

Charakterisierung des Sigmafaktors SigB aus
Corynebacterium glutamicum und seiner Rolle bei der
Genexpression in der Transitionsphase des Wachstums

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Christof Larisch

aus Kattowitz

Dezember 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Pühler

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker F. Wendisch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2007

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
II.	EINLEITUNG.....	3
1	Die Gattung Corynebacterium.....	3
1.1	Taxonomie der Corynebakterien.....	3
1.2	Wirtschaftliche Bedeutung der Corynebakterien	4
1.3	<i>Corynebacterium glutamicum</i> im Zeitalter der <i>functional genomics</i>	5
2	Sigmafaktoren bei Bakterien.....	7
2.1.	Die zwei Familien der bakteriellen Sigma-Faktoren, σ^{54} und σ^{70}	9
2.	Die σ^{54} -Familie	10
2.3	Die σ^{70} -Familie	11
2.3.1	Haupt- σ -Faktoren.....	13
2.3.2	Nicht- essentielle σ -Faktoren.....	13
2.3.3	Die alternativen σ -Faktoren	14
2.4	Die Sigmafaktoren von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	16
3	Ziele dieser Arbeit	19
III.	MATERIAL UND METHODEN	20
1	Bakterienstämme und Plasmide	20
1.1	Bakterienstämme.....	20
1.2	Plasmide	20
1.3	Verwendete Primer	21
2	Enzyme, Chemikalien und andere Materialien	22
2.1	Enzyme und Marker.....	22
2.2	Chemikalien	22
2.3	Materialien	23
2.4	Kits.....	24
2.5	Geräte und Apparaturen	24
2.6	Software	25
3	Medien und Zusätze	25
3.1	Nährmedien.....	25
3.2	Zusätze zu den Nährmedien	26
3.3	Puffer und Lösungen.....	27
3.3.1	Lösungen für Fermentation.....	27
3.3.2	DNA-Isolierung und -Reinigung.....	27
3.3.3	DNA-Transfer	28
3.3.4	Puffer und Lösungen für Vakuum-Blot und Hybridisierung	28
3.3.5	Gelelektrophorese	30
3.3.6	DNA-Amplifizierung mittels PCR.....	30
3.3.7	DNA-Restriktionsspaltung.....	30
3.3.8	RNA-Isolierung.....	31
3.3.9	Array-Hybridisierung.....	31

4	Kultivierung von Bakterien.....	32
4.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien	32
4.2	Bestimmung des Bakterientiters	32
4.3	Stochertest.....	32
4.4	Anzucht der Bakterien im Fermenter	33
4.5	Fermenterparameter:	33
4.5.1	Animpfen des Fermenters	33
4.5.2	Begasungsumstellung.....	33
4.5.3	Probenahme.....	34
4.5.4	Glukosebestimmung.....	34
4.5.5	Bestimmung der Verdopplungszeit t_d	34
5	DNA-Isolierung.....	35
5.1	Gesamt-DNA-Isolierung aus <i>C. glutamicum</i>	35
5.2	Plasmid-DNA Isolierung mit dem QIAquick® Spin Miniprep Kit	36
5.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit	36
6	DNA-Reinigung	36
6.1	PCR-Produkt-Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit.....	36
6.2	Sephadex G50-Säulenchromatographie.....	37
7	DNA-Analyse	37
7.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
7.2	C-Lyse.....	38
8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
8.1	Primer Design	38
8.2	PCR-Reaktionsansätze und Programme	39
8.2.1	PCR-Reaktionsansatz für <i>Pwo</i> -Polymerase	39
8.2.2	PCR-Programm für <i>Pwo</i> -Polymerase	39
8.2.3	PCR-Reaktionsansatz für <i>Pfu</i> -Polymerase.....	39
8.2.4	PCR-Programm für <i>Pfu</i> -Polymerase.....	40
8.2.5	PCR-Reaktionsansatz für <i>Taq</i> -Polymerase.....	40
8.2.6	PCR-Programm für <i>Taq</i> -Polymerase	40
9	Gene-Splicing by Overlap Extension.....	40
9.1	Etablierung einer Deletion im Genom	41
9.2	Deletionsnachweis mit PCR.....	42
10	Klonierungsexperimente.....	42
10.1	DNA-Restriktionsspaltung.....	42
10.1.1	Spaltungsansatz für Plasmide.....	42
10.1.2	Spaltungsansatz für DNA-Fragmente	43
10.2	DNA-Ligation	43
10.2.1	Ligationsansatz für T4-Ligase von MBI Fermentas	43
10.3	Identifizierung rekombinanter Plasmide durch Blau-Weiß-Selektion	43
11	Hybridisierung von DNA (nach Southern, 1975).....	43
11.1	DNA-Transfer durch Vakuum-Blotting.....	44
11.2	Nicht-radioaktive DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP.....	44
11.3	Nicht-radioaktive Hybridisierung	44
11.4	Digoxigenin-Nachweis.....	45
12	DNA-Transfertechniken	45

