDICADLYSNGAKPVMIQR.S	Oxidation (M)
	1956,9283	-19	455 - 473	R.RGSGYYIDVGASELVADGK.I	
	1800,8155	-28	456 - 473	R.GSGYYIDVGASELVADGK.I	
	2266,1309	-18	456 - 477	R.GSGYYIDVGASELVADGKIPVR.S	
	1155,5159	-23	541 - 550	K.DPGWEGELR.N	
	1531,6812	-26	584 - 596	K.ARYEGMNTPVYSK.-	Oxidation (M)
16	Succinat:Menachinon-Oxidoreductase, Flavoprotein Untereinheit (Cg0446; 75,1 kDa)				22%
	1077,5042	-6	87 - 95	K.AFTYHDAPR.R	
	1494,7685	-13	96 - 110	R.RAHSIAAQGGVNSAR.G	
	1527,753	-14	149 - 162	R.VIDHMNAIGAPFAR.E	Oxidation (M)
	936,4879	-2	172 - 180	R.SFGGVQVSR.T	
	1786,9201	-11	186 - 202	R.GQTGGQLQLSTASALQR.Q	
	1065,5544	-6	310 - 318	K.TILMSESLR.N	Oxidation (M)
	1133,6046	-5	351 - 360	R.YPAFGNLVPR.D	
	2502,2943	-6	366 - 389	R.AISQQINAGLVGPLNNAAYLDFR.D	
	1441,7202	-5	499 - 512	R.LSEDAPEAQAAIAR.A	
	1614,7813	-8	541 - 554	R.QLGDILYFSCGVSR.N	
	1770,8983	-11	656 - 670	R.HAEPLFFESVPLQTR.N	
17	Katalase (Cg0310; 58,7 kDa)				54%
	1481,744	-11	57 - 68	K.LAHFNRENVPER.I	
	1289,6784	-14	63 - 73	R.ENVPERIPHAK.G	
	2089,9551	-13	74 - 92	K.GHGAFGELHITDVSEYTK.A	
	1637,7446	-7	108 - 122	R.FSTVAGEEQGSPDTWR.D	
	914,4848	1	123 - 130	R.DVHGFAFR.F	
	2497,1571	-4	131 - 151	R.FYTEEGNYDIVGNNTPTFFLR.D	
	1565,7201	-14	152 - 164	R.DGMKFPDFIHSQK.R	Oxidation (M)
	1690,7626	-13	184 - 198	R.APESAHQVTYLMGDR.G	Oxidation (M)
	1627,7161	-16	276 - 288	K.VQIMPFEDAENYR.W	Oxidation (M)

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1679,9023	-8	302 - 315	K.DYPLIPVGYFILNR.N	
	2767,4289	-4	319 - 344	R.NFFAQIEQLALDPGNIVPGVGLSPDR.M	
	1111,5485	-4	350 - 358	R.IFAYADQQR.Y	
	1886,9534	-10	367 - 382	R.DLPVNRNPINEVNTYSR.E	
	2292,9399	-14	383 - 402	R.EGSMQYIFDAEGEPSYSPNR.Y	Oxidation (M)
	2699,1315	-9	383 - 405	R.EGSMQYIFDAEGEPSYSPNRYDK.G	Oxidation (M)
	3908,7051	-5	406 - 442	K.GAGYLDNGTSSSNHTSYGQADDIYVNPDPHGTDLVR.A	
	1831,8359	-14	448 - 462	K.HQDDDDFIQPGILYR.E	
	2032,9268	-17	473 - 491	R.LADNISNAMQGISEATEPR.V	Oxidation (M)
18	Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein (Cg3118; 63,3 kDa)				26%
	1473,7233	-7	57 - 70	K.QGFSSAPDDIAPR.F	
	1303,6663	-7	106 - 117	R.VRFDGGLASPER.L	
	1048,5018	-4	108 - 117	R.FDGGLASPER.L	
	2577,4111	-1	175 - 200	R.VILGSPVSGVAAEELIDATPAIDAIR.E	
	1560,7716	-6	203 - 214	R.YLDKEEFHNLPR.K	
	1583,7868	-12	313 - 324	K.FREVLETEYLER.K	
	1280,6315	-4	315 - 324	R.EVLETEYLER.K	
	1629,8874	-5	325 - 339	R.KLIDGPVVTTNPGYR.D	
	1501,7906	-7	326 - 339	K.LIDGPVVTTNPGYR.D	
	1727,8049	-4	407 - 421	R.DLDEIGLYSSPSEFR.R	
	1883,8999	-7	407 - 422	R.DLDEIGLYSSPSEFR.R.G	
	1315,6707	-2	444 - 454	R.AIELVDELEER.L	
	2266,211	-3	444 - 463	R.AIELVDELEERLGDLDVPIK.I	
	1332,6056	-7	464 - 475	K.IALNGCPNSCAR.T	
	1350,6845	-4	522 - 533	K.VIADEVGEYVTR.V	
19	Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein (Cg3118; 63,3 kDa)				27%
	1473,7478	10	57 - 70	K.QGFSSAPDDIAPR.F	
	1303,6906	12	106 - 117	R.VRFDGGLASPER.L	
	1048,5211	15	108 - 117	R.FDGGLASPER.L	
	2577,4462	13	175 - 200	R.VILGSPVSGVAAEELIDATPAIDAIR.E	
	1560,7944	9	203 - 214	R.YLDKEEFHNLPR.K	
	1583,8217	10	313 - 324	K.FREVLETEYLER.K	
	1280,6525	12	315 - 324	R.EVLETEYLER.K	
	1629,9144	11	325 - 339	R.KLIDGPVVTTNPGYR.D	
	1501,8157	10	326 - 339	K.LIDGPVVTTNPGYR.D	
	1677,9209	9	385 - 398	R.TTAEKELLFLDIER.K	
	1147,6488	11	390 - 398	K.ELLFLDIER.K	
	1275,7455	12	390 - 399	K.ELLFLDIERK.N	
	1727,828	9	407 - 421	R.DLDEIGLYSSPSEFR.R	
	1883,9328	10	407 - 422	R.DLDEIGLYSSPSEFR.R.G	
	1315,6861	9	444 - 454	R.AIELVDELEER.L	
	1332,6292	11	464 - 475	K.IALNGCPNSCAR.T	
	1350,705	11	522 - 533	K.VIADEVGEYVTR.V	
20	Ferritin (Cg2782; 18,1 kDa)				40%
	999,5187	-18	58 - 65	K.FAQHLLDR.D	
	2395,1911	-21	58 - 78	K.FAQHLLDRDYTPQIGDIAPPK.L	
	1414,6851	-26	66 - 78	R.DYTPQIGDIAPPK.L	
	2058,9841	-24	79 - 97	K.LDV TSAIEAFEASLAHEQK.I	
	1723,7726	-24	104 - 118	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	1045,5437	-19	144 - 154	R.IAGDSGSGILR.I	

Tabelle A5. Peptidmassenfingerprintanalyse von Proteinbanden aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel des angereicherten Proteins 7xHis-ARC plus aller nicht-kovalent gebundenen Proteine aus *C. glutamicum* Δ arc pVWEx1-7xHis-arc nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel (1 μ M Eisen(II)-sulfat). *m/z*, gemessenes Verhältnis Masse/Ladung des bestimmten Peptids; Δ ppm, Abweichung zwischen der gemessenen und errechneten Masse; Position, Position des identifizierten Peptids im Protein; Zugeordnetes Peptid (des identifizierten Proteins); Sequenzabdeckung (durch alle detektierten Peptide auf identifizierten Protein); Mod., gefundene Modifikationen am Peptid.

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
1	AAA+-ATPase 7xHis-ARC (Cg1691; 59,1 kDa)				45%
	1017,5191	-56	45 - 53	R.NAKLAEMLK.S	
	1033,4799	-88	45 - 53	R.NAKLAEMLK.S	Oxidation (M)
	3114,529	-13	57 - 84	R.DKLSVLFSQLEDMAQPPSVYGTFLLETAK.D	
	1193,535	-16	85 - 96	K.DGSNAEIFAGGR.R	
	1351,7361	-25	174 - 185	K.LPRPGDILLVDR.K	
	1479,8433	-14	174 - 186	K.LPRPGDILLVDRK.A	
	1040,5151	-25	187 - 196	K.AGYAFEIAIAK.T	
	939,4861	-20	241 - 248	R.AYNLHPPK.G	
	915,4874	-14	266 - 274	K.AVANSLANR.I	
	1428,6979	-27	275 - 287	R.IGETGTSYFINVK.G	
	2441,1655	-21	312 - 332	R.ELAGDGRPVIIFFDEMESIFR.T	
	3771,8266	-18	335 - 371	R.GSGVSSDMETTVPQLLAELDGVEDLSNVIVVGATNR.E	
	1478,8043	-19	372 - 384	R.EELIDPAILRPGR.L	
	1044,505	-16	397 - 405	K.QGAHDIFTR.Y	
	2043,9776	-22	406 - 423	R.YINDSIPLAEPaedLIDR.A	
	1586,8059	-24	424 - 436	R.AVDHLYTPRPYVR.L	
	3063,4919	-18	437 - 464	R.LTLIDGSVETLNYHDFVSGAMIANIVDR.A	
	3079,4686	-23	437 - 464	R.LTLIDGSVETLNYHDFVSGAMIANIVDR.A	Oxidation (M)
2	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Cg1787; 103,2 kDa)				19%
	1150,5726	-11	2 - 10	M.TDFLRDDIR.F	
	2947,4769	-9	11 - 36	R.FLGQILGEVIAEQEGVEYELVEQAR.L	
	1172,5991	-14	204 - 213	R.IEDEIEVGLR.Y	
	1626,8179	-12	204 - 216	R.IEDEIEVGLRYYK.L	
	1069,6132	-11	217 - 225	K.LSLLLEEIPR.I	
	1663,8074	-19	287 - 300	R.QLHSLEHELSDR.M	
	1974,015	-13	304 - 322	K.VTPQLLALADAGHNDVPSR.V	
	2635,2756	-11	358 - 380	K.VFTPYASPEEFLNDALTDHSLR.E	
	1958,8727	-13	413 - 428	R.QNSESYEDVLTelfER.A	
	2724,3681	-14	663 - 687	R.NLEALVSATLEASLLDVSELTDHQR.A	
	1604,7926	-15	821 - 834	K.LYADLIPDTEVAER.V	
	1646,8569	-13	835 - 847	R.VYSVIREEYFLTK.K	
3	Elongationsfaktor G (Cg0583; 77,9 kDa)				14%
	1096,6082	-6	32 - 40	R.IIFYTGINR.K	
	1443,678	-6	112 - 123	K.EGVPEPQSEQWWR.Q	
	1703,8215	-4	142 - 156	K.LGADFYFTVGTIEDR.L	
	2168,1033	-2	190 - 210	R.GVTPIGTEATVEEIPAEADR.A	
	1993,9619	11	251 - 267	K.MVVNSEIYPVYCGTAYK.N	
	1835,9166	-7	472 - 487	R.EFKVEANIGDPQVAYR.E	
	1288,6816	-6	492 - 502	R.KPVESLSYTHK.K	
4	AAA+-ATPase 7xHis-ARC (Cg1691; 59,1 kDa)				11%
	1193,6126	49	85 - 96	K.DGSNAEIFAGGR.R	
	903,5706	90	155 - 162	R.SGEERVVK.L	
	1478,83	-2	372 - 384	R.EELIDPAILRPGR.L	
	1044,5279	6	397 - 405	K.QGAHDIFTR.Y	
	2044,023	0	406 - 423	R.YINDSIPLAEPaedLIDR.A	

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
5	AAA+-ATPase 7xHis-ARC (Cg1691; 59,1 kDa)				32%
	1351,7678	-1	174 - 185	K.LPRPGDTLLVDR.K	
	939,5137	10	241 - 248	R.AYNLHPPK.G	
	2441,2094	-3	312 - 332	R.ELAGDGRPVIIFFDEMESIFR.T	
	3771,8913	-1	335 - 371	R.GSGVSSDMETTVPQLLAELDGVEDLSNVIVVGATNR.E	
	3787,8814	-2	335 - 371	R.GSGVSSDMETTVPQLLAELDGVEDLSNVIVVGATNR.E	Oxidation (M)
	1478,8304	-1	372 - 384	R.EELIDPAILRPGR.L	
	1044,5306	8	397 - 405	K.QGAHDIFTR.Y	
	2044,0192	-2	406 - 423	R.YINDSIPLAEPEDLIDR.A	
	1586,8435	0	424 - 436	R.AVDHLYTPRPYVR.L	
	3063,548	1	437 - 464	R.LTLIDGSVETLNYHDFVSGAMIANIVDR.A	
	3079,5317	-3	437 - 464	R.LTLIDGSVETLNYHDFVSGAMIANIVDR.A	Oxidation (M)
	1308,6602	-51	516 - 527	R.QGKQVTHAEVVI.-	
6	Galactokinase (Cg2452; 46,3 kDa)				11%
	1141,6017	5	98 - 108	K.HSLSTADIAAR.A	
	2183,1124	7	250 - 270	R.SAGLSAFVVAQTETDPSIYR.E	
	1029,5135	2	276 - 284	R.HAFIDEAAR.A	
	908,4873	4	285 - 292	R.AFSVESLR.L	
7	Putative Aminopeptidase (Cg1693; 44,9 kDa)				23%
	2835,3987	8	1 - 26	-.MHVTDDFLSFIALSPSSYHAAAVER.R	
	1140,6672	3	27 - 35	R.RLLHEGFIR.Q	
	984,5696	7	28 - 35	R.LLHEGFIR.Q	
	2924,4606	10	90 - 116	R.GDLSSHGWQQAGVEVYGGPILPSWLDR.E	
	982,6046	0	133 - 141	K.LVNTPGPIR.I	
	1170,6798	5	142 - 151	R.IPHVAIHLDR.T	
	1996,0518	-1	381 - 399	R.LGIDSVDVGIPLLSMHSAR.E	Oxidation (M)
8	Hypothetisches Protein (Cg2715; 42,3 kDa)				30%
	1748,9786	-28	30 - 45	K.IQQVVEAIVPGDVLRL.T	
	1652,7438	-28	59 - 71	K.LHVDAQHEHHHR.H	
	1794,9749	-26	138 - 155	R.QLNPLGIIAASPIALGFGR.I	
	1156,581	-22	229 - 238	K.DTEGRPNIVR.A	
	921,5002	-16	239 - 246	R.AILFNTSR.S	
	1369,7097	-28	314 - 326	K.TALFAATTTFGIR.S	
	1784,8835	-26	338 - 352	R.RFEQVEVDGHTINIK.I	
	1751,7598	-28	357 - 371	R.DDQVISAQSEFEDIR.S	
	1073,5711	-22	372 - 382	R.SAAVALGISER.E	
9	Putative Aminopeptidase (Cg1826; 38,9 kDa)				38%
	1449,7974	-31	24 - 36	R.IDSILVTSPIHVR.Y	
	2090,0044	-29	64 - 81	R.YTTQIAEEVPDIEALIER.A	
	1413,7266	-30	82 - 95	R.ASATLLAQVEGPR.R	
	1857,9346	-31	97 - 113	R.IAIEAAQTLLDQLDSL.R.E	
	2170,0603	-29	114 - 133	R.EATQEDVELIPVSGVVESIR.L	
	2317,1051	-27	146 - 168	R.DVAALASQAFEDLLAAGELAEGR.S	
	1371,6634	-28	216 - 228	R.GDLVTIDFGAHR.G	
	2255,0569	-31	237 - 256	R.TLVMGEAGEFEAEIYDIVLR.S	
10	Phosphofruktokinase (Cg1409; 37,1 kDa)				22%
	2947,2884	-24	126 - 153	K.TIDNDVNGTDFTFGFDTAVAVATDAVDR.L	
	1165,5448	-22	154 - 163	R.LHTTAESHNR.V	
	1357,7488	-26	216 - 228	K.YGIIVVAEGALPR.E	
	1784,8797	-28	246 - 261	K.TFTGIGQQIADEIHVR.L	
	1024,5696	-20	268 - 276	R.TTVLGHQIR.G	
11	Akzessorisches Protein der Urease (Cg0116; 17,6 kDa)				63%
	2325,1708	12	1 - 20	-.MIITAITDNIYDQPEFVEGR.D	
	2341,1534	7	1 - 20	-.MIITAITDNIYDQPEFVEGR.D	Oxidation (M)

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1134,6245	8	27 - 35	R.FEDLVLDKR.I	
	1210,6915	10	39 - 50	R.VALPGGEELGLR.L	
	1056,6145	8	51 - 59	R.LNHGHPILR.E	
	1681,9246	20	103 - 117	R.HLPAQFSKPGELTEK.A	
	2821,4038	15	118 - 141	K.AAMIVQYDHTVVSFLDEHGIEYQR.T	
	2837,3833	10	118 - 141	K.AAMIVQYDHTVVSFLDEHGIEYQR.T	Oxidation (M)
	1168,6831	9	142 - 151	R.TELVPIPIFR.H	

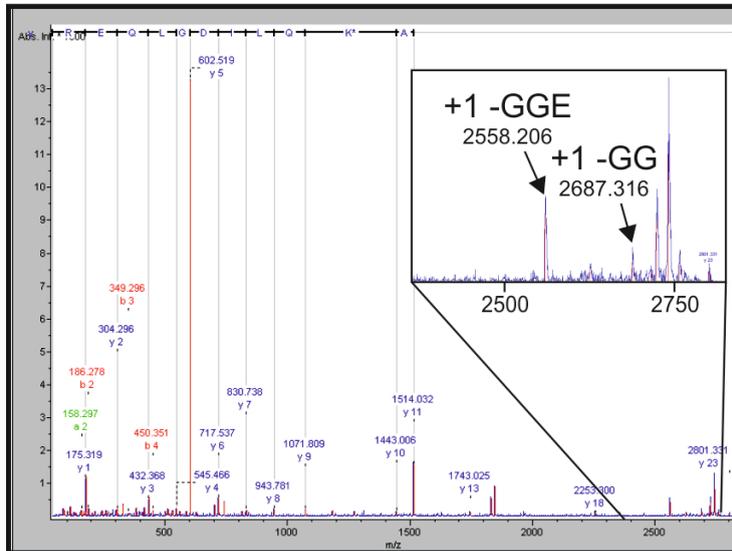
Tabelle A6. Peptidmassenfingerprintanalyse von Proteinbanden aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel der angereicherten Proteine 7xHis-Ftn bzw. 7xHis-Ftn-K78A plus aller kovalent und nicht-kovalent gebundenen Proteine aus *C. glutamicum* Δ pup Δ ftn pVWEx1-Strep-pup-7xHis-ftn bzw. -7xHis-ftn-K78A. *m/z*, gemessenes Verhältnis Masse/Ladung des bestimmten Peptids; Δ ppm, Abweichung zwischen der gemessenen und errechneten Masse; Position, Position des identifizierten Peptids im Protein; Zugeordnetes Peptid (des identifizierten Proteins); Sequenzabdeckung (durch alle detektierten Peptide auf identifizierten Protein); Mod., gefundene Modifikationen am Peptid.

Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
1	30S ribosomales Protein S1 (Cg1531; 54,0 kDa)				18%
	1534,8035	-5	44 - 56	K.VDRDEVLLDIGYK.T	
	1026,6351	4	134 - 143	K.GGLIIDIGLR.G	
	1235,6452	0	144 - 154	R.GFLPASLVEMR.R	Oxidation (M)
	1463,7589	-1	186 - 197	R.RAFLEQTQSEVR.S	
	1307,665	5	187 - 197	R.AFLEQTQSEVR.S	
	1005,5926	5	302 - 310	K.LVPGAFVR.V	
	1878,9877	-2	311 - 327	R.VEEGIEGLVHISELAQR.H	
	972,5471	11	346 - 353	K.VIDIDLER.R	
	1128,6158	-19	346 - 354	K.VIDIDLERR.R	
	1173,6018	1	423 - 432	R.FTAHTAQIER.R	
	1329,6989	-2	423 - 433	R.FTAHTAQIERR.R	
2	30S ribosomales Protein S1 (Cg1531; 54,0 kDa)				34%
	1534,8074	-2	44 - 56	K.VDRDEVLLDIGYK.T	
	1026,6391	8	134 - 143	K.GGLIIDIGLR.G	
	1219,6521	1	144 - 154	R.GFLPASLVEMR.R	
	1235,6485	3	144 - 154	R.GFLPASLVEMR.R	Oxidation (M)
	1745,9017	-3	156 - 170	R.VRDLPYIGQELEAK.I	
	1000,5883	10	171 - 178	K.IIELDKNR.N	
	1463,7586	-1	186 - 197	R.RAFLEQTQSEVR.S	
	1307,6611	2	187 - 197	R.AFLEQTQSEVR.S	
	1129,6142	13	198 - 206	R.SEFLHQLQK.G	
	2901,4463	0	242 - 267	K.HIDHPSEVVTVGDEVTVEVLEVDLDR.E	
	3186,574	-5	242 - 269	K.HIDHPSEVVTVGDEVTVEVLEVDLDRER.V	
	1002,4747	11	276 - 283	K.ATQEDPWR.V	
	1005,5986	11	302 - 310	K.LVPGAFVR.V	
	1878,9953	2	311 - 327	R.VEEGIEGLVHISELAQR.H	
	972,544	8	346 - 353	K.VIDIDLER.R	
	1128,6323	-4	346 - 354	K.VIDIDLERR.R	
	910,4495	13	416 - 422	R.YAESERR.F	
	1173,6077	6	423 - 432	R.FTAHTAQIER.R	
	1329,7035	1	423 - 433	R.FTAHTAQIERR.R	
3	Hypothetisches Protein (Cg2715; 42,3 kDa)				52%
	1749,0175	-5	30 - 45	K.IQQVVEAVIPGDVLLR.T	
	1652,788	-1	59 - 71	K.LHVDAQHEHHHR.H	

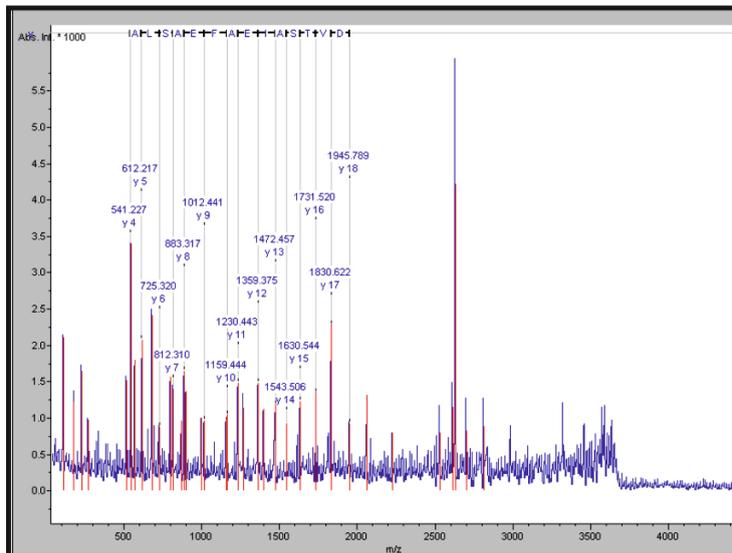
Nr.	Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
	<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
	1795,019	-2	138 - 155	R.QLNPGLIAASPIALGFGR.I	
	2982,5237	0	176 - 204	K.GWPTQTGALMESTEPVGELATPTGVALIR.H	
	2998,5073	-4	176 - 204	K.GWPTQTGALMESTEPVGELATPTGVALIR.H	Oxidation (M)
	2383,1918	-5	205 - 228	R.HFATQDGPFPGGIINEVGIGAGTK.D	
	1156,6092	2	229 - 238	K.DTEGRPNIVR.A	
	921,5222	8	239 - 246	R.AILFNTSR.S	
	1712,8349	-6	253 - 267	R.TLVQLEANVDDQDPR.L	
	1432,7424	-7	300 - 313	R.VSALVDSSEVEAVK.T	
	2783,481	-1	300 - 326	R.VSALVDSSEVEAVKTAALFAATTTFGIR.S	
	1369,7438	-3	314 - 326	K.TALFAATTTFGIR.S	
	1784,9249	-2	338 - 352	R.RFEQVEVDGHTINIK.I	
	1628,815	-8	339 - 352	R.FEQVEVDGHTINIK.I	
	2165,0428	-2	353 - 371	K.IGSRDDQVISAQSEFEDIR.S	
	1751,8002	-5	357 - 371	R.DDQVISAQSEFEDIR.S	
	1073,5989	4	372 - 382	R.SAAVALGISER.E	
4	Hypothetisches Protein (Cg2715; 42,3 kDa)				56%
	1749,0167	-6	30 - 45	K.IQQVVEAIPGDVLLR.T	
	1652,7859	-3	59 - 71	K.LHVDAQHEHHHR.H	
	2149,1592	-13	72 - 90	R.HLSTIKELLVNADIPEQTK.Q	
	1795,0168	-3	138 - 155	R.QLNPGLIAASPIALGFGR.I	
	2982,52	-1	176 - 204	K.GWPTQTGALMESTEPVGELATPTGVALIR.H	
	2998,5055	-4	176 - 204	K.GWPTQTGALMESTEPVGELATPTGVALIR.H	Oxidation (M)
	2383,1946	-4	205 - 228	R.HFATQDGPFPGGIINEVGIGAGTK.D	
	1156,6074	0	229 - 238	K.DTEGRPNIVR.A	
	921,5236	9	239 - 246	R.AILFNTSR.S	
	1712,8351	-6	253 - 267	R.TLVQLEANVDDQDPR.L	
	1432,7393	-10	300 - 313	R.VSALVDSSEVEAVK.T	
	1369,7428	-3	314 - 326	K.TALFAATTTFGIR.S	
	1784,925	-2	338 - 352	R.RFEQVEVDGHTINIK.I	
	1628,8133	-9	339 - 352	R.FEQVEVDGHTINIK.I	
	2165,0404	-3	353 - 371	K.IGSRDDQVISAQSEFEDIR.S	
	1751,7976	-6	357 - 371	R.DDQVISAQSEFEDIR.S	
	1073,5989	4	372 - 382	R.SAAVALGISER.E	
5	Ferritin (Cg2782; 19,1 kDa)				70%
	1857,7937	-11	1 - 14	-.MHHHHHHMTINEK.I	2 Oxidation (M)
	1236,6252	46	50 - 57	R.DWMKAQSK.E	Pup (K)
	1397,6977	-3	54 - 65	K.AQSKEELEHAQK.F	
	999,5471	10	66 - 73	K.FAQHLLDR.D	
	3697,7993	-6	74 - 105	R.DYTPQIGDIAPPKLDVTSIAIEAFEASLAHEQK.I	Pup (K)
	1723,8061	-4	112 - 126	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	2703,3473	-1	127 - 149	R.ALIDWFLNEQIEEEATVGEIIDR.L	
	1045,5726	9	152 - 162	R.IAGDSGSGILR.I	
6	Ferritin (Cg2782; 19,1 kDa)				57%
	999,544	7	66 - 73	K.FAQHLLDR.D	
	2395,236	-2	66 - 86	K.FAQHLLDRDYTPQIGDIAPPK.L	
	2059,0144	-10	87 - 105	K.LDVTSIAIEAFEASLAHEQK.I	
	1723,811	-1	112 - 126	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	
	2703,343	-3	127 - 149	R.ALIDWFLNEQIEEEATVGEIIDR.L	
	1045,5717	8	152 - 162	R.IAGDSGSGILR.I	
	1872,9687	-5	152 - 170	R.IAGDSGSGILRIDGELGSR.-	
7	Ferritin, Ftn-K78A (Cg2782; 19,1 kDa)				41%
	1825,8214	-1	1 - 14	-.MHHHHHHMTINEK.I	
	1841,8091	-5	1 - 14	-.MHHHHHHMTINEK.I	Oxidation (M)
	999,5542	17	66 - 73	K.FAQHLLDR.D	
	1723,8195	4	112 - 126	R.ELAAIQDAEKDYDSR.A	

Nr. Protein (Genlocus-Nummer; Molekulargewicht)				Sequenz- abdeckung
<i>m/z</i>	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Mod.
2703,3776	10	127 - 149	R.ALIDWFLNEQIEEATVGEIIDR.L	
1045,5818	17	152 - 162	R.IAGDSGSGILR.I	

a



b



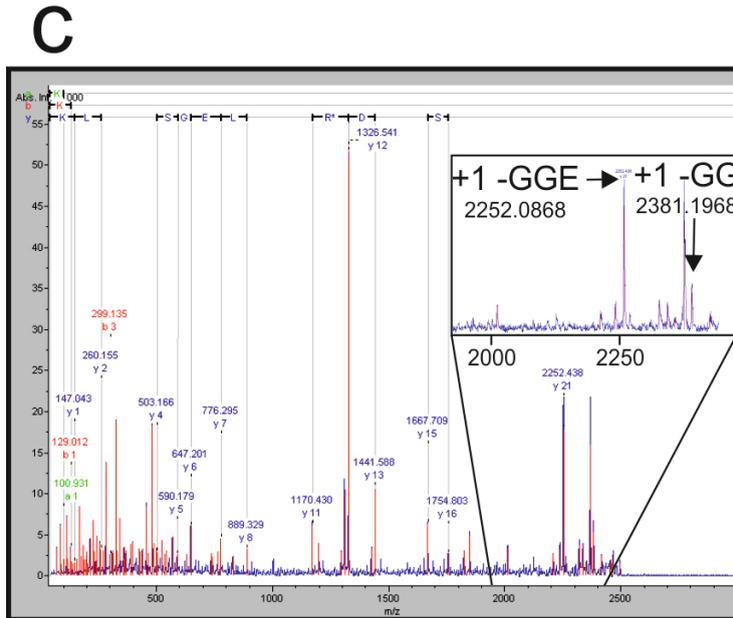


Abbildung A1. MS/MS-Spektren aus MALDI-TOF/TOF-Messungen von pupylierten Peptiden der Proteine (a) Dps (Cg3327), (b) Ftn (Cg2782) und (c) SerS (Cg3201). Gezeigt sind die identifizierten Aminosäuren der γ -Ionenserie (blau), sowie mit Pfeilen die charakteristischen Massen, die bei der Fragmentierung der Pup-Seitenkette entstehen (-GG, -GGE) und auf eine Pupylierung hinweisen. +1 = Ladung der jeweiligen Peptide.

6.2 Zusätzliche Daten zu den MudPIT-Messungen

Tabelle A7. Alle Proteine, die mittels MudPIT in dieser Arbeit identifiziert wurden. Die sechs Proben, die mit MudPIT gemessen wurden, stammten aus Ni^{2+} -Ionenaffinitätschromatographie von zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* Δ pup-Stämmen, die entweder Decahistidin-getaggtges Pup oder Decahistidin-getaggtges Pup-E64A, das nicht zur Pupylierung fähig ist, exprimierten. Der Genlocus, -name, sowie die Annotation sind gezeigt. Außerdem ist gezeigt, welches Protein in welchen Proben (Pup, Pup-E64A) detektiert wurde, inklusive der höchsten in einem Replikat erzielten Peptid-Coverage (Max %). Außerdem ist markiert, ob ein pupyliertes Peptid zu diesem Protein gefunden worden war. UE = Untereinheit.

