

Inhaltsverzeichnis

I	Abstract	1
II	Zusammenfassung	3
III	Einleitung	5
1	Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in <i>C. glutamicum</i>	6
2	Das MtrAB-Zweikomponentensystem	7
3	Das Thema der Arbeit	11
IV	Material und Methoden	12
1	Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen)	12
2	Nährmedien	12
3	Oligonukleotide	13
4	Plasmide	20
5	Bakterienstämme	22
6	Stammhaltung von Bakterienstämmen	22
7	Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	23
8	Expressionskulturen.....	23
9	Molekularbiologische Methoden.....	24
9.1	DNA-Isolierung.....	24
9.2	DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung	25
9.3	Agarose-Gelelektrophorese	25
9.4	Rekombinante DNA-Techniken	25
9.5	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
9.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	27
9.7	Konstruktion von Deletionsmutanten.....	28
9.8	Polymerasekettenreaktion.....	29
9.9	Southern-Blot-Analyse	29
9.10	DNA-Sequenzierung	30
10	Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays.....	31
10.1	Isolierung von RNA	31
10.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	31
10.3	DNA-Chip-Hybridisierung	32
10.4	Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips	33
10.5	Auswertung der DNA-Microarray-Experimente.....	34
11	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts	34
11.1	„Primer-Extension“-Experimente	34
11.2	5`-RACE	35

12	Transmissionselektronenmikroskopie	36
13	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)	36
14	Proteinbiochemische Methoden	37
14.1	Zellaufschluß mit einer French-Press-Zelle und Zellfraktionierung	37
14.2	Affinitätschromatographie mittels „Ni ²⁺ -Nitrilotriacetic acid“ (NTA)-Agarose.....	37
14.3	Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz	38
14.4	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen	38
14.5	Proteinverdau mittels Thrombin.....	38
14.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
14.7	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen	39
14.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
14.9	Western-Blot	40
14.10	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	41
15	Phosphorylierungsexperimente.....	42
16	DNA-Protein-Interaktionsstudien.....	43
16.1	ChIP-to-chip	43
16.2	DNA-Affinitätsreinigungen	44
16.3	Gelretardationsexperimente	45
17	Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed-phase</i> HPLC	46
V	Ergebnisse	48
1	Die $\Delta mtrAB$-Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp	48
2	Konstruktion und Charakterisierung der $\Delta mtrA$-, $\Delta mtrB$-, $\Delta mtrAB\Delta mepA$- und $\Delta mtrAB\Delta ppmA$-Mutanten	52
3	Vergleichende Transkriptomanalyse von $\Delta mtrA$ und <i>C. glutamicum</i> Wildtyp	56
4	<i>In-vitro</i> Charakterisierung von MtrA+N_{GSH}.....	58
4.1	Heterologe Überproduktion, Reinigung und Verdau von MtrA+NHis ₆	59
4.2	Bestimmung des nativen Molekulargewichts.....	61
4.3	<i>In-vitro</i> -Phosphorylierung von MtrA+N _{GSH} durch verschiedene Sensorkinase- Derivate	63
5	DNA-Protein-Interaktionsstudien mit MtrA.....	67
5.1	ChIP-to-chip-Experimente	67
5.2	Affinitätsreinigungen.....	68
5.3	Gelretardationsexperimente	72
5.3.1	Identifizierungen von MtrA-Bindestellen und Herleitung eines Konsensusmotivs	72

5.3.2	Vergleich der Affinität von unphosphoryliertem und phosphoryliertem MtrA+N _{GSH} zu verschiedenen Promotorregionen.....	77
5.4	Identifizierung weiterer direkter Zielgene von MtrA.....	79
VI	Diskussion.....	86
1	Phänotypische Charakterisierung verschiedener <i>C. glutamicum</i>-Mutanten	86
2	Identifizierung direkter Zielgene von MtrA.....	91
3	Funktion des MtrAB-Zweikomponentensystems.....	98
VII	Literaturverzeichnis.....	101
VIII	Anhang	108
A1	Alignment von MtrA aus verschiedenen Corynebakterien und Mykobakterien	108
A2	Alignment von MtrB aus verschiedenen Corynebakterien und Mykobakterien	110
A3	Restriktionskarten der konstruierten Plasmide.....	116
A4	PCR-Fragmente für Gelretardationsexperimente.....	121
A5	Auflistung aller möglichen Zielgene und die zugehörigen Ergebnisse aus den Transkriptomchip- und den ChIP-to-chip-Experimenten.....	124