

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	III
I. Einleitung	1
1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
2. Acyl-CoA Carboxylasen und Lipidsynthese	2
3. Regulation des Lipidstoffwechsels	6
4. Ziel der Arbeit.....	10
II. Material und Methoden	11
1. Bakterienstämme und Plasmide	11
2. Oligonukleotide	13
3. Nährmedien	22
4. Kultivierungsbedingungen.....	23
4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	23
4.2 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	23
4.3 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen	24
5. Molekularbiologische Methoden.....	24
5.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i>	24
5.2 Isolierung von Plasmid-DNA	25
5.3 Isolierung von RNA	25
5.4 Reinigung von DNA	26
5.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	26
5.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	27
6. Rekombinante DNA-Techniken.....	27
7. Klonierungsexperimente	28
7.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
7.2 Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	28
7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
7.4 Quantitative Real-Time PCR.....	30
7.5 DNA-Microarray-Technologie.....	31
7.5.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	31
7.5.2 DNA-Chip-Hybridisierung.....	32
7.5.3 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	33
7.6 Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	34
7.7 DNA-Sequenzanalyse.....	35
8. Biochemische Methoden.....	36
8.1 Zellaufschluss	36
8.2 Genexpression.....	37
8.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	37
8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
8.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	38
8.6 Chromatographische Methoden.....	39
8.6.1 Gelfiltrationschromatographie	39

8.6.2 Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	39
8.7 DNA-Protein-Interaktionsstudien.....	40
8.7.1 Affinitätsreinigung mittels Dynabeads® M-280 Streptavidin	40
8.7.2 Gelretardationsexperimente	42
8.7.3 Koisolationsexperiment zur Identifikation des FasR Effektors....	43
8.8 Fettanalyse nach Weibull-Stoldt.....	44
III. Ergebnisse.....	45
1. Transkriptionsanalyse der Gene der Carboxylase-Untereinheiten <i>accD1</i> , <i>accD2</i> und <i>accBC</i>	45
1.1 Einfluss der Kohlenstoffquelle.....	45
1.2 Einfluss von Oleat.....	48
2. Untersuchungen zur Regulation der Gene <i>accD1</i> und <i>accD2</i>	49
2.1 Identifizierung von Regulatoren, die an die <i>accD1</i> -Promotorregion binden	50
2.2 Identifizierung von Regulatoren, die an die <i>accD2</i> -Promotorregion binden	54
3. Charakterisierung der putativen Regulatoren von <i>accD1</i>	56
3.1 Deletion der Gene <i>fasR</i> , <i>marR</i> , <i>syrB</i> und <i>whiA</i>	56
3.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten $\Delta fasR$, $\Delta marR$ und $\Delta syrB$	57
3.3 Konstruktion der Komplementationsmutante $\Delta fasR$ pEKEx2- <i>fasR</i>	61
4. Transkriptomanalyse von $\Delta fasR$ im Vergleich zum Wildtyp	63
5. Charakterisierung von FasR	66
5.1 Heterologe Genexpression und Proteinpräparation.....	66
5.2 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von FasR	69
6. Identifizierung der Zielgene und der Bindestelle von FasR.....	70
6.1 Gelretardationsexperimente mit putativen Zielgenen von FasR ..	71
6.2 Identifizierung der FasR-Bindestellen in den Promotorregionen von <i>accD1</i> , <i>accBC</i> , <i>fasA</i> und <i>fasB</i>	72
6.3 Berechnung des FasR-Bindemotivs.....	80
6.4 Überprüfung des FasR-Bindemotivs vor <i>accD1</i>	82
7. Identifizierung des Effektors von FasR.....	84
7.1 Einfluss von CoA, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA auf FasR.....	84
7.2 Koisolationsexperimente zur Identifizierung des FasR-Effektors	87
IV. Diskussion	90
1. Abhängigkeit der <i>accD1</i> -Genexpression von der Kohlenstoffquelle und Oleatzugabe	90
2. Regulationsmechanismus von <i>accD1</i>	93
3. Charakterisierung der <i>C. glutamicum</i> -Mutante $\Delta fasR$	96
4. Charakterisierung des Regulators FasR	99
V. Zusammenfassung.....	105
VI. Abstract.....	107
VII. Literaturverzeichnis	109
VIII. Anhang.....	124