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg0004	<i>dnaN</i>	DNA Polymerase III, β -UE		0,0	x	7,4	
Cg0007	<i>gyrB</i>	DNA Topoisomerase IV, UE B	x	12,1	x	9,9	
Cg0012	<i>ssuR</i>	Transkriptionsregulator des Sulphonat-Schwefel-Stoffwechsels	x	7,6		0,0	
Cg0015	<i>gyrA</i>	DNA Gyrase, UE A	x	12,4	x	4,6	
Cg0047		Hypothetisches Protein		0,0	x	15,9	
Cg0048	<i>ppiA</i>	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase B		0,0	x	47,7	
Cg0064		Hypothetisches Protein		0,0	x	8,4	
Cg0104	<i>codA</i>	Creatinin-Deaminase	x	12,1		0,0	
Cg0116	<i>ureE</i>	Akzessorisches Protein der Urease	x	94,3	x	98,1	
Cg0122		Putative Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase	x	2,8		0,0	
Cg0129	<i>putA</i>	Putative Prolin-Dehydrogenase	x	8,4		0,0	
Cg0131		Putative Oxidoreductase	x	19,4		0,0	
Cg0138		ATP/GTP-bindendes Protein	x	12,9	x	13,4	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg0154		Halosäure-Dehalogenase-artige Hydrolase	x	12,4		0,0	
Cg0185		Glyoxalase-/Bleomycinresistenz-Protein/Dioxygenase		0,0	x	9,5	
Cg0193	<i>pepO</i>	Endopeptidase O	x	30,4		0,0	x
Cg0202	<i>iolD</i>	Putatives Acetolactat-Synthase-Protein	x	14,4		0,0	
Cg0203	<i>iolE</i>	2-Keto- <i>myo</i> -Inositol-Dehydratase	x	26,7		0,0	
Cg0205	<i>iolH</i>	<i>myo</i> -Inositol-Katabolismus-Protein	x	11,3		0,0	
Cg0229	<i>gltB</i>	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase, große UE	x	5,9		0,0	
Cg0233		Hypothetisches Protein	x	6,1		0,0	
Cg0238		L-Gulonolacton-Oxidase	x	15,2	x	28,5	
Cg0239		Hypothetisches Protein	x	16,0		0,0	
Cg0261	<i>moeA1</i>	Molybdopterin-Cofaktor-Synthese-Protein	x	31,9	x	15,7	
Cg0282		Hypothetisches Protein	x	71,6		0,0	
Cg0294	<i>aspT</i>	Aspartat-Aminotransferase	x	89,2	x	9,2	x
Cg0297		Hypothetisches Protein	x	30,1	x	30,1	
Cg0299	<i>cobQ</i>	Cobyrinsäure-Synthase	x	33,6	x	40,4	
Cg0303	<i>leuA</i>	2-Isopropylmalat-Synthase	x	22,6	x	4,2	
Cg0307	<i>asd</i>	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	x	26,5		0,0	
Cg0310	<i>katA</i>	Katalase	x	41,5		0,0	
Cg0350	<i>glxR</i>	cAMP-abhängiger Transkriptionsregulator	x	85,9	x	73,6	x
Cg0378		Putatives Phagen-assoziiertes Protein	x	38,5		0,0	x
Cg0403	<i>rmlB1</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	x	57,8		0,0	x
Cg0410		Putative Prolyl-Endopeptidase	x	3,6		0,0	
Cg0418		Putative Aminotransferase	x	15,1		0,0	
Cg0422	<i>murA</i>	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase	x	29,9		0,0	
Cg0435	<i>udgA1</i>	UDP-Glucose-6-Dehydrogenase	x	8,0		0,0	
Cg0441	<i>lpd</i>	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	x	12,8	x	7,5	
Cg0444	<i>ramB</i>	Transkriptionsregulator, involviert in den Acetatstoffwechsel	x	20,0	x	17,7	
Cg0446	<i>sdhA</i>	Flavoprotein UE der Succinat:Menachinon-Oxidoreductase	x	6,4	x	12,5	
Cg0447	<i>sdhB</i>	Eisen-Schwefel-Protein UE der Succinat:Menachinon-Oxidoreductase	x	5,6		0,0	
Cg0452		Hypothetisches Protein	x	27,9	x	21,4	
Cg0458	<i>deoC</i>	Desoxyribosephosphat-Aldolase	x	14,4		0,0	
Cg0475		Hypothetisches Protein	x	35,3	x	18,6	x
Cg0482	<i>gpmA</i>	Phosphoglyceratmutase	x	73,0		0,0	x
Cg0512	<i>hemB</i>	δ -Aminolevulinat-Dehydratase	x	13,9		0,0	
Cg0518	<i>hemL</i>	Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase	x	7,8		0,0	
Cg0548	<i>menB</i>	Naphthoatsynthase	x	9,4		0,0	
Cg0562	<i>nusG</i>	Transkriptionsantiterminatorprotein		0,0	x	23,6	
Cg0564	<i>rplA</i>	50S ribosomales Protein L1	x	56,4	x	28,4	
Cg0565		Putativer Transkriptionsregulator	x	28,8	x	28,2	
Cg0572	<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	x	12,9	x	22,2	
Cg0573	<i>rplL</i>	50S ribosomales Protein L7/L12	x	63,3	x	64,8	
Cg0576	<i>rpoB</i>	DNA-gerichtete RNA Polymerase, β -UE	x	6,6	x	7,3	
Cg0577	<i>rpoC</i>	DNA-gerichtete RNA Polymerase, β' -UE	x	18,5	x	13,3	
Cg0582	<i>rpsG</i>	30S ribosomales Protein S7	x	20,0		0,0	
Cg0583	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	x	45,4	x	52,3	x
Cg0587	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu	x	80,3	x	30,3	x
Cg0593	<i>rpsJ</i>	30S ribosomales Protein S10	x	20,0	x	13,6	
Cg0594	<i>rplC</i>	50S ribosomales Protein L3	x	36,7	x	23,4	x
Cg0596	<i>rplD</i>	50S ribosomales Protein L4	x	45,9	x	25,2	
Cg0597	<i>rplW</i>	50S ribosomales Protein L23	x	26,7	x	20,8	
Cg0598	<i>rplB</i>	50S ribosomales Protein L2	x	46,1	x	51,4	
Cg0599	<i>rpsS</i>	30S ribosomales Protein S19	x	57,6		0,0	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupy-liert
Cg0600	<i>rplV</i>	50S ribosomales Protein L22	x	53,3	x	58,3	
Cg0601	<i>rpsC</i>	30S ribosomales Protein S3	x	28,6	x	35,5	
Cg0602	<i>rplP</i>	50S ribosomales Protein L16	x	27,5	x	33,3	
Cg0603	<i>rpmC</i>	50S ribosomales Protein L29	x	31,6		0,0	
Cg0604	<i>rpsQ</i>	30S ribosomales Protein S17	x	38,0		0,0	
Cg0608	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	x	19,7	x	11,5	
Cg0609	<i>rplX</i>	50S ribosomales Protein L24	x	37,5		0,0	
Cg0610	<i>rplE</i>	50S ribosomales Protein L5	x	20,4		0,0	
Cg0628	<i>rpsH</i>	30S ribosomales Protein S8	x	50,8	x	49,2	
Cg0629	<i>rplF</i>	50S ribosomales Protein L6	x	31,5	x	28,7	
Cg0630	<i>rplR</i>	50S ribosomales Protein L18	x	22,4		0,0	
Cg0631	<i>rpsE</i>	30S ribosomales Protein S5	x	31,8	x	26,5	
Cg0634	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	x	19,6		0,0	
Cg0648	<i>adk</i>	Adenylatkinase	x	28,7	x	32,6	
Cg0652	<i>rpsM</i>	30S ribosomales Protein S13	x	41,8	x	40,2	
Cg0653	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	x	31,3	x	17,9	
Cg0654	<i>rpsD</i>	30S ribosomales Protein S4	x	30,9	x	46,3	
Cg0655	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA Polymerase, α -UE	x	23,1	x	28,4	
Cg0656	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17	x	41,1	x	51,5	
Cg0673	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L13	x	38,8	x	48,3	
Cg0674	<i>rpsI</i>	30S ribosomales Protein S9	x	25,8	x	18,7	
Cg0675	<i>mrsA</i>	Phosphoglucosaminmutase	x	6,0		0,0	
Cg0680		Hypothetisches Protein	x	46,3	x	61,4	
Cg0690	<i>groES</i>	Chaperonin, 10 kDa UE	x	52,5	x	50,5	
Cg0691	<i>groEL'</i>	60 kDa Chaperonin, N-terminales Fragment	x	66,9	x	62,1	
Cg0693	<i>groEL</i>	60 kDa Chaperonin, C-terminales Fragment	x	86,2	x	82,2	
Cg0699	<i>guaB2</i>	Inositol-5-Monophosphat-Dehydrogenase	x	23,7	x	23,3	
Cg0700	<i>guaB3</i>	Inositol-5-Monophosphat-Dehydrogenase	x	40,4	x	11,0	
Cg0703	<i>guaA</i>	Bifunktionale GMP-Synthase/Glutamin-Amidotransferase-Protein	x	18,9		0,0	
Cg0720	<i>crtl2</i>	Phytoen-Dehydrogenase (Desaturase)	x	5,5		0,0	
Cg0737		ABC-Typ-Transportsystem	x	9,7	x	17,7	
Cg0750	<i>folD</i>	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase	x	17,6		0,0	
Cg0752		Putatives, sekretiertes oder Membranprotein	x	7,4		0,0	
Cg0755	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase	x	14,0		0,0	
Cg0763	<i>mdh2</i>	Putative Mlat-/L-Lactat-Dehydrogenase		0,0	x	17,9	
Cg0766	<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	x	32,1	x	7,5	
Cg0771		Sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein		0,0	x	26,0	
Cg0789	<i>amiA</i>	Putative N-Acyl-L-Aminosäure-Amidohydrolase	x	57,5	x	31,9	
Cg0790	<i>lpdA</i>	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	x	18,3		0,0	
Cg0791	<i>pyc</i>	Pyruvatcarboxylase	x	7,5		0,0	
Cg0802	<i>accBC</i>	Biotincarboxylase und Biotin-Carboxyl-Carrierprotein	x	32,5	x	18,3	
Cg0810		Hypothetisches Protein	x	59,8		0,0	
Cg0811	<i>dtsR2</i>	Acetyl-/Propionyl-CoA-Carboxylase, β -Kette	x	4,8	x	13,8	
Cg0812	<i>dtsR1</i>	Acetyl-/Propionyl-CoA-Carboxylase, β -Kette	x	9,4		0,0	
Cg0834	<i>tusE</i>	Bakterielles Extrazellulär-gelöste-Substanzen-Bindeprotein		0,0	x	16,3	
Cg0838		Helicase		0,0	x	3,1	
Cg0854	<i>pmmA</i>	Phosphomannomutase	x	10,3		0,0	
Cg0860	<i>sahH</i>	S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase	x	87,9	x	34,7	x
Cg0867		Ribosomen-assoziiertes Protein Y (PSrp-1)	x	55,7	x	52,0	
Cg0868	<i>secA</i>	Preprotein-Translocase	x	3,1		0,0	
Cg0873	<i>aroA</i>	3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyltransferase	x	10,7		0,0	
Cg0892		Hypothetisches Protein	x	32,0	x	41,5	
Cg0898	<i>pdxS</i>	Pyridoxin-Biosynthese-Enzym	x	30,8	x	44,5	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg0924		Sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	x	16,6	x	51,2	
Cg0928		Siderophor-ABC-Transporter		0,0	x	9,6	
Cg0948	<i>serC</i>	Phosphoserin-Aminotransferase	x	28,2		0,0	x
Cg0949	<i>gltA</i>	Citratsynthase	x	49,4	x	5,0	
Cg0957	<i>fas-IB</i>	Fettsäure-Synthase	x	12,2	x	20,9	
Cg0963		Hypothetisches Protein	x	49,4	x	21,4	
Cg0967	<i>cysQ</i>	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat-(PAPS)-3'-Phosphatase	x	13,1	x	16,3	
Cg0973	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	x	18,0		0,0	x
Cg0984	<i>purH</i>	Bifunktionelle Phosphoribosyl-Aminoimidazol-Carboxamid-Formyltransferase/IMP-Cyclohydrolase	x	10,4	x	6,2	
Cg0991	<i>rpmB</i>	50S ribosomales Protein L28	x	41,0	x	30,8	
Cg0994	<i>rpmE</i>	50S ribosomales Protein L31	x	60,2		0,0	
Cg1017	<i>metS</i>	Methionyl-tRNA-Synthetase	x	25,4		0,0	x
Cg1027	<i>dld</i>	D-Lactat-Dehydrogenase		0,0	x	7,7	
Cg1044		Hypothetisches Protein	x	42,7		0,0	x
Cg1069	<i>gapX</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	x	37,3		0,0	
Cg1075	<i>prsA</i>	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	x	27,7		0,0	
Cg1076	<i>glmU</i>	Putative UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase	x	16,3		0,0	
Cg1111	<i>eno</i>	Enolase	x	85,2	x	23,8	x
Cg1123	<i>greA</i>	Transkriptionselongationsfaktor GreA		0,0	x	23,0	
Cg1133	<i>glyA</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase	x	35,5	x	8,8	
Cg1136		Hypothetisches Protein	x	38,2		0,0	x
Cg1141		Hypothetisches Protein	x	12,3		0,0	
Cg1145	<i>fum</i>	Fumarase	x	73,4	x	18,8	x
Cg1157	<i>fbp</i>	Fructose-1,6-Bisphosphatase	x	26,0		0,0	
Cg1203		Mg-Chelatase, UE ChII		0,0	x	6,1	
Cg1240		Hypothetisches Protein	x	36,1	x	44,3	
Cg1244	<i>arsC4</i>	Arsenatreductase	x	30,4		0,0	x
Cg1248		GTPase, involviert in Stressantwort	x	12,0		0,0	
Cg1261		Lysin-Decarboxylase-Familie Protein	x	18,8	x	27,3	
Cg1267		β -Fructosidase (Levanase/Invertase)	x	16,1		0,0	x
Cg1268	<i>glgA</i>	Glycogensynthase	x	31,8		0,0	x
Cg1274	<i>mrp</i>	ATPase, involviert in Chromosomenpartitioning	x	10,7		0,0	
Cg1276	<i>mgtE1</i>	Mg/Co/Ni-Transporter	x	23,5	x	17,9	
Cg1280	<i>odhA</i>	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, UE E1	x	28,8	x	30,7	
Cg1290	<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyltryglutamat-Homocystein-Methyltransferase	x	7,1		0,0	
Cg1307		DNA und RNA Helicase, Superfamilie II		0,0	x	5,1	
Cg1322		Hypothetisches Protein	x	20,1		0,0	
Cg1333	<i>argS</i>	Arginyl-tRNA-Synthetase	x	25,8		0,0	x
Cg1334	<i>lysA</i>	Diaminopimelat-Decarboxylase	x	71,2		0,0	
Cg1337	<i>hom</i>	Homoserin-Dehydrogenase	x	20,5	x	12,6	
Cg1343	<i>narH</i>	Dissimilatorische Nitratreductase, β -UE	x	5,7		0,0	
Cg1344	<i>narG</i>	Dissimilatorische Nitratreductase, α -UE	x	3,0	x	3,0	
Cg1351	<i>moeA3</i>	Molybdopterin-Biosynthese-Protein	x	14,6		0,0	
Cg1354	<i>rho</i>	Transkriptionsterminator Rho	x	12,6	x	13,7	
Cg1362	<i>atpB</i>	ATP-Synthase, α -UE		0,0	x	9,0	
Cg1366	<i>atpA</i>	ATP-Synthase, α -UE	x	7,1	x	20,3	
Cg1367	<i>atpG</i>	ATP-Synthase, γ -UE	x	7,7		0,0	
Cg1368	<i>atpD</i>	ATP-Synthase, β -UE	x	14,3	x	25,7	
Cg1373		Glyoxalase-/Bleomycinresistenz-/Dioxygenase-Superfamilie Protein	x	44,4		0,0	x
Cg1381	<i>glgB</i>	Glycogen-Branchingenzyme	x	55,5	x	60,7	
Cg1386	<i>etfB</i>	Elektronentransfer-Flavoprotein, β -UE	x	34,7		0,0	x
Cg1387	<i>etfA</i>	Elektronentransfer-Flavoprotein, α -UE	x	15,8		0,0	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg1401	<i>ligA</i>	DNA-Ligase	x	7,2		0,0	
Cg1403	<i>gatC</i>	Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, UE C	x	29,3		0,0	
Cg1404	<i>gatA</i>	Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, UE A	x	23,5	x	8,7	
Cg1409	<i>pfkA</i>	6-Phosphofruktokinase	x	59,5	x	49,9	
Cg1413		Sekretiertes Zucker-bindendes Protein		0,0	x	14,3	
Cg1420	<i>gatB</i>	Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, UE B	x	8,8		0,0	x
Cg1423		Putative Oxidoreductase	x	14,4		0,0	
Cg1435	<i>ilvB</i>	Acetolactatsynthase, große UE	x	8,2		0,0	x
Cg1436	<i>ilvN</i>	Acetolactatsynthase, kleine UE	x	20,4		0,0	
Cg1437	<i>ilvC</i>	Hydroxysäure-Reductoisomerase	x	32,0	x	16,9	x
Cg1448		Hypothetisches Protein	x	27,1	x	34,2	
Cg1451	<i>serA</i>	Phosphoglycerat-Dehydrogenase	x	43,8	x	29,3	
Cg1453	<i>leuB</i>	3-Isopropylmalat-Dehydrogenase	x	9,1		0,0	
Cg1459		SAM-abhängige Methyltransferase	x	31,3	x	35,8	
Cg1463	<i>gltX</i>	Glutamyl-tRNA-Synthetase	x	4,4	x	10,7	
Cg1479	<i>malP</i>	Maltodextrin-Phosphorylase	x	27,8	x	34,5	
Cg1487	<i>leuC</i>	Isopropylmalat-Isomerase, große UE	x	54,7		0,0	
Cg1488	<i>leuD</i>	Isopropylmalat-Isomerase, kleine UE	x	88,3		0,0	x
Cg1501	<i>coaD</i>	Phosphopantethin-Adenylyltransferase	x	22,5		0,0	
Cg1502		Transportsystem für polare Aminosäuren (ABC-Typ)	x	16,5		0,0	
Cg1531	<i>rpsA</i>	30S ribosomales Protein S1	x	22,4	x	40,7	
Cg1537	<i>ptsG</i>	Glucose-spezifische Enzym-II-BC-Komponente von PTS	x	4,4	x	7,8	
Cg1550	<i>uvrB</i>	Excinuclease ABC, UE B	x	3,5		0,0	
Cg1551	<i>uspA1</i>	Universelles Stressprotein UspA	x	28,6		0,0	
Cg1553	<i>qor2</i>	Chinon-Oxidoreductase	x	20,6		0,0	x
Cg1556		Hypothetisches Protein	x	18,4	x	35,9	
Cg1563	<i>infC</i>	Translationsinitiationsfaktor IF3 Protein	x	15,3		0,0	
Cg1564	<i>rpml</i>	50S ribosomales Protein L35		0,0	x	21,9	
Cg1565	<i>rplT</i>	50S ribosomales Protein L20	x	19,7	x	11,0	
Cg1574	<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, α -UE	x	8,1		0,0	
Cg1575	<i>pheT</i>	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase β -UE	x	12,7		0,0	
Cg1582	<i>argB</i>	Acetylglutamatkinase	x	9,2		0,0	
Cg1583	<i>argD</i>	Acetylmethionin-Aminotransferase	x	72,4		0,0	
Cg1584	<i>argF</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	x	31,0		0,0	
Cg1586	<i>argG</i>	Argininosuccinatsynthase	x	94,5	x	11,7	
Cg1588	<i>argH</i>	Argininosuccinatlase	x	13,4		0,0	
Cg1595	<i>uspA2</i>	Universelles Stressprotein UspA	x	44,5		0,0	x
Cg1606	<i>pyrG</i>	CTP-Synthetase	x	5,6	x	8,8	
Cg1630	<i>odhI</i>	Oxoglutarat-Dehydrogenase Inhibitorprotein	x	28,0	x	30,1	
Cg1643	<i>gnd</i>	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	x	35,2		0,0	
