
I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	2
III	Material und Methoden	10
1.	Chemikalien und Enzyme	10
2.	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	10
2.1	Bakterienstämme.....	10
2.2	Plasmide.....	11
2.3	Oligonukleotide.....	13
3.	Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	18
3.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	18
3.2	Stammhaltung	19
3.3	Bestimmung der optischen Dichte	20
4.	Molekularbiologische Methoden	20
4.1	DNA-Isolierung.....	20
4.2	Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA	20
4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
4.4	Rekombinante DNA-Techniken.....	21
4.5	Transformation von Bakterien	22
4.5.1	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
4.5.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	22
4.6	Konstruktion von Deletionsmutanten	23
4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
4.8	Zufallsmutagenese.....	25
4.9	DNA-Sequenzierung	25
5.	Biochemische Methoden	26
5.1	Zellaufschluss und Fraktionierung	26
5.2	Proteinbestimmung	27
5.3	Proteinreinigung	27
5.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	28
5.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
5.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	28
5.4.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	29
5.5	Western-Blot	30

5.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	31
6.	Genexpressionsanalysen.....	33
6.1	Isolierung von RNA	33
6.2	DNA-Chip-Analysen	33
6.2.1	Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips	33
6.2.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	34
6.2.3	DNA-Chip-Hybridisierung.....	35
6.2.4	Auswertung von DNA-Chips	35
6.3	Primer-Extension-Analysen.....	36
6.4	RT-PCR	37
7.	Analyse von DNA-Protein-Interaktionen	38
7.1	Affinitätsreinigung mit Dynabeads Streptavidin-gebundener DNA.....	38
7.2	DNase I-Footprint-Analyse.....	39
IV	Ergebnisse.....	41
1.	Untersuchungen zur Regulation der <i>clp</i>-Gene durch ClgR.....	41
1.1	Relative Quantifizierung der Transkripte von <i>clpPIP2</i> und <i>clpC</i> und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels Primer-Extension-Analyse	41
1.2	Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032, $\Delta clpC$, $\Delta clgR$ und $\Delta clpC\Delta clgR$	43
1.3	Identifikation der ClgR-Bindestellen stromaufwärts von <i>clpPIP2</i> und <i>clpC</i>	44
1.3.1	Aufreinigung von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II.....	44
1.3.2	Nachweis der Funktionalität der ClgR-Konstrukte	47
1.3.3	Bindung von ClgR-C an die Promotorbereiche von <i>clpPIP2</i> und <i>clpC</i>	48
1.4	Analyse der <i>clpPIP2</i> - und <i>clpC</i> -Promotorbereiche in Actinomyceten	50
2.	Definition des ClgR-Regulon	53
2.1	Eingrenzung weiterer putativer Mitglieder des ClgR-Regulons.....	53
2.2	Relative Quantifizierung der Transkripte putativer Gene des ClgR-Regulons	54
2.3	Untersuchung der Bindung von ClgR an weitere Zielpromotoren	56
2.3.1	Affinitätsreinigung mit ausgewählten Zielpromotoren	56
2.3.2	Identifikation der Bindungsstellen mittels DNase I-Footprint-Analysen.....	57
2.4	Untersuchungen zur Funktion von NCgl0748 und HflX.....	60
2.4.1	Anfügen von StrepTag-II codierenden Sequenzen an die chromosomalen <i>NCgl0748</i> - und <i>hflX</i> -Gene.....	60
2.4.2	Lokalisation von NCgl0748 und HflX über Anti-StrepTag-Westernblot.....	62
2.4.3	Konstruktion und phänotypische Charakterisierung von <i>NCgl0748</i> - und <i>hflX</i> - Deletionsmutanten.....	63
2.4.4	Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032, $\Delta NCgl0748$ und	

<i>ΔhflX</i>	64
2.4.5 Transkriptomvergleich von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>ΔNCgl0748</i>	66
3. Versuche zur Regulation der ClgR-Aktivität.....	68
3.1 Quantifizierung der mRNA-Menge von <i>clgR</i> in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und <i>ΔclpC</i> -Mutante	69
3.2 Untersuchung der Stabilität von ClgR in der <i>ΔclpC</i> -Mutante.....	70
3.2.1 Aufreinigung von Strep-getagtem ClgR.....	70
3.2.2 Lokalisation von ClgR nach zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	71
3.2.3 Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und <i>ΔclpC</i> -Mutante nach Silberfärbung.....	72
3.3 Untersuchung der Stabilität von ClgR in einer konditionalen <i>clpP</i> -Mutante	73
3.4 Entwicklung eines Screeningsystems zur Identifikation des Degradationssignals in ClgR.....	76
4. Untersuchungen zum Stimulus der Aktivierung von ClgR	81
4.1 Induktion der SOS-Antwort mit Mitomycin C	81
4.1.1 Vergleich des Wachstums von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>ΔclgR</i> in Gegenwart verschiedener Mitomycin-Konzentrationen.....	82
4.1.2 Vergleich der Zellmorphologie von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und <i>ΔclgR</i> nach Zugabe von Mitomycin C	82
4.1.3 Einfluss von Mitomycin auf die globale Genexpression von <i>C. glutamicum</i> 13032 und <i>ΔclgR</i> -Mutante.....	84
V Diskussion.....	86
1. ClgR, ein Regulator der <i>clp</i>-Genexpression in Actinomyceten.....	86
2. Das ClgR-Regulon.....	88
2.1 Identifikation der Mitglieder des ClgR-Regulons	88
2.2 Charakterisierung von NCgl0748 und HflX	91
3. Transkriptionsaktivierung durch ClgR.....	93
4. Die Regulation der ClgR-Aktivität.....	94
4.1 Posttranslationale Regulation von ClgR	94
4.2 Das Degradationssignal von ClgR	97
5. Stimulus der Stabilisierung von ClgR.....	100
6. Ausblick	102
VI Literaturverzeichnis.....	105