

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung .....	1
2.1. Phosphorstoffwechsel .....	1
2.2. Regulation des Phosphatmangels in Bakterien .....	4
Ziel dieser Arbeit .....	12
3. Material und Methoden .....	13
3.1. Bakterienstämme und Plasmide .....	13
3.2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen .....	14
3.2.1. Nährmedien .....	14
Nährmedien für <i>E. coli</i> .....	14
Nährmedien für <i>C. glutamicum</i> .....	14
3.2.2. Medienzusätze .....	15
3.2.3. Kultivierung von Bakterien .....	15
3.2.4. Stammhaltung.....	15
3.2.5. Anzucht für die Primerextensionsanalyse und die.....	15
Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests .....	15
3.2.6. Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen für <i>C. glutamicum</i> WT und .....	16
die Deletionsmutante $\Delta phoRS$ .....	16
3.2.7. Anzucht von Kulturen für die mRNA-Degradationsexperimente.....	17
3.3. Molekulargenetische Methoden.....	17
3.3.1. Isolierung genomischer DNA.....	17
3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA.....	17
3.3.3. RNA-Präparation.....	18
3.3.4. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	18
3.3.5. Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA.....	18
3.3.6. Polymerasekettenreaktion .....	19
3.3.7. Agarose-Gelelektrophorese .....	20
DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung von DNA .....	20
RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	20
3.3.8. Transformation von Bakterien .....	21
Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	21
3.3.9. Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse .....	22
3.3.10. Konstruktion der Transkriptionsfusionen.....	22

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4. Biochemische Methoden.....	23
3.4.1. Präparation der Überstände für das Messen der Enzymaktivitäten.....	23
3.4.2. 5'-Nukleotidasetest .....	23
3.4.3. UDP-Zuckerhydrolasetest .....	24
3.4.4. Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests.....	24
Proteinbestimmung nach Bradford .....	25
3.5. DNA-Chip-Technologie.....	25
3.5.1. Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -DNA-Chips .....	26
3.5.2. Nachbehandlung von DNA-Chips .....	26
3.5.3. Synthese fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden .....	27
3.5.4. DNA-Chip-Hybridisierung.....	27
3.5.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.	28
3.5.6. Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten .....	29
3.5.7. Archivierung von DNA-Chip-Daten .....	30
3.6. Primerextensionsanalyse .....	30
3.7. Affinitätschromatographie .....	31
3.8. MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	32
3.9. Konstruktion des Plasmids pET16b-his- <i>glxR</i> sowie Überproduktion und .....	
Aufreinigung von GlxR.....	33
3.10. Überproduktion und Aufreinigung von RamB .....	34
3.11. Gelretardierungstests .....	34
3.12. Protein-Gelelektrophorese .....	35
SDS-Gelelektrophorese (Bis-Tris-Gel) .....	35
Native Gele .....	36
4. Ergebnisse .....	37
4.1. Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen von <i>C. glutamicum</i> WT und der.....	
Deletionsmutante $\Delta$ <i>phoRS</i> .....	37
4.2. Bestimmung der 5'-Nukleotidaseaktivität und der UDP- Zuckerhydrolaseaktivität..	39
4.3. Bestimmung des Transkriptionsstarts und der mRNA-Spiegel für die Gene .....	
<i>ushA</i> und <i>nucH</i> in <i>C. glutamicum</i> WT und $\Delta$ <i>phoRS</i> .....	40
4.4. Expression der Transcriptionsfusion <i>pstS'</i> - <i>cat</i> in <i>C. glutamicum</i> WT und der.....	
Deletionsmutante $\Delta$ <i>phoRS</i> .....	41
4.5. Deletionanalyse des <i>pstS</i> -Promotors .....	42
4.6. Identifizierung von Proteinen, die an den <i>pstS</i> Promotor binden .....	47

---

4.7.	Interaktion zwischen aufgereinigtem GlxR-Protein und dem <i>pstS</i> -Promotor <i>in vitro</i>	53
4.8.	Interaktion zwischen aufgereinigtem RamB-Protein und dem ..... <i>pstS</i> -Promotor <i>in vitro</i> .....	57
4.9.	Analyse der Regulation des <i>pstS</i> -Promotors durch RamB <i>in vivo</i> .....	64
4.10.	Vergleich der Phosphatmangel induzierten Genexpression in <i>C. glutamicum</i> WT ..... auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen .....	67
4.11.	Genomweite Analyse der mRNA-Stabilität in <i>C. glutamicum</i> .....	70
5.	Diskussion .....	76
5.1.	Genomweite Analyse der mRNA-Stabilität in <i>C. glutamicum</i> .....	76
5.2.	Rolle des Zweikomponentensystems PhoRS bei der Regulation der Gene des Phosphorstoffwechsels .....	77
5.3.	RamB .....	80
5.4.	GlxR .....	82
5.5.	Komplexität der Phosphatmangelantwort durch drei weitere Transkriptionsregulatoren CgtR4, NCgl1401 und NCgl2978 .....	84
5.6.	Modell des Phosphatregulationsnetzwerkes in <i>C. glutamicum</i> .....	86
5.7.	Verbindung zwischen der Regulation des Kohlenstoff- und des Phosphorstoffwechsels .....	93
6.	Literatur .....	96
7.	Anhang .....	110
	Danksagung .....	119