Cg1656	<i>ndh</i>	Typ-II-NADH-Dehydrogenase	x	9,2	x	18,2	
Cg1659	<i>gpt</i>	Purin-Phosphoribosyltransferase	x	30,4		0,0	x
Cg1688	<i>pafA</i>	Pup-Ligase	x	7,3		0,0	
Cg1689	<i>pup</i>	Prokaryotic ubiquitin-like protein	x	93,8	x	93,8	
Cg1690	<i>dop</i>	Depupylase	x	91,6	x	89,5	
Cg1691	<i>arc</i>	AAA+ ATPase forming ring-shaped complexes, erkennt Pup	x	42,1	x	38,1	
Cg1692	<i>pimT</i>	SAM-abhängige Methyltransferase, involviert in tRNA-Met-Maturierung	x	47,8	x	27,0	
Cg1693	<i>pepC</i>	Putative Aminopeptidase 2	x	34,5	x	36,2	
Cg1697	<i>aspA</i>	Aspartat-Ammonium-Lyase (Aspartase)	x	46,0	x	37,1	
Cg1725	<i>mutA</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase, α -UE	x	11,4	x	16,6	
Cg1726	<i>mutB</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase, β -UE		0,0	x	7,5	
Cg1734	<i>hemH</i>	Ferrochelatase Precursor	x	23,0		0,0	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg1737	<i>acn</i>	Aconitase	x	54,0	x	25,0	x
Cg1762	<i>sufC</i>	Fe-S-Cluster Assemblierung, ATPase	x	27,0	x	20,2	
Cg1763	<i>sufD</i>	Fe-S-Cluster Assemblierung, Membranprotein	x	19,6		0,0	
Cg1764	<i>sufB</i>	Fe-S-Cluster Assemblierungsprotein	x	23,1	x	27,2	
Cg1774	<i>tkt</i>	Transketolase	x	8,4	x	13,1	
Cg1779	<i>opcA</i>	Putative UE der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	x	9,7		0,0	
Cg1787	<i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvatcarboxylase	x	39,1	x	60,3	
Cg1789	<i>tpi</i>	Triosephosphatisomerase	x	24,7		0,0	
Cg1790	<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase	x	56,1	x	19,3	x
Cg1791	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	x	26,7	x	31,1	
Cg1794		Hypothetisches Protein	x	13,6		0,0	
Cg1802	<i>fmu</i>	Putative 16S rRNA m(5)C 967 Methyltransferase	x	34,6	x	17,6	
Cg1806	<i>metK</i>	S-Adenosylmethionin-Synthetase	x	17,0		0,0	
Cg1807	<i>dfp</i>	Phosphopantothencystein-Synthase/-Decarboxylase	x	54,7	x	68,0	
Cg1811	<i>ihf</i>	Putativer Integration-Host-Factor cIHF	x	46,2	x	44,3	x
Cg1813	<i>carB</i>	Carbamoylphosphat-Synthase, große UE		0,0	x	6,6	
Cg1825	<i>efp</i>	Elongationsfaktor p	x	23,0		0,0	
Cg1831		Bacterielles Regulatorprotein, ArsR Familie	x	39,6	x	39,6	
Cg1834		ATP-bindendes Protein eines ABC-Transporters	x	18,3		0,0	
Cg1838	<i>alaS</i>	Alanyl-tRNA-Synthetase	x	15,4	x	13,3	
Cg1841	<i>aspS</i>	Aspartyl-tRNA-Synthetase	x	8,7	x	4,6	
Cg1848		Putative Coenzyme-F420-abhängige N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-Tetrahydromethanopterin-Reductase	x	59,0	x	49,1	
Cg1855	<i>hisS</i>	Histidyl-tRNA-Synthetase	x	9,1		0,0	
Cg1880	<i>thrS</i>	Threonyl-tRNA-Synthetase	x	5,4		0,0	
Cg1960		Hypothetisches Protein	x	2,2	x	4,0	
Cg1997	<i>cgIIIR</i>	Typ-II-Restriktionsendonuclease	x	8,1		0,0	
Cg1998	<i>cgIIIR</i>	Restriktionsendonuclease CgIIIR	x	13,9	x	4,0	
Cg2039		Hypothetisches Protein	x	30,1	x	22,9	
Cg2043		Hypothetisches Protein	x	36,0	x	25,2	
Cg2079		Hypothetisches Protein	x	29,7	x	14,2	
Cg2081	<i>rnd</i>	Putative Ribonuclease D	x	4,5		0,0	
Cg2083	<i>dxs</i>	1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase	x	38,4		0,0	x
Cg2103	<i>dtxR</i>	Diphtherietoxin Repressor	x	12,7	x	50,9	
Cg2117	<i>ptsl</i>	Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferase-System Enzym I	x	10,0	x	10,0	
Cg2120	<i>ptsF</i>	Fructose-spezifische Enzym-II-BC-Komponent von PTS	x	2,5		0,0	
Cg2132		Hypothetisches Protein	x	16,1	x	18,5	
Cg2137	<i>gluB</i>	Sekretiertes Glutamat-Bindeprotein		0,0	x	31,2	
Cg2141	<i>recA</i>	Recombinase A	x	10,4		0,0	
Cg2151		Ähnlich zu Phagenschockprotein A		0,0	x	11,2	
Cg2160		Hydrolase der Metallo-β-Lactamase-Superfamilie	x	12,0	x	14,6	
Cg2161	<i>dapA</i>	Dihydrodipicolinat-Synthase	x	7,0		0,0	
Cg2163	<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinat-Reductase	x	35,1		0,0	
Cg2166	<i>gpsI</i>	Putative Polyribonucleotid-Phosphorylase/Guanosin-Pentaphosphatsynthetase	x	7,0	x	7,2	
Cg2167	<i>rpsO</i>	30S ribosomales Protein S15	x	46,1	x	40,5	
Cg2176	<i>infB</i>	Translationsinitiationsfaktor IF-2	x	5,4	x	4,9	
Cg2179		Hypothetisches Protein	x	33,2		0,0	
Cg2181	<i>oppA</i>	ABC-Typ-Peptid-Transportsystem, sekretierte Komponente		0,0	x	12,6	
Cg2185	<i>proS</i>	Prolyl-tRNA-Synthetase	x	32,0	x	4,9	
Cg2192	<i>mgo</i>	Malat:Chinon-Oxidoreductase	x	14,4	x	39,6	
Cg2194	<i>gor</i>	Mycothionreductase	x	4,7		0,0	
Cg2206	<i>ispG</i>	4-Hydroxy-3-Methylbut-2-en-1-yl-Diphosphat-Synthase	x	23,1	x	9,2	
Cg2217	<i>frf</i>	Ribosom Release-Faktor	x	26,0	x	43,2	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg2218	<i>pyrH</i>	Uridylatkinase	x	14,0		0,0	
Cg2221	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts	x	66,2	x	55,6	
Cg2222	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	x	21,3	x	29,8	
Cg2229		Putative CTP-Synthase (UTP-Ammonium-Lyase)	x	33,7	x	61,4	
Cg2235	<i>rplS</i>	50S ribosomales Protein L19	x	31,9		0,0	
Cg2253	<i>rpsP</i>	30S ribosomales Protein S16	x	50,3	x	50,3	
Cg2262	<i>ftsY</i>	Signal Recognition Particle GTPase	x	4,5		0,0	
Cg2263		Hypothetisches Protein	x	1,9	x	4,2	
Cg2274		Putativ Metall-/Nukleinsäure-bindendes Protein	x	17,4		0,0	
Cg2275		Putatives Zellteilungsprotein	x	39,5	x	37,3	x
Cg2280	<i>gdh</i>	Glutamat-Dehydrogenase	x	34,2	x	16,6	
Cg2284		Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase	x	24,3	x	6,1	
Cg2291	<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	x	44,4	x	13,4	
Cg2304	<i>hisC</i>	Histidinolphosphat-Aminotransferase	x	86,6		0,0	x
Cg2305	<i>hisD</i>	Histidinol-Dehydrogenase	x	70,8		0,0	x
Cg2310	<i>glgX</i>	Glycogen Debranching Enzyme	x	3,8	x	6,6	
Cg2333	<i>treZ</i>	Malto-Oligosyltrehalose Trehalohydrolase	x	11,0		0,0	
Cg2337	<i>metE</i>	Methioninsynthase	x	16,5		0,0	
Cg2359	<i>ileS</i>	Isoleucyl-tRNA-Synthetase	x	13,7	x	3,2	
Cg2361	<i>divIVA</i>	Essentiell für Zellelongation	x	34,0	x	31,0	
Cg2363		Hypothetisches Protein	x	23,7		0,0	
Cg2366	<i>ftsZ</i>	Zellteilungsprotein	x	16,1		0,0	
Cg2371	<i>murD</i>	UDP-N-Acetylmuramoylalanin-D-Glutamat-Synthetase	x	9,5		0,0	
Cg2374	<i>murE</i>	UDP-N-Acetylmuramoylalanin-D-Glutamat-2,6-Diaminopimelatligase	x	34,0		0,0	
Cg2409	<i>ctaC</i>	Cytochrom <i>aa₃</i> Oxidase, UE II		0,0	x	23,7	
Cg2410	<i>ftsA</i>	Glutamin-abhängige Amidotransferase, involviert in die Zellwandbildung und L-Glutamatbiosynthese	x	5,8	x	6,1	
Cg2421	<i>aceF</i>	Dihydroliptonamid-Acetyltransferase	x	22,5	x	32,7	
Cg2429	<i>glnA</i>	Glutamin-Synthetase I	x	26,6	x	35,9	
Cg2450		Putatives Pyridoxin-Biosynthese Enzyme	x	5,1		0,0	
Cg2452		Galactokinase	x	75,9	x	81,4	
Cg2453		Putative Exoribonuclease	x	38,5		0,0	x
Cg2456		Zn-Ribbon Protein, bindet putativ Nukleinsäuren	x	29,7	x	28,5	
Cg2466	<i>aceE</i>	Pyruvatdehydrogenase, UE E1	x	30,4	x	30,3	
Cg2487		Hypothetisches Protein	x	6,5		0,0	
Cg2492	<i>glmS</i>	D-Fructose-6-phosphat-Amidotransferase	x	14,2	x	14,9	
Cg2496		Putatives, sekretiertes Protein	x	6,1		0,0	
Cg2499	<i>glyS</i>	Glycyl-tRNA-Synthetase	x	70,1	x	62,9	
Cg2513	<i>phoH2</i>	Phosphatmangel-induziertes Protein	x	54,0	x	58,4	
Cg2515	<i>dnaJ2</i>	Molekulares Chaperon	x	11,3		0,0	
Cg2523	<i>malQ</i>	4- α -Glucanotransferase	x	14,2	x	5,4	
Cg2527	<i>dcp</i>	Putative Peptidyl-Dipeptidase A	x	75,8		0,0	x
Cg2529	<i>treS</i>	Trehalose-Synthase (Maltose α -D-Glucosyltransferase)	x	14,9	x	7,5	
Cg2536	<i>metC</i>	Cystathionin- β -Lyase	x	25,3		0,0	
Cg2558		Putative Aldose-1-Epimerase	x	11,4		0,0	
Cg2562		Putative Calcineurin-artige Phosphoesterase	x	31,8	x	27,7	
Cg2573	<i>rpsT</i>	30S ribosomales Protein S20	x	35,6	x	35,6	
Cg2586	<i>proA</i>	γ -Glutamylphosphat-Reductase	x	6,0		0,0	
Cg2589		Putative GTPase	x	9,6		0,0	
Cg2594	<i>rpmA</i>	50S ribosomales Protein L27	x	26,1	x	39,8	
Cg2595	<i>rplU</i>	50S ribosomales Protein L21	x	42,6		0,0	
Cg2603	<i>ndk</i>	Nucleosiddiphosphat-Kinase	x	39,0		0,0	
Cg2609	<i>valS</i>	Valyl-tRNA-Synthetase	x	22,7		0,0	x
Cg2612		Putatives Rossmann-fold Nucleotid-bindendes Protein	x	26,7		0,0	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg2613	<i>mdh</i>	Malatdehydrogenase	x	25,6		0,0	
Cg2622	<i>pcaJ</i>	β -Ketoacidpat-Succinyl-CoA-Transferase UE	x	29,4	x	31,3	
Cg2623	<i>pcaI</i>	β -Ketoacidpat-Succinyl-CoA-Transferase UE	x	92,4	x	77,6	
Cg2631	<i>pcaH</i>	Protocatechuat-Dioxygenase, β -UE		0,0	x	25,2	
Cg2647	<i>tig</i>	Triggerfaktor	x	16,3		0,0	
Cg2658	<i>rpi</i>	Ribose-5-phosphat-Isomerase B	x	30,6	x	54,1	
Cg2661		Putative Dithiol-Disulfidisomerase, involviert in Polyketidbiosynthese		0,0	x	12,3	
Cg2662	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	x	5,9		0,0	
Cg2674		Alkylhydroperoxidase		0,0	x	8,3	
Cg2678		ABC-Typ Dipeptid-/Oligopeptid-/Nickel-Transportsystem, sekretierte Komponente		0,0	x	11,3	
Cg2679		Hypothetisches Protein	x	3,6		0,0	
Cg2680		Hypothetisches Protein	x	51,1		0,0	
Cg2687	<i>metB</i>	Cystathionin- γ -Synthase	x	10,9		0,0	
Cg2695		ABC-Typ Transportsystem, ATPase Komponente	x	7,0		0,0	
Cg2705	<i>amyE</i>	Maltose-Bindeprotein Precursor	x	38,4	x	62,5	
Cg2708	<i>msiK1</i>	ABC-Typ Zucker-Transportsystem	x	12,5		0,0	
Cg2715		Hypothetisches Protein	x	80,0	x	80,7	
Cg2734	<i>pncA</i>	Nicotinamidase/Pyrazinamidase	x	53,8	x	48,9	
Cg2743	<i>fas-IA</i>	Fettsäure-Synthase	x	5,8	x	6,5	
Cg2779	<i>serB</i>	Phosphoserin-Phosphatase	x	9,2		0,0	
Cg2782	<i>ftn</i>	Ferritin	x	92,6	x	54,9	x
Cg2783	<i>gntR1</i>	Gluconat-reagierender Repressor der Gene des Gluconatkatabolismus und Pentose-Phosphat-Wegs	x	16,4		0,0	
Cg2786	<i>nrdE</i>	Ribonucleotid-Diphosphat-Reductase, α UE	x	5,2	x	3,6	
Cg2795		NADPH-Chinonreductase oder verwandte Zn-abhängige Oxidoreductase	x	21,8		0,0	
Cg2800	<i>pgm</i>	Phosphoglucomutase	x	22,9	x	7,0	
Cg2812		ABC-Typ Transportsystem, involviert in Lipoprotein-Freisetzung		0,0	x	13,0	
Cg2829	<i>murA2</i>	UDP-N-Acetylglucosamin-1-carboxyvinyltransferase	x	10,2		0,0	
Cg2830	<i>pduO</i>	Adenosylcobalamin-abhängige Diol-Dehydratase	x	13,7		0,0	
Cg2833	<i>cysK</i>	O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase	x	67,9	x	46,6	x
Cg2840	<i>actA</i>	Acetyl-CoA:CoA-Transferase	x	51,6	x	13,2	x
Cg2841		Putatives TIM-Barrel Enzym		0,0	x	7,4	
Cg2847	<i>mshD</i>	Acetyltransferase	x	55,1	x	13,7	
Cg2850		Hypothetisches Protein		0,0	x	15,7	
Cg2856	<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Synthetase	x	10,6		0,0	
Cg2860		Putatives Acyl-CoA-Thioester-Hydrolase Protein	x	10,3	x	9,1	
Cg2862	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase, UE II	x	3,3		0,0	
Cg2863	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase, UE I	x	26,0	x	24,7	
Cg2873	<i>ptrB</i>	Prolyl-Oligopeptidase	x	7,5	x	18,3	
Cg2876	<i>purB</i>	Adenylosuccinat-Lyase	x	10,7		0,0	
Cg2878	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-Glycin-Ligase	x	14,5		0,0	
Cg2888	<i>phoR</i>	Zwei-Komponenten-Response-Regulator	x	27,7		0,0	
Cg2891	<i>pqo</i>	Pyruvat:Chinon-Oxidoreductase	x	29,5		0,0	
Cg2923		Putative rRNA-Methyltransferase, TRMH Familie		0,0	x	13,7	
Cg2945	<i>ispD</i>	2-C-Methyl-D-Erythritol-4-phosphat- Cytidyltransferase	x	21,5		0,0	
Cg2958	<i>butA</i>	L-2,3-Butandiol-Dehydrogenase/Acetoin-Reductase	x	60,9	x	35,7	x
Cg2963	<i>clpC</i>	ATPase UE der ATP-abhängigen ClpP1/P2-Protease	x	16,7	x	17,6	
Cg2964	<i>guaB1</i>	Inositol-5-Monophosphat-Dehydrogenase	x	8,2		0,0	
Cg2970		Hypothetisches Protein		0,0	x	4,4	
Cg2988	<i>ppa</i>	Anorganische Pyrophosphatase	x	84,2	x	85,4	x
Cg3011	<i>groEL</i>	Chaperon GroEL	x	37,0	x	33,2	
Cg3016		Hypothetisches Protein		0,0	x	4,9	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pup	Max %	Pup-E64A	Max %	Pupyliert
Cg3021		Hypothetisches Protein	x	5,3		0,0	
Cg3047	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	x	18,9		0,0	x
Cg3049	<i>fprA</i>	Putative Ferredoxin-/Ferredoxin-NADP-Reductase	x	18,2		0,0	
Cg3063	<i>purA</i>	Adenylosuccinat-Synthetase	x	73,3	x	17,0	x
Cg3068	<i>fda</i>	Fructose-Bisphosphat-Aldolase	x	40,7	x	29,9	x
Cg3093		Kohlenstoff-/Stickstoff-Hydrolase	x	12,8		0,0	
Cg3096	<i>ald</i>	Aldehyd-Dehydrogenase	x	61,5		0,0	
Cg3098	<i>dnaJ</i>	Chaperon DnaJ	x	7,3		0,0	
Cg3100	<i>dnaK</i>	Chaperon DnaK	x	66,8	x	53,4	
Cg3103		Hypothetisches Protein	x	14,4	x	16,0	
Cg3107	<i>adhA</i>	Zn-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	x	11,0		0,0	
Cg3114	<i>cysN</i>	Sulfat-Adenylyltransferase, UE 1	x	9,5		0,0	
Cg3115	<i>cysD</i>	Sulfat-Adenylyltransferase, UE 2	x	5,6		0,0	
Cg3118	<i>cysI</i>	Sulfit-Reductase (Hämoprotein)	x	15,9		0,0	x
Cg3119	<i>cysJ</i>	Putative Sulfit-Reductase (Flavoprotein)	x	11,6		0,0	
Cg3141	<i>hmp</i>	Flavohämoprotein	x	7,0		0,0	
Cg3155	<i>dcd</i>	Desoxycytidin-Triphosphat-Desaminase	x	22,8		0,0	
Cg3169	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (GTP)	x	30,8	x	12,5	
Cg3173		Hypothetisches Protein	x	28,5	x	10,5	
Cg3179	<i>fadD2</i>	Acyl-CoA-Synthase	x	9,2		0,0	
Cg3191		Putative Glycosyltransferase	x	21,6	x	19,5	
Cg3196	<i>glf</i>	UDP-Galactopyranose-Mutase	x	12,2		0,0	
Cg3201	<i>serS</i>	Seryl-tRNA-Synthetase	x	52,3		0,0	x
Cg3218		Pyruvatkinase-artiges Protein	x	8,1	x	9,9	
Cg3219	<i>ldhA</i>	NAD-abhängige L-Lactatdehydrogenase	x	29,9		0,0	x
Cg3224	<i>lldR</i>	Repressor des <i>cg3226-lldD</i> -Operons	x	13,9		0,0	
Cg3227	<i>lldD</i>	Chinon-abhängige L-Lactatdehydrogenase	x	5,2	x	29,8	
Cg3237	<i>sod</i>	Mangan-Superoxid-Dismutase	x	33,5	x	17,0	
Cg3255	<i>uspA3</i>	Universelles Stressprotein	x	21,9		0,0	x
Cg3256		Alkanal-Monooxygenase, α -Kette	x	38,2		0,0	
Cg3284	<i>copS</i>	Sensorkinase des Kupfer-Sensenden Zwei-Komponenten-Systems CopRS	x	20,8		0,0	
Cg3303		Transkriptionsregulator, PadR-ähnliche Familie	x	33,3	x	41,2	
Cg3308	<i>rpsF</i>	30S ribosomales Protein S6	x	35,8	x	29,5	
Cg3319		Hypothetisches Protein	x	23,7		0,0	
Cg3327	<i>dps</i>	Mangelinduziertes DNA-Schutzprotein	x	90,9	x	51,5	
Cg3346	<i>leuS</i>	Leucyl-tRNA-Synthetase	x	12,6		0,0	
Cg3351	<i>nagl</i>	Gentisat-1,2-Dioxygenase Oxidoreductase	x	24,5		0,0	
Cg3359	<i>trpE</i>	Anthranilat-Synthase, Komponente I	x	7,9		0,0	
Cg3389	<i>oxiC</i>	<i>myo</i> -Inositol-Dehydrogenase	x	29,5		0,0	
Cg3398		DNA oder RNA Helicase der Superfamilie II	x	2,8		0,0	
Cg3404		Sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein		0,0	x	10,5	
Cg3409	<i>thiD2</i>	Phosphomethylpyrimidinkinase	x	22,6		0,0	
Cg3422	<i>trxB</i>	Thioredoxin-Reductase	x	36,9		0,0	x