12.1	Elektroporation.....	45
12.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	46
12.1.2	Elektroporation nach <i>E. coli</i>	46
12.1.3	Herstellung kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	46
12.1.4	Elektroporation nach <i>C. glutamicum</i>	46
13	Gesamt-RNA-Isolierung aus <i>C. glutamicum</i> (Qiagen Manual modifiziert).....	47
13.1	Denaturierendes RNA-Gel.....	48
13.2	PCR-Kontrolle auf DNA.....	48
13.3	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	48
14	Microarray-Hybridisierung	49
14.1	Labeling	49
14.1.1	RT-Reaktion.....	49
14.1.2	Hydrolyse.....	49
14.1.3	Reinigung der cDNA mit dem MinElute™ PCR Purification Kit.....	50
14.1.4	Photometrische Bestimmung der cDNA Konzentration	50
14.1.5	Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe.....	50
14.1.6	Quenching	50
14.1.7	Reinigung der cDNA mit dem MinElute™ PCR Purification Kit.....	50
14.1.8	Kontroll-Gel.....	51
14.2	Array-Hybridisierung.....	51
14.2.1	Arrays waschen	51
15	Expressionsanalyse am LightCycler.....	51
15.1	Auswertung der Expressionsanalyse.....	52
16	5'-RACE-PCR	52
17	DNA-Sequenzierung.....	52
17.1	Sequenzierung mit LI-COR 4200 und ABI 377	52
17.2	Sequenzauswertung.....	53
IV.	ERGEBNISSE.....	54
1	Molekulargenetische Charakterisierung von <i>sigB</i> aus <i>C. glutamicum</i>.....	54
1.1	Erzeugung einer <i>sigB</i> -Deletionsmutante.....	54
1.2	Expressionsstudien von <i>sigB</i> nach Stressapplikation.....	56
1.3	Charakterisierung des Wildtyps und der $\Delta sigB$ -Mutante nach Stressapplikation mittels Lebendtitrierbestimmung	57
1.4	Vergleichende Wachstumsanalysen des Wildtyps und der <i>sigB</i> -Deletionsmutante mittels Schüttelkolbenkultivierung	58
1.5	Vergleichende Wachstumsanalysen des Wildtyps und der <i>sigB</i> -Deletionsmutante mittels Schüttelkolbenkultivierung nach Stressapplikation	60
1.6	Untersuchungen der <i>sigB</i> -Expression im Verlauf einer Wachstumsphase	62
1.7	Identifizierung der Wachstumsphasenregulation durch eine <i>sigB</i> -Überexpression.....	64
2	Identifizierung des SigB-Regulons von <i>C. glutamicum</i>	68
2.1	Glukose-limitierte <i>batch</i> -Fermentation von <i>C. glutamicum</i> und Bestimmung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit μ sowie der Verdopplungszeit t_d	68
2.2	Glukose-limitierte <i>batch</i> -Fermentation von <i>C. glutamicum</i> CL1 und Bestimmung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit μ sowie der Verdopplungszeit t_d	71
3.1	Vergleichende transkriptionelle Analyse des <i>C. glutamicum</i> -Wildtyps während der exponentiellen Wachstumsphase und der Transitionsphase	73

3.2	Vergleichende transkriptionelle Analyse der <i>C. glutamicum sigB</i> -Deletionsmutante CL1 während der exponentiellen Wachstums-phase und der Transitionsphase	76
3.3	Analyse der Gene, die während der Transitionsphase in Abhängigkeit von SigB unterschiedlich stark transkribiert werden	80
3.3	<i>In silico</i> - und <i>in vivo</i> -Identifizierung der SigB-Konsensus-Promotor-sequenz von <i>C. glutamicum</i>	83
3.4	Charakterisierung des Expressionsverhaltens von SigB-regulierten Genen über den Wachstumsverlauf in der <i>sigB</i> -Deletionsmutante CL1	88
V.	DISKUSSION	92
	SigB ist der nicht-essentielle Sigmafaktor in <i>C. glutamicum</i>, der in die Stressantwort involviert ist	92
	SigB ist ein negativer Wachstumsregulator in <i>C. glutamicum</i>	94
	SigB und SigA erkennen ähnliche Promotorsequenzen in <i>C. glutamicum</i>.....	97
VI.	LITERATURVERZEICHNIS:.....	100
VII.	ANHANG	110
1	Häufig verwendete Abkürzungen	110
2	Plasmidkarten.....	112
3	Microarray-Experiment von <i>C. glutamicum</i> RES167 (Transitionsphase / exponentielle-Phase).....	113
4	Microarray-Experiment von <i>C. glutamicum</i> CL1 (Transitionsphase / exponentielle-Phase).....	120
5	SigB Regulon in <i>C. glutamicum</i>	126

