
Inhaltsverzeichnis

I	Abstract	1
II	Zusammenfassung	2
III	Einleitung	3
1	Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen.....	3
1.1	Das klassische Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem.....	3
1.1.1	Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in <i>C. glutamicum</i>	6
1.2	Regulation der Phosphatmangelantwort.....	7
1.2.1	Phosphatmangelantwort in <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. tuberculosis</i> und <i>Streptomyces</i> -Spezies.....	7
1.2.2	Phosphatmangelantwort in <i>C. glutamicum</i>	11
2	L-Lysinbiosynthese in <i>C. glutamicum</i>	12
3	Das Thema der Arbeit.....	14
IV	Material und Methoden	15
1	Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen).....	15
2	Nährmedien.....	15
3	Bakterienstämme.....	17
4	Plasmide.....	17
4.1	Konstruktion der Expressionsplasmide pET16b-PhoR _{N-His10} und pMalE-PhoSK.....	18
5	Stammhaltung von Bakterienstämmen.....	19
6	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	20
6.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	20
6.2	Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	20
7	Molekularbiologische Methoden.....	21
7.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	21
7.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	22
7.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	22

II Inhaltsverzeichnis

7.4	Rekombinante DNA-Techniken	23
7.5	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
7.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	24
7.7	Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	25
7.8	Polymerasekettenreaktion.....	26
7.9	„Overlap extension“-Polymerasekettenreaktion.....	27
7.10	DNA-Sequenzierung	27
8	Proteinbiochemische Methoden	28
8.1	Zellaufschluss und Zellfraktionierung	28
8.2	Affinitätschromatographie mittels „Ni ²⁺ -Nitrilotriacetic acid“ (NTA)-Agarose	28
8.3	Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz.....	29
8.4	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen.....	30
8.5	Proteolytischer Verdau mittels Faktor Xa	30
8.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	30
8.7	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen.....	31
8.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
8.9	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
8.10	Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung der nativen Größe von PhoR.....	32
9	Phosphorylierungsexperimente mit γ-[³²P]-ATP	33
10	DNA-Protein-Interaktionsstudien	34
10.1	Radioaktive Gelretardationsexperimente.....	34
10.2	Nicht-radioaktive Gelretardationsexperimente.....	35
10.3	DNase I-Footprint-Analysen	36
11	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Enzymtests	37
12	Enzymatisch-photometrische Glukose-Bestimmung	38
13	Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed-phase</i> HPLC	40
V	Ergebnisse	41
1	DNA-Protein-Interaktionsstudien mit PhoRΔ1-125	41
1.1	Radioaktive Gelretardationsexperimente mit PhoR Δ 1-125.....	41
1.2	DNase I-„Footprint“-Analysen mit PhoR Δ 1-125.....	43
2	DNA-Protein-Interaktionsstudien mit PhoR	45
2.1	Überproduktion, Reinigung und Verdau von PhoR _{N-His10}	45
2.2	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von PhoR	46

2.3	Überproduktion und Reinigung von MalE-PhoS	49
2.4	Autophosphorylierung der Kinase-Domäne von PhoS und Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator PhoR	50
2.5	Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung und des N-terminalen His-„tags“ auf die DNA-Bindungsaffinität von PhoR	52
2.6	Direkter Vergleich der Bindungsaffinitäten von PhoR _{N-H} zu den Promotorregionen von <i>pstS</i> und <i>nucH</i>	54
2.7	Identifizierung weiterer Promotoren, an die PhoR direkt bindet	55
2.8	Identifizierung von PhoR-Bindestellen in den Promotorregionen von <i>pstS</i> und <i>phoR</i>	57
2.9	Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von <i>pstS</i>	58
2.10	Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von <i>phoR</i>	61
2.11	Herleitung und Überprüfung eines möglichen PhoR-Konsensus-Bindemotivs	62
2.12	Nachweis der <i>in vivo</i> -Relevanz der identifizierten PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von <i>phoR</i>	65
3.	Einfluss von unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen und von PhoRS auf die Lysinproduktion von <i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730	67
3.1	Konstruktion der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> DM1730 Δ <i>phoRS</i> /pEKE _{x2} sowie der Komplementationsmutante <i>C. glutamicum</i> DM1730 Δ <i>phoRS</i> /pEKE _{x2} - <i>phoRS</i>	67
3.2	Einfluss der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730/pEKE _{x2}	68
3.3	Einfluss der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730 Δ <i>phoRS</i> /pEKE _{x2} - <i>phoRS</i>	69
3.4	Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der PhoRS-Überproduktion und der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730	71
VI	Diskussion	75
1	Regulation der Phosphatmangelgene durch das Zweikomponenten-System PhoRS	75
1.1	Das PhoRS-System, ein Rheostat?	77
1.2	PhoR, ein bifunktionaler Antwortregulator?	79
1.3	Aktivierung von PhoR durch Phosphorylierung	80
1.4	PhoR bindet an einen für OmpR-Regulatoren typischen „direct repeat“	81
1.5	Zusammenfassende Darstellung der Regulation der Phosphatmangelgene durch das Zweikomponenten-System PhoRS von <i>C. glutamicum</i>	85
2.	Einfluss von PhoRS und unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen auf die Lysinproduktion von <i>C. glutamicum</i> DM1730	87

VII	Literaturverzeichnis	90
VIII	Anhang	103
1	Oligonukleotide.....	103
2	PCR-Fragmente für Gelretardationsexperimente	111
3	Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	112