Tabelle A8. Liste mit 72 Proteinen, die mittels MudPIT in allen Pup-Proben, aber nicht in den Pup-E64A-Kontrollen identifiziert worden waren. Die Proben stammten aus einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie mit zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* Stämmen, die Decahistidin-getaggetes Pup exprimiert hatten. Gezeigt sind der Genlocus, -name und die Annotation. 21 bestätigte Pup-Zielproteine sind in der letzten Spalte angeführt. Die übrigen 51 Proteine sind putative Pup-Zielproteine.

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pupyliert
Cg0129	<i>putA</i>	Prolin-Dehydrogenase	
Cg0131		Putative Oxidoreductase	
Cg0193	<i>pepO</i>	Endopeptidase O	x
Cg0307	<i>asd</i>	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	
Cg0310	<i>katA</i>	Katalase	
Cg0403	<i>rmlB1</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	x
Cg0418		Putative Aminotransferase	
Cg0422	<i>murA</i>	UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase	
Cg0482	<i>gpmA</i>	Phosphoglyceratmutase	x
Cg0599	<i>rpsS</i>	30S ribosomales Protein S19	
Cg0703	<i>guaA</i>	Bifunktionale GMP-Synthase/Glutamin-Amidotransferase Protein	
Cg0755	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase	
Cg0790	<i>lpdA</i>	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	
Cg0854	<i>pmmA</i>	Phosphomannomutase	
Cg0948	<i>serC</i>	Phosphoserin-Aminotransferase	x
Cg0973	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	x
Cg1017	<i>metS</i>	Methionyl-tRNA-Synthetase	
Cg1069	<i>gapX</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	
Cg1075	<i>prsA</i>	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	
Cg1076	<i>glmU</i>	Putative UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase	
Cg1157	<i>fbp</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	
Cg1268	<i>glgA</i>	Glycogen-Synthase	x
Cg1333	<i>argS</i>	Arginyl-tRNA-Synthetase	x
Cg1334	<i>lysA</i>	Diaminopimelat-Decarboxylase	
Cg1351	<i>moeA3</i>	Molybdopterin-Biosynthese Protein	
Cg1386	<i>effB</i>	Putatives Elektronentransfer-Flavoprotein, β -UE	x
Cg1435	<i>ilvB</i>	Acetolactat-Synthase I, große UE	x
Cg1487	<i>leuC</i>	Isopropylmalat-Isomerase, große UE	
Cg1488	<i>leuD</i>	Isopropylmalat-Isomerase, kleine UE	x
Cg1575	<i>pheT</i>	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, β -UE	
Cg1583	<i>argD</i>	Acetylmethionin-Aminotransferase	
Cg1584	<i>argF</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	
Cg1588	<i>argH</i>	Argininosuccinat-Lyase	
Cg1595	<i>uspA2</i>	Universales Stressprotein	x
Cg1643	<i>gnd</i>	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	
Cg1763	<i>sufD</i>	Fe-S-Cluster Assemblierungs membranprotein	
Cg1789	<i>tpi</i>	Triosephosphatisomerase	
Cg1806	<i>metK</i>	S-Adenosylmethionin-Synthetase	
Cg1855	<i>hisS</i>	Histidyl-tRNA-Synthetase	
Cg2083	<i>dxs</i>	1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase	x
Cg2304	<i>hisC</i>	Histidinol-phosphat-Aminotransferase	x
Cg2305	<i>hisD</i>	Histidinol-Dehydrogenase	x
Cg2337		Ähnlich der Methionin-Synthase II	
Cg2374	<i>murE</i>	UDP-N-Acetylmuramoylalaninyl-D-Glutamat-2,6-Diaminopimelat-Ligase	
Cg2453		Putative Exoribonuclease	x
Cg2527	<i>dcp</i>	Putative Peptidyl-Dipeptidase A	x
Cg2536	<i>metC</i>	Cystathionin- β -Lyase	
Cg2603	<i>ndk</i>	Nucleosiddiphosphat-Kinase	
Cg2609	<i>valS</i>	Valyl-tRNA-Synthetase	x
Cg2612		Putatives Rossmann-Fold Nucleotid-bindendes Protein	

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Pupyliert
Cg2613	<i>mdh</i>	Malaldehyhydrogenase	
Cg2647	<i>tig</i>	Triggerfaktor	
Cg2662	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	
Cg2680		Hypothetisches Protein	
Cg2795		NADPH-Chinonreductase oder verwandte Zn-abhängige Oxidoreductase	
Cg2856	<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Synthetase	
Cg2876	<i>purB</i>	Adenylosuccinat-Lyase	
Cg2888	<i>phoR</i>	Zwei-Komponenten-Responseregulator	
Cg2891	<i>pqo</i>	Pyruvate:Chinon-Oxidoreductase	
Cg3047	<i>ackA</i>	Acetat/Propionat-Kinase	x
Cg3049	<i>fprA</i>	Putative Ferredoxin/Ferredoxin-NADP-Reductase	
Cg3096	<i>ald</i>	Aldehyddehydrogenase	
Cg3118	<i>cysI</i>	Sulfit-Reductase (Hämoprotein)	x
Cg3179	<i>fadD2</i>	Acyl-CoA-Synthase	
Cg3201	<i>serS</i>	Seryl-tRNA-Synthetase	x
Cg3256		Alkanalmonooxygenase, α -Kette	
Cg3319		Hypothetisches Protein	
Cg3346	<i>leuS</i>	Leucyl-tRNA-Synthetase	
Cg3351	<i>nagI</i>	Gentisat-1,2-Dioxygenase	
Cg3389	<i>oxiC</i>	<i>myo</i> -Inositoldehydrogenase	
Cg3398		DNA oder RNA Helicase der Superfamilie II	
Cg3422	<i>trxB</i>	Thioredoxinreductase	x

Tabelle A9. Pupylierte Proteine in *C. glutamicum* (Cg, diese Arbeit), *M. tuberculosis* (Mtb, Festa et al., 2010), *M. smegmatis* (Msm, Watrous et al., 2010), and *R. erythropolis* (Rer, Yun et al., 2012). Homologe Proteine aller bestätigten, pupylierten Proteine, die bisher in diesen Organismen identifiziert wurden, wurden durch BLASTp-Suchen gefunden. Jedes Protein ist durch seinen jeweiligen Gennamen, die Annotation und den jeweiligen Genlocus repräsentiert. Die Annotation wurde vom jeweiligen pupylierten Protein übernommen. Genloci in fett zeigen an, ob ein Homolog des jeweiligen Organismus pupyliert ist, Genloci in kursiv sind putative Pupylierungsziele in *C. glutamicum*. Sternchen zeigen Proteine, die laut BLASTp-Suchen die höchste Ähnlichkeit mit dem pupylierten Protein hatten, aber eine andere Annotation.

Gen-name	Annotation	Cg Locus	Mtb Locus	Msm Locus	Rer Locus
-	<i>N</i> -Carbamoyl-L-Aminosäure-Amidohydrolase	-	-	MSMEG_3995	-
<i>sseC2</i>	Konserviertes Protein	-	Rv0814c	MSMEG_5790	RER_48110
<i>desA2</i>	Putative Acyl-[Acyl-Carrierprotein]-Desaturase	-	Rv1094	MSMEG_5248	RER_47900
<i>hspX</i>	Hitzeschockprotein	-	Rv2031c	MSMEG_3932	RER_12450
-	Hypothetisches Protein	-	Rv2074	MSMEG_3880	RER_31620
-	Konserviertes Protein	-	Rv2449c	MSMEG_4632	RER_32160
-	Hypothetisches Protein	-	Rv2468c	MSMEG_4692	RER_38230
-	Putative Amidotransferase	-	Rv2859c	MSMEG_2596	-
<i>nuoE</i>	NADH-Dehydrogenase, UE E	-	Rv3149	MSMEG_2059	RER_27230
-	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	-	Rv3249c	MSMEG_1842	RER_21650
-	Rieske-2Fe-2S-Familie-Protein	-	Rv3818	MSMEG_6410	RER_57010
-	Hypothetisches Protein	-	Rv3863*	MSMEG_6518	-
<i>ectB</i>	Putative Diaminobutyrat-2-Oxoglutarat-Transaminase	-	-	MSMEG_3900	RER_37860
<i>mmsB</i>	3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase	-	Rv0751c	MSMEG_1496	RER_39520
<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase, UE B-artiges Protein	Cg0007	Rv0005	MSMEG_0457	RER_00090
<i>ppiA</i>	Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase B	Cg0048	Rv0009	MSMEG_0024	RER_00170
<i>panB</i>	3-Methyl-2-Oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase	Cg0149	Rv2225	MSMEG_4298	RER_36510

