

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG.....	2
1. Valin-Produktion mit <i>C. glutamicum</i>	2
2. Funktion und Regulation der Aconitase im Stoffwechsel	5
3. Ziele der Arbeit.....	9
III. MATERIAL UND METHODEN.....	10
1. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	10
2. Organismen und Plasmide	11
3. Oligonukleotide.....	13
4. Nährmedien, Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung.....	16
5. Molekulargenetische Methoden	19
5.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....	19
5.1.1. Isolierung von genomischer DNA.....	19
5.1.2. Isolierung von RNA	19
5.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA	19
5.2. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	20
5.3. Rekombinante DNA-Techniken	20
5.4. Transformation von Bakterien.....	21
5.4.1. Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
5.4.2. Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> - Zellen	21
5.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
5.6. Konstruktion von <i>C. glutamicum</i> -Deletionsmutanten	22
5.7. Southern-Blot-Analyse.....	23
5.8. Primer-Extension-Analyse	25
5.9. DNase I-Footprint-Analysen.....	26
6. Elektrophoretische Methoden	27
6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
6.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
6.3. Gel-Elektrophoresen zur Trennung von DNA- und RNA- Fragmenten	28

6.3.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	28
6.3.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	29
6.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese für die DNA- Sequenzierung und Primer-Extension-Analysen.....	29
7. Biochemische Methoden	30
7.1. Zellaufschluss und Fraktionierung	30
7.2. Proteinreinigung	31
7.2.1. StrepTactin-Affinitätschromatographie	31
7.2.2. Affinitätsreinigung mittels Dynabeads® Streptavidin.....	32
7.3. TCA-Fällung	33
7.4. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
7.5. Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	34
7.5.1. Detektion mit kolloidalem Coomassie.....	34
7.5.2. Silberfärbung.....	34
7.6. MALDI-TOF-Massenspektrometrie	35
7.6.1. Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen	35
7.6.2. Aufreinigung von Peptiden für MALDI-TOF.....	35
7.6.3. Erstellen von Peptidmassen-Fingerprints.....	35
7.7. Größenausschlusschromatographie	36
7.8. Bestimmung der Aconitase-Aktivität	36
7.9. Bestimmung der Eisenkonzentration	37
7.10. Enzymatische Glukosebestimmung	37
7.11. Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC	38
7.12. Gelretardation	39
8. DNA-Chip-Technologie	39
8.1. Herstellung von <i>C. glutamicum</i> DNA-Chips	40
8.2. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips.....	40
8.3. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	41
8.4. DNA-Chip-Hybridisierung	42
8.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	42
8.6. Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten	43
8.7. Archivierung von DNA-Chip-Daten	44
8.8. Hierarchische Clusteranalyse.....	44

IV. ERGEBNISSE	46
1. Globale Expressionsanalysen zur Identifizierung neuer Zielgene für die Optimierung eines Valin-Produktionsstammes von <i>C. glutamicum</i>.....	46
1.1. Optimierung der Valin-Bildung durch Variation verschiedener Kulturparameter.....	46
1.2. Vergleichende Transkriptomanalysen von verschiedenen Valin-produzierenden Stämmen.....	49
1.3. Einfluss von NCgl0137 auf die Valin-Bildung.....	53
2. Identifizierung und Charakterisierung von AcnR, einem Repressor der Aconitase in <i>C. glutamicum</i>.....	54
2.1. Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Aconitase-Aktivität	54
2.2. Identifizierung eines Gens (<i>acnR</i>) für einen TetR-Typ-Regulator stromabwärts des <i>acn</i> -Gens für die Aconitase	55
2.3. Hinweise auf die Co-Transkription der Gene <i>acn</i> und <i>acnR</i>	57
2.4. Konstruktion und Charakterisierung einer $\Delta acnR$ -Deletionsmutante.....	59
2.4.1. Einfluss der <i>acnR</i> -Deletion auf Wachstum und Aconitase-Aktivität.....	60
2.4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante	62
2.4.3. Einfluss von Eisen auf die globale Genexpression von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante.....	64
2.5. Identifizierung des Transkriptionsstarts des <i>acn</i> -Gens	66
2.6. Nachweis der Bindung von AcnR an den <i>acn</i> -Promotor	67
2.6.1. Heterologe Expression und Aufreinigung von AcnR	67
2.6.2. Bestimmung der nativen Größe von AcnR.....	68
2.6.3. DNaseI-Footprints zum Nachweis der Bindung von AcnR an den <i>acn</i> -Promotor.....	69
2.7. Gelretardationsexperimente	71
2.7.1. Verifizierung der AcnR-Binderegion	71
2.7.2. Suche nach dem AcnR-Effektor	74

2.8. Suche nach weiteren Transkriptionsregulatoren des <i>acn</i> -Gens mittels DNA-Affinitätschromatographie mit der <i>acn</i> -Promotorregion.....	75
2.9. Einfluss der Überexpression von <i>acnR</i> und <i>acnR</i> -Derivaten auf die Aconitase-Aktivität des Wildtyps und der $\Delta acnR$ -Mutante.....	77
3. Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsregulators NCgl0943	78
3.1. Konstruktion und Charakterisierung einer $\Delta NCgl0943$ -Mutante	78
3.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von Wildtyp und $\Delta NCgl0943$ -Mutante bei verschiedenen Eisenkonzentrationen.....	80
4. Einfluss von <i>acn</i> -Deletion und <i>acn</i> -Überexpression in <i>C. glutamicum</i>	81
4.1. Konstruktion und Charakterisierung einer Δacn -Mutante.....	81
4.2. Einfluss auf Wachstum und Aconitase-Aktivität	82
4.3. Vergleichende Transkriptomanalyse	83
4.3.1. Transkriptomvergleich von Δacn -Mutante und Wildtyp	84
4.3.2. Transkriptom-Vergleich von <i>acn</i> -Überexprimierer und Wildtyp	86
V. DISKUSSION	88
1. Einfluss der Valin-Bildung auf die globale Genexpression.....	88
2. Charakterisierung von AcnR und Einfluss auf die <i>acn</i> -Expression	90
3. Einfluss von Eisen auf die <i>acn</i> -Expression	93
4. Funktion und Regulation der Aconitase in <i>C. glutamicum</i>	95
VI. LITERATURVERZEICHNIS	99
VII. ANHANG	113