

Forschungszentrum Jülich GmbH Institut für Biotechnologie

Genomweite Genexpressionsanalysen
mit DNA-Chips zur Charakterisierung
des Glucose-Überflussmetabolismus
von *Escherichia coli*

Tino Polen

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 5
ISSN 1433-5549 ISBN 3-89336-337-8

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung , 6

2. Material und Methoden 12
 - 2.1. Chemikalien 12
 - 2.2. Lösungen 13
 - 2.3. Medien 14
 - 2.4. Stammhaltung und mikrobiologische Arbeiten 14
 - 2.4.1. Herkunft der verwendeten Bakterienstämme 15
 - 2.4.2. Batch-Kultivierung in Schüttelkolben 15
 - 2.4.3. Kontinuierliche Kultur im Chemostaten 16
 - 2.4.4. Mobilitäts- Test 18
 - 2.5. Enzymologische Methoden 19
 - 2.5.1. Bestimmung von Enzymaktivitäten 19
 - 2.5.2. Bestimmung von Glucose und Metaboliten 19
 - 2.6. Nachweis organischer Säuren 20
 - 2.7. Molekularbiologische Arbeiten 20
 - 2.7.1. Präparation von genomischer DNA 20
 - 2.7.2. Präparation von RNA 21
 - 2.7.3. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden 22
 - 2.7.4. Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA-Sonden 22
 - 2.8. DNA-Chip- Technologie 23
 - 2.8.1. Oberflächenbeschichtung von DNA-Chip- Trägern 23

2.8.2. Amplifizierung der <i>E. coli</i> Gene	24
2.8.3. Robotergestützte Herstellung von DNA-Chips	25
2.8.4. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips	26
2.8.5. DNA-Chip-Hybridisierung	28
2.8.6. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips	28
2.8.7. Normalisierung der relativen mRNA-Spiegel	30
2.8.8. Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten	30
2.8.9. Cluster Analyse	31
2.8.10. Statistik	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Etablierung und Validierung der DNA-Chip- Technologie für <i>E. coli</i>	33
3.1.1. Qualitätskontrolle der <i>E. coli</i> -DNA-Chips	33
3.1.2. Reproduzierbarkeit von DNA-Chip-Experimenten	37
3.1.3. Bestimmung Kohlenstoffquellen-abhängiger Expressionsveränderungen in <i>E. coli</i>	39
3.2. Analyse der Genexpression bei Wachstum auf Acetat und Propionat	41
3.3. Analyse der Genexpression bei Anwesenheit von Acetat bzw. Propionat	45
3.4. Untersuchung der Genexpressionsveränderungen in <i>E. coli</i> bei Glucose- Überflussmetabolismus in aerober Chemostatkultur	61
3.4.1. Untersuchungen zum Einfluss der Glucosekonzentration auf die Acetatbildung in N-limitierten kontinuierlichen Kulturen von <i>E. coli</i> MG1655	61
3.4.2. Kohlenstoffbilanz und Bildung organischer Säuren	64
3.4.3. Bestimmung der Genexpression in den aeroben Chemostatkulturen	66
3.4.4. Kombinatorische Bestimmung der spezifisch mit steigender Acetatbildung einhergehenden Genexpressionsveränderungen	69
4. Diskussion	71
4.1. Einfluss der C-Quelle Acetat auf die Genexpression in <i>E. coli</i>	71
4.2. Einfluss einer nicht-wachstumshemmenden Acetatkonzentration auf die Genexpression in <i>E. coli</i>	74
4.3. Globale Genexpressionsanalysen bei Auslösung des Glucose- Überflussmetabolismus in <i>E. coli</i>	81
5. Zusammenfassung	88
6. Literaturverzeichnis	90