Gen-name	Annotation	Cg Locus	Mtb Locus	Msm Locus	Rer Locus
-	Glyoxalase-Familie-Protein	Cg0185*	-	MSMEG_6630	RER_17350
<i>pepO</i>	Endopeptidase O	Cg0193	Rv0198c	MSMEG_0234	RER_49630
<i>cspA</i>	Putatives Kälteschockprotein A	Cg0215	Rv3648c	MSMEG_6159	RER_05110
<i>aspT</i>	Aspartat-Aminotransferase	Cg0294	Rv3722c	MSMEG_6286	RER_03620
<i>kata</i>	Katalase	Cg0310	-	MSMEG_3486	RER_04460
<i>fabG4</i>	3-Ketoacyl-Acyl-Carrierprotein-Reductase	Cg0344	Rv0242c	MSMEG_0372	RER_11200
-	Putative Short-Chain-Typ-Dehydrogenase/-Reductase	Cg0344*	Rv0148	MSMEG_0096	RER_49800*
<i>glxR</i>	cAMP-abhängiger Transkriptionsregulator	Cg0350	Rv3676	MSMEG_6189	RER_04800
-	Putatives Phagen-assoziiertes Protein	Cg0378	-	-	-
<i>adhC</i>	Putative NADP-abhängige Alkoholdehydrogenase	Cg0400	Rv3045	MSMEG_1037 ; MSMEG_2317	RER_15770
<i>rmIB1</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	Cg0403	Rv3464	MSMEG_1512	RER_02500
-	Putatives Bacteriocin	Cg0438*	Rv0798c	MSMEG_5830	RER_59900
<i>lpd</i>	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	Cg0441	Rv0462	MSMEG_0903	RER_15390
<i>lpd</i>	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	Cg0441	Rv0462	MSMEG_0903	RER_59830
-	Hypothetisches Protein	Cg0475	-	-	-
<i>gpmA</i>	Phosphoglyceratmutase	Cg0482	Rv0489	MSMEG_0935	RER_16200
<i>hemA</i>	Glutamyl-tRNA-Reductase	Cg0497	Rv0509	MSMEG_0952	RER_16410
<i>rpIK</i>	50S ribosomales Protein L11	Cg0563	Rv0640	MSMEG_1346	RER_17170
<i>gabT</i>	4-Aminobutyrat-Aminotransferase	Cg0566	Rv2589	MSMEG_2959	RER_05820
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	Cg0583	Rv0684	MSMEG_1395	RER_17630
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu	Cg0587	Rv0685	MSMEG_1401	RER_17640
<i>rpIC</i>	50S ribosomales Protein L3	Cg0594	Rv0701	MSMEG_1436	RER_18520
<i>rpsQ</i>	30S ribosomales Protein S17	Cg0604	Rv0710	MSMEG_1445	RER_18610
<i>adk</i>	Adenylatkinase	Cg0648	Rv0733	MSMEG_1484	RER_18740
-	Putative Fettsäure-Synthase	Cg0663	Rv3720	MSMEG_6284	RER_03830
<i>groES</i>	Chaperonin, 10 kDa UE	Cg0690	Rv3418c	MSMEG_1582	RER_19230
<i>guaB3</i>	Inosine 5-Monophosphat-Dehydrogenase	Cg0700	Rv3410c	MSMEG_1603	RER_19340
<i>accA1</i>	Putative Acetyl-/Propionyl-Coenzyme-A-Carboxylase, α -Kette	Cg0802	Rv2501c	MSMEG_4716	RER_18310
<i>sseA</i>	Putative Thiosulfat-Sulfurtransferase	Cg0803	Rv0815c	MSMEG_5789	RER_48100
-	Short-Chain-Dehydrogenase	Cg0825	Rv1856c	MSMEG_3619	RER_52930
<i>sahH</i>	S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase	Cg0860	Rv3248c	MSMEG_1843	RER_21660
<i>mtrA</i>	Response Regulator	Cg0862	Rv3246c	MSMEG_1874	RER_21680
<i>snzP</i>	Putatives Pyridoxin-Biosynthese-Protein	Cg0898	Rv2606c	MSMEG_2937	RER_29090
<i>serC</i>	Phosphoserin-Aminotransferase	Cg0948	Rv0884c	MSMEG_5684	RER_46170
<i>glTA2</i>	Putative Citratsynthase	Cg0949	Rv0896	MSMEG_5672	RER_46120
<i>fabD</i>	Malonyl-CoA-Acyl-Carrierprotein-Transacylase	Cg0957*	Rv2243	MSMEG_4325	RER_36720
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	Cg0973	Rv0946c	MSMEG_5541	RER_44350
<i>metS</i>	Methionyl-tRNA-Synthetase	Cg1017	Rv1007c	MSMEG_5441	RER_43670
-	Hypothetisches Protein	Cg1044	Rv1117	MSMEG_1532	RER_54950
<i>prsA</i>	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	Cg1075	Rv1017c	MSMEG_5427	RER_43110
<i>glmU</i>	Putative UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase	Cg1076	Rv1018c	MSMEG_5426	RER_43100
<i>eno</i>	Enolase	Cg1111	Rv1023	MSMEG_5415	RER_42830
<i>greA</i>	Transkriptionselongationsfaktor	Cg1123	Rv1080c	MSMEG_5263	RER_42610
<i>glyA</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase	Cg1133	Rv1093	MSMEG_5249	RER_42520
-	Hypothetisches Protein	Cg1136	-	-	RER_27940
<i>fum</i>	Fumarase	Cg1145	Rv1098c	MSMEG_5240	RER_42400
-	Konserviertes Protein	Cg1204	Rv0525	MSMEG_0970	RER_16670
<i>nadC</i>	Chinolinat-Phosphoribosyltransferase	Cg1215	Rv1596	MSMEG_3201	RER_34790
<i>arsC4</i>	Arsenatreductase	Cg1244	-	MSMEG_5428	RER_43750

Gen-name	Annotation	Cg Locus	Mtb Locus	Msm Locus	Rer Locus
	β -Fructosidase (Levanase/Invertase)	Cg1267	-	-	-
<i>glgA</i>	Glycogensynthase	Cg1268	Rv1212c	MSMEG_5080	RER_41610
<i>argS</i>	Arginyl-tRNA-Synthetase	Cg1333	Rv1292	MSMEG_4959	RER_39240
<i>atpA</i>	F ₁ F ₀ -ATP-Synthase, α chain	Cg1366	Rv1308	MSMEG_4938	RER_39070
	Glyoxalase-/Bleomycin-Resistenz-/Dioxygenase-Superfamilie Protein	Cg1373	Rv1322	MSMEG_4921	RER_38950
<i>etfB</i>	Elektronentransfer-Flavoprotein, β -UE	Cg1386	Rv3029c	MSMEG_2351	RER_23730
<i>gatB</i>	Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, UE B	Cg1420	Rv3009c	MSMEG_2367	RER_23900
<i>ilvB</i>	Acetolactat-Synthase, große UE	Cg1435	Rv3003c	MSMEG_2372	RER_23970
<i>ilvN</i>	Acetolactat-Synthase, kleine UE	Cg1436	Rv3002c	MSMEG_2373	RER_23980
<i>ilvC</i>	Hydroxysäure-Reductoisomerase	Cg1437	Rv3001c	MSMEG_2374	RER_23990
<i>leuD</i>	Isopropylmalat-Isomerase, kleine UE	Cg1488	Rv2987c	MSMEG_2388	RER_24090
<i>qor2</i>	Chinon-Oxidoreductase	Cg1553	-	-	RER_15420
<i>argD</i>	Acetylornithin-Aminotransferase	<i>Cg1583</i>	Rv1655	MSMEG_3773	RER_32810
<i>argG</i>	Argininosuccinat-Synthase	Cg1586	Rv1658	MSMEG_3770	RER_32780
<i>uspA2</i>	Universelles Stressprotein	Cg1595	Rv1636	MSMEG_3811	RER_33060
<i>gpt</i>	Purin-Phosphoribosyltransferase	Cg1659	-	-	-
<i>mpa</i>	Mycobacterial Proteasome ATPase	Cg1691	Rv2115c	MSMEG_3902	RER_31790
<i>acn</i>	Aconitase	Cg1737	Rv1475c	MSMEG_3143	RER_30680
<i>tal</i>	Transaldolase	Cg1776	Rv1448c	MSMEG_3102	RER_30440
<i>zwf</i>	Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase	Cg1778	Rv1447c; Rv1121	MSMEG_0314	RER_30430
<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase	Cg1790	Rv1437	MSMEG_3085	RER_30300
<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Cg1791	Rv1436	MSMEG_3084	RER_30290
<i>metK</i>	Putative S-Adenosylmethionin-Synthetase	<i>Cg1806</i>	Rv1392	MSMEG_3055	RER_30110
<i>ihf</i>	Integration Hostfaktor	Cg1811	-	MSMEG_3050	RER_30070
-	Hypothetisches Protein	Cg2079	Rv2676c	MSMEG_2782	RER_28490
<i>dxs</i>	1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase	Cg2083	Rv2682c	MSMEG_2776	RER_28360
<i>dtxR</i>	Diphtherietoxin-Repressor	Cg2103	Rv2711	MSMEG_2750	RER_28010
<i>pfkB</i>	6-Phosphofruktokinase	Cg2119	Rv2029c	MSMEG_3947	RER_33980
<i>recA</i>	Recombinase A	Cg2141	Rv2737c	MSMEG_2723	RER_27530
-	Putative Ribonuclease J	Cg2160	Rv2752c	MSMEG_2685	RER_27330
<i>proS</i>	Prolyl-tRNA-Synthetase	Cg2185	Rv2845c	MSMEG_2621	RER_26150
<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts	Cg2221	Rv2889c	MSMEG_2520	RER_25430
	Putatives Zellteilungsprotein	Cg2275	Rv2927c	MSMEG_2416	RER_24280
<i>gdh</i>	Glutamat-Dehydrogenase	Cg2280	-	MSMEG_5442	RER_38460
<i>hisC</i>	Histidinolphosphat-Aminotransferase	Cg2304	Rv1600	MSMEG_3206	RER_34510
<i>hisD</i>	Histidinol-Dehydrogenase	Cg2305	Rv1599	MSMEG_3205	RER_34520
-	Carveol-Dehydrogenase	Cg2342*	Rv0687; Rv2750	MSMEG_6031	RER_04360
<i>ilvE</i>	Verzweigt ketthige-Aminosäuren-Aminotransferase	Cg2418	Rv2210c	MSMEG_4276	RER_36130
<i>glnA1</i>	Glutamin-Synthetase, Typ I	Cg2429	Rv2220	MSMEG_4290	RER_36230
<i>thrC</i>	Threonin-Synthase	Cg2437; Cg2334*	Rv1295	MSMEG_4956	RER_39210
<i>glnA2</i>	Glutamin-Synthetase	Cg2447	Rv2222c	MSMEG_4294	RER_36490
	Putative Exoribonuclease	Cg2453	-	-	RER_36540
<i>aceE</i>	Pyruvatdehydrogenase, E1 Komponente	Cg2466	Rv2241	MSMEG_4323	RER_36700
<i>acpP</i>	Acyl-Carrierprotein	Cg2473	Rv2244	MSMEG_4326	RER_36730
<i>dcp</i>	Putative Peptidyl-Dipeptidase A	Cg2527	-	-	-
-	Putative Dehydrogenase	Cg2543*	Rv2280	MSMEG_5037*	RER_00220*
<i>icl</i>	Isocitratlyase	Cg2560	Rv0467	MSMEG_0911	RER_15740
<i>pgpP</i>	Glucosyl-3-Phosphoglycerat-Phosphatase	Cg2581	Rv2419c	MSMEG_4579	RER_37740

Gen-name	Annotation	Cg Locus	Mtb Locus	Msm Locus	Rer Locus
<i>dkgA</i>	2,5-Diketo-D-Gluconsäure-Reductase A	Cg2591	Rv2971	MSMEG_2408	RER_45570
<i>rpIU</i>	50S ribosomales Protein L21	Cg2595	Rv2442c	MSMEG_4625	RER_37940
<i>valS</i>	Valyl-tRNA-Synthetase	Cg2609	Rv2448c	MSMEG_4630	RER_38000
<i>pcaI</i>	3-Oxoacilpat-Succinyl-CoA-Transferase UE	Cg2623	Rv2504c	MSMEG_1898	RER_12090
<i>pcaF</i>	3-Oxoacilpyl-CoA-Thiolase	Cg2625	Rv1323	MSMEG_4920	RER_12070
<i>fadA</i>	Putative Acyl-CoA-Thiolase	Cg2625*	Rv0859	MSMEG_5721	RER_03800
-	Putativer Macroilid-ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein	Cg2695	Rv2477c	MSMEG_4700	RER_38330
<i>bcp</i>	Putatives Bacterioferritin-Comigratory Protein	Cg2736	Rv2521	MSMEG_4753	RER_38690
<i>ahpC</i>	Alkylhydroperoxid-Reductase	Cg2736*	Rv2428	MSMEG_4891	RER_27870
<i>ftn</i>	Ferritin	Cg2782	Rv3841	MSMEG_6422	RER_01810 RER_01740
<i>nrdE</i>	Ribonucleosid-Diphosphat-Reductase, α UE	Cg2786	Rv3051c	MSMEG_2299	RER_23520
-	Putatives Glutamin-ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein	Cg2812	Rv0073	MSMEG_2524	RER_40890
<i>murA</i>	Putative UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase	Cg2829	Rv1315	MSMEG_4932	RER_39010
<i>cysK</i>	O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase	Cg2833	Rv1077	MSMEG_5270	RER_10910
<i>actA</i>	Acetyl-CoA:CoA-Transferase (Acetat, Propionat, Succinat)	Cg2840	-	MSMEG_6310	RER_55980
<i>ptsS</i>	Saccharose-spezifisches Enzym II von PTS	Cg2925*	-	MSMEG_2117	RER_39630
<i>canB</i>	Carboanhydrase	Cg2954	Rv3588c	MSMEG_6082	RER_06800
<i>butA</i>	Butandiol-Dehydrogenase	Cg2958	Rv2002	MSMEG_5020	RER_06590
<i>ppa</i>	Anorganische Pyrophosphatase	Cg2988	Rv3628	MSMEG_6114	RER_06170
<i>groEL</i>	60 kDa Chaperonin	Cg3011	Rv0440	MSMEG_0880	RER_15260
<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	Cg3047	Rv0409	MSMEG_0784	RER_14730
<i>purA</i>	Adenylosuccinat-Synthetase	Cg3063	Rv0357c	MSMEG_0759	RER_14280
<i>fda</i>	Fructose-Bisphosphat-Aldolase	Cg3068	Rv0363c	MSMEG_0752	RER_14120
<i>cysI</i>	Sulfit-Reductase (Hämoprotein)	Cg3118	Rv2391	MSMEG_4527	RER_37460
<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	Cg3169	Rv0211	MSMEG_0255	RER_10900
<i>kasB</i>	3-Oxoacyl-[Acyl-Carrierprotein]-Synthase 2	Cg3178*	Rv2246	MSMEG_4328	RER_36740
<i>pks16</i>	Putative Polyketidsynthase	Cg3179*	Rv1013	MSMEG_5435	RER_43270
<i>fadD21</i>	Putative Fettsäure-AMP-Ligase	Cg3179*	Rv1185c	MSMEG_0411; MSMEG_4731	RER_02200
<i>serS</i>	Seryl-tRNA-Synthetase	Cg3201	Rv3834c	MSMEG_6413	RER_01960
<i>ldhA</i>	NAD-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase	Cg3219	-	-	RER_42180
<i>sodA</i>	Superoxid-Dismutase	Cg3237	Rv3846	MSMEG_6427	RER_48670
<i>uspA3</i>	Universelles Stressprotein	Cg3255	Rv2026c; Rv1996	MSMEG_3950 ; MSMEG_3940; MSMEG_3945	RER_44670; RER_34280
-	Universelles Stressprotein	Cg3255*	Rv2624c	MSMEG_3939	RER_37520
<i>rpsF</i>	30S ribosomales Protein S6	Cg3308	Rv0053	MSMEG_6897	RER_58310
<i>ino1</i>	myo-Inositol-1-phosphat-Synthase	Cg3323	Rv0046c	MSMEG_6904	RER_58450
<i>dps</i>	Mangelinduziertes DNA-Schutzprotein	Cg3327	-	MSMEG_6467 MSMEG_3242	RER_12800
<i>trpE</i>	Anthranilat-Synthase, Komponente I	Cg3359	Rv1609	MSMEG_3217	RER_33560
<i>thiD2</i>	Phosphomethylpyrimidin-Kinase	Cg3409	Rv0422c	MSMEG_0464	RER_32350
<i>trxB</i>	Thioredoxin-Reductase	Cg3422	Rv3913	MSMEG_6933	RER_60200

