

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	2
III. MATERIAL UND METHODEN	10
1. Bakterienstämme und Plasmide	10
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Nährmedien	14
2.3 Kultivierung der Bakterien	15
2.4 Stammhaltung	15
2.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika	16
2.6 Induktion der Glutamatausscheidung	16
2.7 Temperatur-induzierte Glutamatausscheidung im Chemostat	17
2.8 Ausscheidung von L-Glutamat nach osmotischem Schock.....	18
3. Molekulargenetische Methoden	18
3.1 Isolierung genomischer DNA.....	18
3.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
3.3 Isolierung von RNA.....	19
3.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	19
3.5 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA	19
3.6 Polymerasekettenreaktion	20
3.7 Konstruktion von Integrations- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	21
3.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
3.8.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung von DNA	22
3.8.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese	23
3.9 Transformation von Bakterien	23
3.9.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
3.9.2 Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	23
3.10 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen	24
4. reverse Transkriptase-PCR.....	25

5. Biochemische Methoden	26
5.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	26
5.1.1 Herstellung von Enzymrohextrakten.....	26
5.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
5.1.3 Bestimmung der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase -Aktivität (EC 1.1.2.3).....	26
5.2 Bestimmung von Metaboliten.....	27
5.2.1 Silikonölzentrifugation.....	27
5.2.2 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed phase</i> HPLC.....	28
5.2.3 Bestimmung von Glucose.....	29
5.2.4 Bestimmung von L-Lactat.....	29
6. Bestimmung von Zellgrößen mittels Durchflusscytometrie	30
7. DNA-Chip-Technologie	30
7.1 Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -DNA-Chips.....	31
7.2 Nachbehandlung von DNA-Chips.....	32
7.3 Synthese fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden.....	32
7.3.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	32
7.3.2 Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA.....	33
7.4 DNA-Chip-Hybridisierung.....	33
7.5 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	33
7.6 Normierung und statistische Analyse von Chip-Daten.....	34
7.7 Archivierung von DNA-Chip-Daten.....	35
7.8 Hierarchische Clusteranalyse.....	35
IV. ERGEBNISSE	36
1. Einfluss von L-Glutamat auf das Wachstum und die Genexpression von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	36
2. Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mittels DNA-Chip-Analysen	37
2.1 Einfluss von Stimuli auf Wachstum und Glutamatausscheidung.....	37
2.1.1 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel.....	39
2.1.2 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Ethambutol.....	40

2.1.3	Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Penicillin G	47
2.1.4	Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Tween40	48
2.2	Identifizierung von Transkriptommustern	50
3.	Charakterisierung der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung von <i>C. glutamicum</i> 2262.....	53
3.1	Kontinuierliche Fermentation von <i>C. glutamicum</i> 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP.....	53
3.2	Vergleichende Transkriptomanalyse des L-Glutamat-produzierenden Stammes <i>C. glutamicum</i> 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP	57
3.3	Konstruktion einer <i>NCgl2816</i> -Inaktivierungsmutante in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	60
3.4	Überexpression von <i>NCgl2817</i> in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>C. glutamicum</i> 13032:: <i>NCgl2816</i>	62
3.5	Vergleichende Transkriptomanalyse nach Wachstum von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 auf L-Lactat und Pyruvat.....	65
3.6	Untersuchungen zur Transkription von <i>NCgl2816</i> und <i>IldD</i>	68
4.	Untersuchungen zum Einfluss von Membranproteinen auf die Ausscheidung von L-Glutamat.....	69
4.1	Einfluss der Disruption von Genen, die während der Glutamatausscheidung differentiell exprimiert wurden.....	69
4.2	Einfluss der <i>NCgl2566</i> -Deletion auf die Ausscheidung von L-Glutamat	74
4.3	Vergleichende Genomanalysen der Stämme <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. efficiens</i> und <i>C. glutamicum</i>	76
5.	Untersuchungen zum Einfluss der Osmolalität des Mediums auf die Glutamatausscheidung von <i>C. glutamicum</i> 13032.....	80
V.	DISKUSSION.....	82
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	95
VII.	ANHANG	109