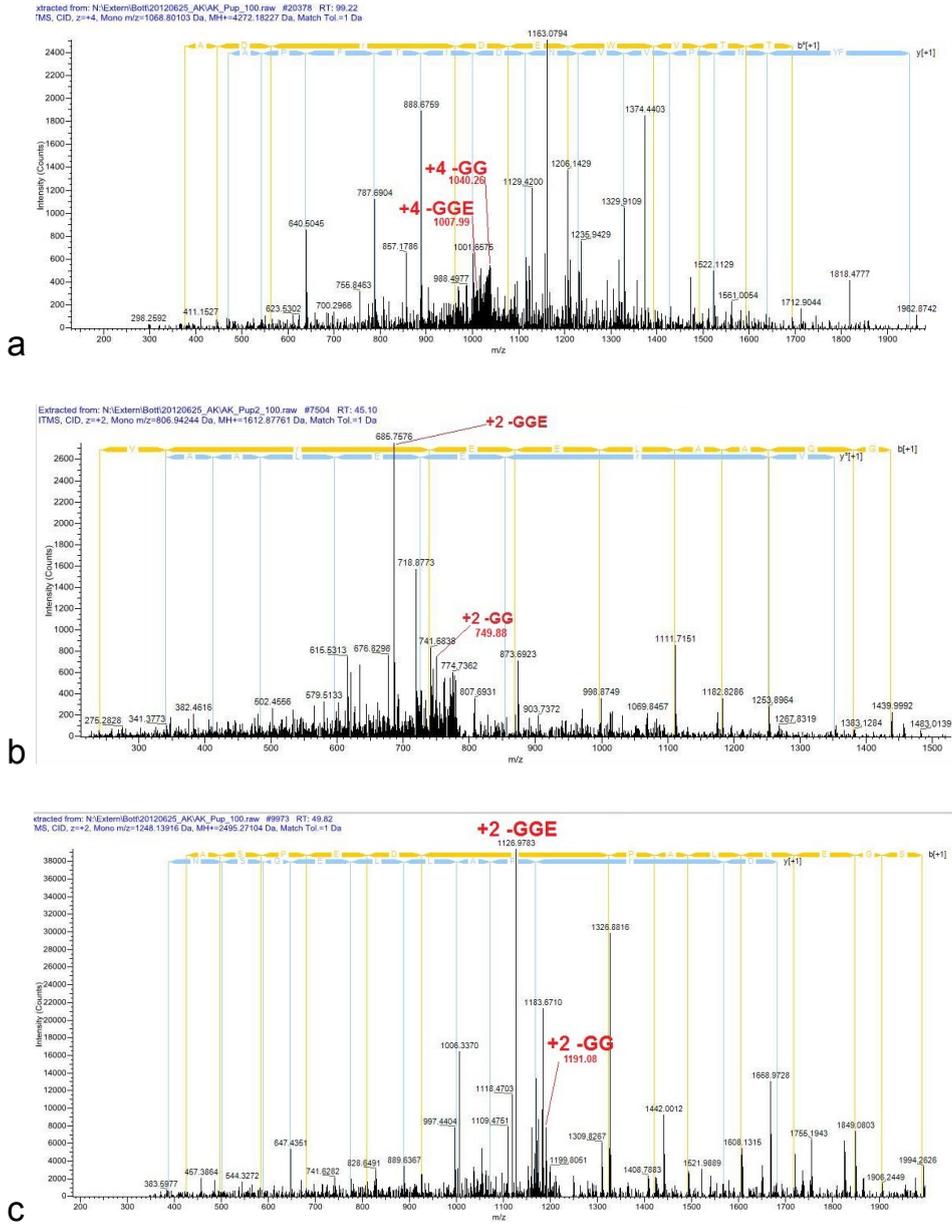


Abbildung A2. MS/MS-Spektren aus der multidimensionalen Proteinidentifizierungstechnik (MudPIT) von pupylierten Peptiden der Proteine (a) PepO (Cg0193), (b) ValS (Cg2609) und (c) SerS (Cg3201). Gezeigt sind die charakteristischen Massen, die bei der Fragmentierung der Pup-Seitenkette entstehen (-GG, -GGE). +4, +2 = Ladung der jeweiligen Peptide.

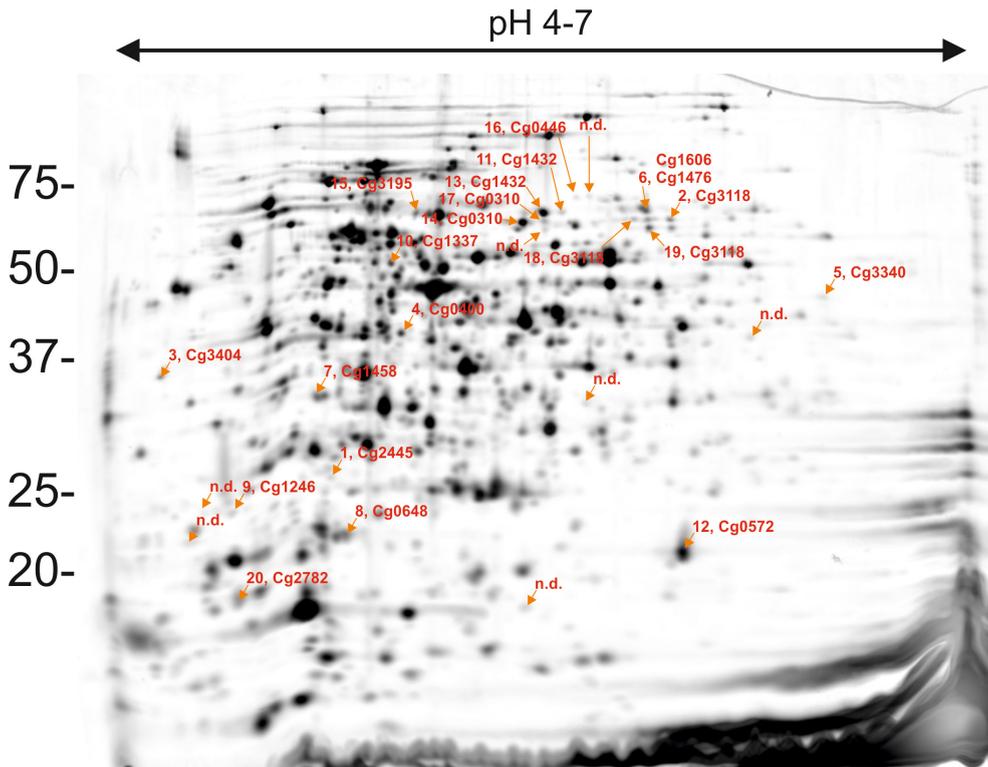


Abbildung A3. Zusammengeführte 2D-DIGE-Gelbilder aus jeweils drei biologischen Replikaten von *C. glutamicum* ATCC 13032 und Δ pup-Mutante kultiviert in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose unter Eisenmangel ($1 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat). Es wurden DALTsix NF 12.5%ige Gele benutzt, die isoelektrische Fokussierung wurde im pH-Bereich von 4-7 durchgeführt. Links sind die Größen des Proteinstandards in kDa angegeben. n.d., nicht bestimmt. 1 Häm-Oxygenase (Cg2445; 24,2 kDa), 2 Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein (Cg3118; 63,3 kDa), 3 Putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), Substratbindendes Lipoprotein (Cg3404; 36,7 kDa), 4 Oxalacetat-Decarboxylase (Cg1458; 29,1 kDa), 5 Putative D-Aminosäure-Dehydrogenase (Cg3340; 44,7 kDa), 6a Thiamin-Biosyntheseprotein (Cg1476; 65,2 kDa), 6b CTP-Synthetase (Cg1606; 61,0 kDa), 7 Alkohol-Dehydrogenase, Klasse C (Cg0400; 37,8 kDa), 8 Adenylat-Kinase (Cg0648; 19,4 kDa), 9 Putatives Membranprotein (Cg1246; 20,2 kDa), 10 Homoserin-Dehydrogenase (Cg1337; 46,5 kDa), 11 Dihydroxysäure-Dehydratase (Cg1432; 65,2 kDa), 12 50S ribosomales Protein L10 (Cg0572; 17,9 kDa), 13 Dihydroxysäure-Dehydratase (Cg1432; 65,2 kDa), 14 Katalase (Cg0310; 58,7 kDa), 15 Putative flavinenthaltende Monooxygenase (Cg3195; 67,0 kDa), 16 Succinat:Menachinon-Oxidoreductase, Flavoprotein Untereinheit (Cg0446; 75,1 kDa), 17 Katalase (Cg0310; 58,7 kDa), 18 Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein (Cg3118; 63,3 kDa), 19 Ferredoxin-Sulfitreductase, Hämoprotein (Cg3118; 63,3 kDa), 20 Ferritin (Cg2782; 18,1 kDa)

6.3 Zusätzliche SDS-Gele und Western-Blots

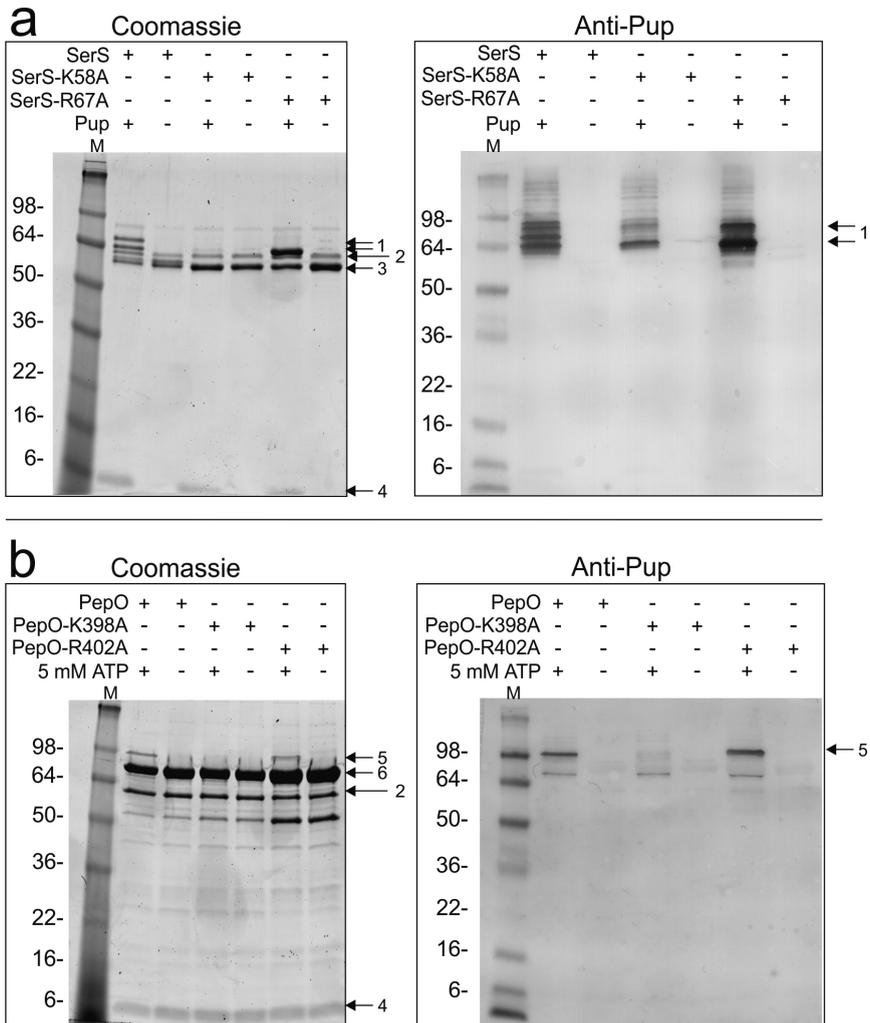


Abbildung A4. SDS-Polyacrylamid-Gele (jeweils links) und Western-Blot-Analysen (jeweils rechts) der *in-vitro*-Pupylierungsexperimente von SerS-7xHis, SerS-K58A-7xHis und SerS-R67A-7xHis (a; 47,4 kDa) bzw. PepO-7xHis, PepO-K398A-7xHis, PepO-R402A-7xHis (b; 72,3 kDa). Links sind die Größen des Protein-Standards (M) in kDa angegeben. Die Proteine wurden mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie über die C-terminalen Heptahistidin-Tags aus *C. glutamicum* $\Delta pup \Delta dop \Delta arc$ gereinigt und *in vitro* pupyliert (siehe Kapitel 2.8.7). Die Proben enthielten alle 2 μ M Substrat, 0,5 μ M der Pup-Ligase PafA-6xHis und 10 μ M prokaryotisches ubiquitin-ähnliches Protein, Pup. Die Umsetzung erfolgte in Puffer R_a mit 5 mM ATP für 17 h bei Raumtemperatur. Für Negativkontrollen wurde auf die Zugabe von Pup (a) bzw. ATP (b) verzichtet. PafA-6xHis und Pup wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mittels Polyhistidin-Tags über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Der Tag von Pup wurde mittels TEV-Protease abgespalten. Für die Western-Blots (rechts) wurde ein Anti-Pup-Antikörper (1:2.000) verwendet. Die markierten Banden wurden mittels MALDI-TOF/(TOF) identifiziert als: 1, SerS-K58-Pup; 2, PafA; 3, SerS/-K58A/-R67A; 4, Pup; 5, PepO; 6, PepO (Tabelle A3).

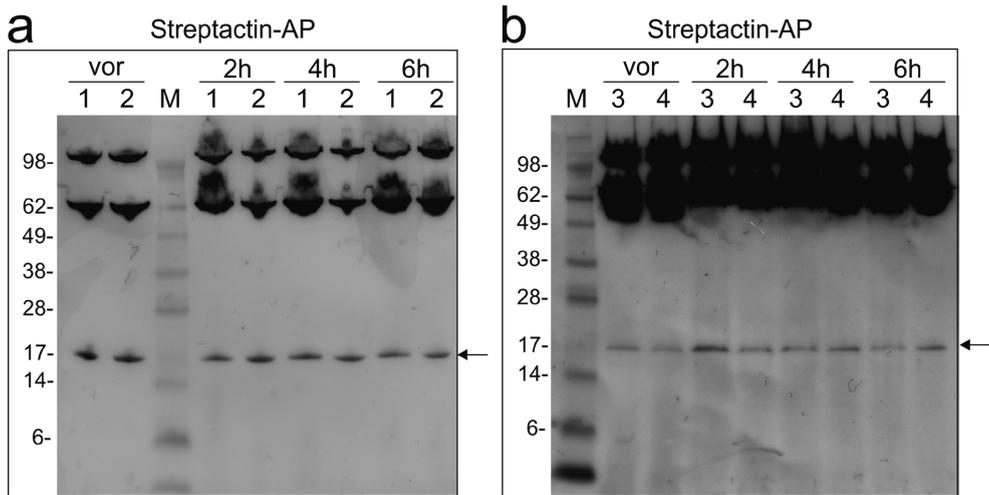


Abbildung A5. Western-Blot-Analysen mit Rohextrakten von (a) *C. glutamicum* Δ ftn pVWEx1-ftn-Strep (1), Δ pup Δ ftn pVWEx1-ftn-Strep (2) bzw. (b) *C. glutamicum* ftm-Strep (3), Δ pup ftm-Strep (4). Es wurden gleiche Mengen an Protein aufgetragen (10 μ l des Rohextrakts mit der niedrigsten Proteinkonzentration laut Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmung). Die Detektion erfolgte mittels Streptactin-Alkalische Phosphatase (1:3.500). Die Stämme wurden unter Eisenlimitierung (CGXII-Minimalmedium (4% (w/v) Glucose) mit Zugabe von 1 statt 36 μ M Eisen(II)) kultiviert, die Induktion der Genexpression in (a) erfolgte mit 1 mM IPTG am Start der Vor- und Hauptkultur. Vor: Probe am Ende der Vorkultur (ebenfalls Eisenmangel), 2h, 4h, 6h: Proben 2, 4 oder 6 h nach Start der Hauptkultur. Der Pfeil zeigt die mutmaßliche Ftn-Strep-Bande (18,3 kDa).

6.4 Microarrayergebnisse

Tabelle A10. Ergebnisse der DNA-Microarray-Analysen zur Bestimmung der relativen mRNA-Spiegel aus *C. glutamicum* Δ pup gegenüber dem ATCC 13032 WT unter Eisenlimitierung (1 μ M Eisen(II)-sulfat). Es sind der Genlocus, -name sowie die Annotation der signifikant (Ratio größer 2-fach, *p*-Wert kleiner 0,1) veränderten mRNA-Spiegel aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten gezeigt.

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Ratio (n=3)	<i>p</i> -Wert
cg0160		Hypothetisches Protein	15,60	0,003
cg0470	<i>htaB</i>	Sekretiertes Protein, assoziiert mit Häm-Transport	15,19	0,002
cg3156	<i>htaD</i>	Sekretiertes Protein, assoziiert mit Häm-Transport	10,37	0,001
cg0471	<i>htaC</i>	Sekretiertes Protein, assoziiert mit Häm-Transport	10,17	0,004
cg1476	<i>thiC</i>	Thiamin-Biosynthese Protein	10,08	0,006
cg0590		Putativer Siderophor-ABC-Transporter, Permease Protein	8,02	0,002
cg1229	<i>ykoC</i>	Thiamin-regulierter ECF-Transporter für Hydroxymethylpyrimidin, Transmembrankomponente	7,38	0,008
cg1120	<i>ripA</i>	Transkriptionsregulator der Eisenproteine und Repressor der Aconitase, AraC Familie	6,91	0,010
cg1930		Putative, sekretierte Hydrolase, CGP3 Region	6,88	0,000
cg1227	<i>ykoE</i>	Thiamin-regulierter ECF-Transporter für Hydroxymethylpyrimidin, Substrat-spezifische Komponente	6,87	0,006
cg0769		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Permease UE	6,49	0,003
cg0922		Putatives, sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	5,81	0,001
cg0771	<i>irp1</i>	Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	5,50	0,001
cg2183	<i>oppC</i>	Peptid-Transport-System (ABC-Typ), Permease Komponente	5,35	0,000

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Ratio (n=3)	p-Wert
cg0465		Putatives Membranprotein, konserviert	5,27	0,025
cg0924		Putativer ABC-Typ Eisen-Siderophor-Transporter, Substrat-bindendes Lipoprotein	5,23	0,004
cg1931		Putatives, sekretiertes Protein, CGP3 Region	5,17	0,005
cg1583	<i>argD</i>	Acetylmithine-Aminotransferase	5,09	0,002
cg0467	<i>hmuT</i>	Hemin-bindend, periplasmatischer Protein-Precursor	5,08	0,004
cg0589		Putativer Siderophor-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	4,96	0,006
cg0466	<i>htaA</i>	Sekretiertes Protein, assoziiert mit dem Häm-Transport	4,74	0,008
cg3372		Hypothetisches Protein	4,52	0,009
cg0591		Putativer Siderophor-ABC-Transporter, Permease Protein	4,17	0,003
cg0768		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	4,06	0,033
cg1582	<i>argB</i>	Acetylglutamat-Kinase	3,79	0,001
cg3404		Putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), Substrat-bindendes Lipoprotein	3,77	0,015
cg2239	<i>thiG</i>	Thiazol-Synthase, involviert in die Thiamin-Biosynthese	3,63	0,013
cg1419		Putativer Na ⁺ -abhängiger Transporter, BASS Familie	3,57	0,018
cg0926		Putativer Eisen-Siderophor-Transporter, Permease UE	3,55	0,000
cg0927		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Permease UE	3,46	0,012
cg1581	<i>argJ</i>	Monofunktionale NAGS <i>N</i> -Scetyl-Glutamat-Synthase	3,43	0,000
cg2240	<i>thiF</i>	Molybdopterin-Biosynthese-Protein MoeB, involviert in Thiamin-Biosynthese	3,33	0,000
cg2234		Putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), Substrat-bindendes Lipoprotein	3,31	0,000
cg1584	<i>argF</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	3,29	0,002
cg1475		Hypothetisches Protein	3,25	0,028
cg2238	<i>thiS</i>	Schwefel-Transferprotein, involviert in Thiamin-Biosynthese	3,16	0,030
cg0177		Hypothetisches Protein	3,14	0,006
cg0405		Putativer Eisen(III)-Dicitrat-Transporter (ABC-Typ), sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	3,01	0,007
cg2676		Putatives ABC-Typ-Dipeptid/Oligopeptid/Nickel-Transportsystem, Permease Komponente	2,96	0,040
cg1585	<i>argR</i>	Transkriptionsrepressor der Arginin-Biosynthese, ArgR-Familie	2,88	0,010
cg2184	<i>oppD</i>	Peptid-Transport-System (ABC-Typ), ATPase Komponente	2,86	0,011
cg2237	<i>thiO</i>	Putatives D-Aminosäureoxidase-Flavoprotein, Oxidoreduktase	2,86	0,003
cg0468	<i>hmuU</i>	Hemin-Transportsystem, Permease Protein	2,85	0,002
cg2283		Hypothetisches Protein	2,82	0,005
cg3267		Putatives Membranprotein, putatives Pseudogen, C-terminales Fragment	2,68	0,013
cg1626		Hypothetisches Protein	2,67	0,019
cg0770		Putativer Eisen-Siderophor-ABC-Transporter, Permease UE	2,67	0,017
cg2677		Putatives ABC-Typ-Dipeptid/Oligopeptid/Nickel-Transportsystem, Permease Komponente	2,58	0,018
cg3374	<i>cye1</i>	Putative NADH-abhängige Flavin-Oxidoreduktase	2,53	0,031
cg1291		Putatives Membranprotein	2,47	0,003
cg1654	<i>thiD1</i>	Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase	2,47	0,010
cg3266	<i>tnp5c</i>	Transposase	2,46	0,011
cg1580	<i>argC</i>	<i>N</i> -Acetyl- γ -Glutamylphosphat-Reduktase	2,45	0,030
cg1129	<i>aroF</i>	3-Desoxy-7-Phosphoheptulonat-Synthase	2,38	0,023
cg1228	<i>ykoD</i>	Thiamin-regulierter ECF-Transporter für Hydroxymethylpyrimidin, duplizierte ATPase-Komponente	2,37	0,075
cg3373	<i>cyeR</i>	Redox-sensender Transkriptionsregulator, ArsR Familie	2,28	0,015

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Ratio (n=3)	p-Wert
cg2675		Putative ATPase-Komponente eines ABC-Typ-Transportsystems, enthält duplizierte ATPase-Domänen	2,28	0,004
cg0159		Hypothetisches Protein	2,28	0,044
cg0921		Putatives cytoplasmatisches Siderophor-interagierendes Protein	2,26	0,018
cg0737		Putativer, hochaffiner ABC-Typ-Methionintransporter, Substrat-bindendes Lipoprotein	2,25	0,006
cg1701	<i>metH</i>	Homocystein-Methyltransferase, Methionin-Synthase	2,25	0,016
cg0767		Putatives cytoplasmatisches Siderophor-interagierendes Protein	2,23	0,023
cg0755	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase	2,22	0,013
cg2252		Hypothetisches Protein	2,20	0,004
cg2445	<i>hmuO</i>	Häm-Oxygenase	2,16	0,004
cg1418		Putatives, sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	2,16	0,008
cg0012	<i>ssuR</i>	Transkriptionsregulator des Sulphonat-Schwefel-Stoffwechsels	2,15	0,050
cg0812	<i>dtsR1</i>	Acetyl-/Propionyl-CoA Carboxylase, β -UE	2,15	0,090
cg2236	<i>thiE</i>	Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase	2,14	0,008
cg0018		Putatives, konserviertes Membranprotein	2,08	0,040
cg0701		Putativer Arznei-/Metabolit-Transporter, DMT Superfamilie	2,08	0,031
cg1230		Hypothetisches Protein	2,02	0,096
cg1655	<i>thiM</i>	Hydroxyethylthiazol-Kinase	2,02	0,046
cg1514		Putatives, sekretiertes Protein, CGP1 Region	2,00	0,024
cg2438		Hypothetisches Protein	0,50	0,012
cg0543		Hypothetisches Protein	0,50	0,014
cg1694	<i>recB</i>	Exonuclease, RecB Familie	0,49	0,000
cg1736		Putatives Membranprotein	0,49	0,046
cg1345	<i>narK</i>	Nitrat-/Nitrit-Antiporter	0,48	0,055
cg3431	<i>mpA</i>	Ribonuclease P	0,48	0,039
cg2348		Putatives, sekretiertes Protein	0,48	0,031
cg1724	<i>meaB</i>	Akzessorisches Protein der Methylmalonyl-CoA-Mutase	0,46	0,047
cg1725	<i>mutA</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase, α -UE	0,46	0,033
cg2556		Putatives Eisen-reguliertes Membranprotein	0,45	0,006
cg0961		Putative Homoserin-O-Acetyltransferase	0,45	0,017
cg3216	<i>gntP</i>	Gluconatpermease, Gluconat:H ⁺ Symporter, GntP Familie	0,45	0,002
cg2837	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase, β -UE	0,43	0,004
cg2782	<i>ftn</i>	Ferritin	0,43	0,069
cg1487	<i>leuC</i>	Isopropylmalat-Isomerase, große UE	0,43	0,033
cg1435	<i>ilvB</i>	Acetolactat-Synthase I, große UE	0,42	0,080
cg1300	<i>cydB</i>	Cytochrom <i>bd</i> -Oxidase, UE II	0,42	0,006
cg0506		Putativer Spermidin-/Putrescin-/Eisen(III)-Transporter, ATPase UE	0,42	0,008
cg1432	<i>ilvD</i>	Dihydroxysäure-Dehydratase	0,41	0,070
cg1436	<i>ilvN</i>	Acetolactat-Synthase, kleine UE	0,41	0,039
cg3047	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	0,40	0,066
cg1695		Putatives Plasmid-Maintenance-System Antidotprotein	0,40	0,008
cg0508		Putativer Spermidin-/Putrescin-/Eisen(III)-Transporter, Substrat-bindendes Lipoprotein	0,39	0,003
cg0447	<i>sdhB</i>	Succinat:Menachinon-Oxidoreductase, Eisen-Schwefel-Protein UE	0,39	0,015
cg1343	<i>narH</i>	Nitrat-Reductase, β -UE, Eisen-Schwefel-Protein	0,39	0,009
cg0507		Putativer Spermidin-/Putrescin-/Eisen(III)-Transporter, Permease-UE	0,39	0,022

Gen-locus	Gen-name	Annotation	Ratio (n=3)	p-Wert
cg1169	<i>metP</i>	Na ⁺ :Methionin-Symporter, SNF-Familie	0,39	0,000
cg0445	<i>sdhC</i>	Succinat:Menachinon-Oxidoreductase, Cytochrom <i>b</i> -UE	0,39	0,013
cg2182	<i>oppB</i>	Peptid-Transport-System (ABC-Typ), Permease Komponente	0,38	0,005
cg2610		Putatives ABC-Typ-Dipeptid/Oligopeptid/Nickel-Transportsystem, sekretierte Komponente	0,37	0,039
cg1344	<i>narG</i>	Nitrat-Reductase, α -UE	0,37	0,030
cg2636	<i>catA1</i>	Catechol-1,2-Dioxygenase	0,35	0,076
cg3048	<i>pta</i>	Phosphotransacetylase, Phosphat-Acetyltransferase	0,34	0,054
cg1341	<i>narI</i>	Nitrat-Reductase, γ -subunit, Cytochrom <i>b</i>	0,33	0,004
cg0759	<i>prpD2</i>	2-Methylcitrat-Dehydratase, involviert in Propionat-Katabolismus	0,33	0,004
cg1342	<i>narJ</i>	Nitrat-Reductase, δ -UE, Assemblierungsfaktor	0,32	0,009
cg3107	<i>adhA</i>	Zn-Abhängige Alkoholdehydrogenase	0,32	0,017
cg0446	<i>sdhA</i>	Succinat:Menachinon-Oxidoreductase, Flavoprotein UE	0,32	0,024
cg1299	<i>cydD</i>	ABC-Transporter, UE II, essentiell für Cytochrome <i>bd</i> -Oxidase-Assemblierung	0,31	0,002
cg0760	<i>prpB2</i>	2-Methylisocitrat-Lyase, involviert in Propionat-Katabolismus	0,30	0,032
cg2181	<i>oppA</i>	Peptid-Transport-System (ABC-Typ), sekretierte Komponente	0,30	0,021
cg0762	<i>prpC2</i>	2-Methylcitrat-Synthase involviert in Propionat-Katabolismus	0,28	0,003
cg1612		Putative Acetyltransferase	0,27	0,003
cg3195		Putative Flavin-enthaltende Monoxygenase FMO	0,24	0,014
cg1737	<i>acn</i>	Aconitase	0,16	0,019
cg0310	<i>katA</i>	Katalase	0,16	0,007

Danksagungen

Prof. Dr. Michael Bott möchte ich dafür danken, dass er mir die Chance gegeben hat, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten, er für Probleme stets ein offenes Ohr hatte und mit seinen Ratschlägen das Projekt bereichert hat. Außerdem danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Dr. Tino Polen bedanke ich mich für die Betreuung, Diskussionen und Inputs, die dem Thema Würze verliehen haben.

Abi danke ich für die hilfreiche und kritische Diskussion meiner Ergebnisse. Außerdem danke ich Julia F. und Tom für ihre ansteckende wissenschaftliche Neugier und Diskussion.

Desweiteren danke ich Sarah, Nadine R. und Stephie für ihre fleißige Arbeit im Labor, die einen wichtigen Beitrag zum Erfolg dieses Projekts geleistet haben. Ulli und Doris danke ich für ihre wunderbare Unterstützung im Labor, ob durch Experimente oder technischen Rat. Meike und Simon danke ich ebenso für technische Ratschläge.

Ebenso danke ich Nadine D., Jenni und Markus dafür, dass sie mich sofort in ihre Gruppe integriert haben und bereits kurz nach Beginn meiner Arbeit vergessen haben lassen, dass ich neu am Institut war. Außerdem danke ich Nicolai und Jan v. O. für spannende wie auch lustige Unterhaltungen, wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Natur. Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des IBT-1/IBG-1 danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Nadine D., Andi, und Micha bin ich dankbar dafür, dass sie nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch Freunde geworden sind. Micha danke ich speziell für die Laufrunden, die den Kopf wieder freigemacht haben, sowie dafür, dass er stets bei Problemen aller Art für mich da war.

Abi, Nils, Sabine, Olli, Laura, Arne, Daniel, Nadine, Laii, Sanel, Melle, Sebastian, Maggie, Yoon-Ha, Jule, Christoph, Max, Alex, Chris, Ellie und Tom danke ich für amüsante Stunden abseits der Arbeit.

Mimi, Manuel, Matze, Flo, Werner und ganz besonders Benny danke ich dafür, dass sie mich innerhalb von Sekunden vergessen lassen, dass ich gar nicht mehr in Graz wohne. Danke für eure langjährige Freundschaft und Treue!

Irene danke ich dafür, dass sie mein Leben komplett und alle Hochs und Tiefs während der Arbeit mit mir durchgemacht hat. Ich danke ihr besonders dafür, dass ich bei ihr auch einmal abschalten konnte.

Meinen Eltern und meinem Bruder sowie meiner ganzen Familie danke ich für ihre große Unterstützung und ihr Verständnis schon mein ganzes Leben. Speziell möchte ich meinen Eltern und Omas dafür danken, dass sie mich ein Leben lang unterstützt haben, auch finanziell, was ich nicht als selbstverständlich ansehe.

Schließlich möchte ich Univ-Prof. Dr. Gottfried Dohr dafür danken, dass er mich darin bestärkt hat, Mikrobiologie zu studieren, und meinem Biologie-Lehrer Prof. Dr. Willibald Gallé (†), dass er mir gezeigt hat, dass die Biologie die vielleicht spannendste Naturwissenschaft ist.

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegt.

Andreas Franz Küberl, M. Sc.

Band / Volume 60

Untersuchungen zur Membranintegrität während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

S. Fleckenstein (2013), VI, 160 pp
ISBN: 978-3-89336-841-9

Band / Volume 61

Characterization of Novel Amyloid- β Peptide (A β) Binding Ligands

S. Dornieden (2013), vii, 129 pp
ISBN: 978-3-89336-844-0

Band / Volume 62

Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

A. R. Chattopadhyay (2013), VIII, 195 pp
ISBN: 978-3-89336-845-7

Band / Volume 63

***Gluconobacter oxydans* strain development: Studies on central carbon metabolism and respiration**

J. Richhardt (2013), III, 181 pp
ISBN: 978-3-89336-851-8

Band / Volume 64

Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure

A. Otten (2013), 98 pp
ISBN: 978-3-89336-860-0

Band / Volume 65

Rapid Development of Small-Molecule producing Microorganisms based on Metabolite Sensors

S. Binder (2013), 138 pp
ISBN: 978-3-89336-872-3

Band / Volume 66

Increasing the NADPH supply for whole-cell biotransformation and development of a novel biosensor

S. Solvej (2013), 130 pp
ISBN: 978-3-89336-900-3

Band / Volume 67

Expression, purification and biophysical characterization of human Presenilin 2

G. Yang (2013), 159 pp
ISBN: 978-3-89336-928-7

Band / Volume 68

Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum* und Rolle des Flavohämoproteins Hmp

L. Plätzen (2013), IV, 119 pp

ISBN: 978-3-89336-931-7

Band / Volume 69

L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse

K. Hoffmann (2014),vi, 83 pp

ISBN: 978-3-89336-939-3

Band / Volume 70

Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the adipate precursor 2-oxoadipate

M. Spelberg (2014), 118 pp

ISBN: 978-3-89336-954-6

Band / Volume 71

Design and application of metabolite sensors for the FACS-based isolation of feedback-resistant enzyme variants

G. Schendzielorz (2014), 129 pp

ISBN: 978-3-89336-955-3

Band / Volume 72

The development and application of a single cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids

N. Mustafi (2014), 137 pp

ISBN: 978-3-89336-956-0

Band / Volume 73

Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of L-leucine and 2-ketoisocaproate

M. Vogt (2014), VI, 92 pp

ISBN: 978-3-89336-968-3

Band / Volume 74

Pupylisierung in *Corynebacterium glutamicum*

A. Küberl (2014), VI, 163 pp

ISBN: 978-3-89336-969-0

Weitere **Schriften des Verlags im Forschungszentrum Jülich** unter
<http://www.zb1.fz-juelich.de/verlagextern1/index.asp>