I. Zusammenfassung

Im Genom von *Corynebacterium glutamicum* konnten sieben Gene identifiziert werden, die für Sigmafaktoren kodieren. Diese ließen sich in essentielle (SigA), nicht-essentielle (SigB) und alternative Sigmafaktoren (SigC, SigD, SigE, SigH, SigM) unterteilen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB im Hinblick auf seine Rolle in der globalen Genexpression sowohl bei Antwort auf Stressfaktoren als auch beim Übergang vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase untersucht werden.

Die zunächst durchgeführte Charakterisierung des *sigB*-Gens mittels Expressionsanalysen zeigte, dass die höchste Expression während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase erfolgt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die *sigB*-Expression durch Kälte- und Ethanolstress deutlich erhöht wird. Durch eine gezielte Gendeletion im Restriktions- und Modifikations-defektem Stamm RES167 konnte eine *sigB*-Mutante (*C. glutamicum* CL1) konstruiert werden, mit deren Hilfe durch Wachstumstests und Lebendtitrierbestimmungen gezeigt werden konnte, dass SigB ebenfalls an der Bewältigung von Ethanol- und Kältestress beteiligt ist. Desweiteren konnte durch ein IPTG-induzierbares *sigB*-Überexpressionsplasmid ein Einfluss von *sigB* auf das Wachstum gezeigt werden.

Nach der Etablierung einer Glukose-limitierten *batch*-Fermentation wurde in diesem kontrollierten und Stress-armen System das SigB-Regulon im Wildtyp und in der *sigB*-Deletionsmutante mittels DNA-Microarray-Hybridisierungen bestimmt. Dabei waren 153 Gene auffällig, deren verstärkte Expression beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase von der Anwesenheit von *sigB* abhing. Die Gene dieses Regulationsnetzwerks kodieren für eine Vielzahl von Funktionen im Metabolismus, bei Membranprozessen und der Genregulation. Die verstärkte Expression dieser Gene bereitet die Zelle vermutlich auf die veränderten Verhältnisse vor, die während der Stationärphase in der Zelle auftreten können.

Durch bioinformatische Analysen konnte diesem Regulationsnetzwerk eine Promotor-Konsensussequenz zugeordnet werden, an die die RNA-Polymerase durch SigB binden kann. Für die Gene *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* konnte diese Promotorsequenz mittels RACE-PCR verifiziert werden. Es lassen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen einer SigB-Promotor-Konsensussequenz und der von SigA-Promotoren feststellen, so dass der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB vermutlich eine Unter-

klasse der SigA-Promotoren erkennt. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionsprofil der kartierten sechs Gene im Stamm RES167 mit dem des *sigB*-Gens übereinstimmt, wohingegen das Profil dieser Gene in Abwesenheit des *sigB*-Gens im Stamm CL1 über das Wachstum dem Expressionsprofil des Gens *sigA* entspricht.

II. Einleitung

1 Die Gattung *Corynebacterium*

1.1 Taxonomie der Corynebakterien

Die Gattung *Corynebacterium* wurde zum ersten Mal im Jahr 1896 von Lehmann und Neumann zur taxonomischen Einordnung des human-pathogenen Vertreters *Corynebacterium diphtheriae* beschrieben. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Jones & Collins 1986) wird die Gattung zur heterogenen Sektion Gram-positiver, nicht sporulierender Stäbchen mit irregulärer Form gezählt. Ihren Namen verdanken diese nicht-motilen und fakultativ anaeroben Bakterien ihrer charakteristischen keulenförmigen Morphologie: coryne (griech.) = Keule. Ein weiteres charakteristisches Merkmal dieser Gattung ist die „schnappende Zellteilung“ (*snapping division*). Hervorgerufen durch eine asymmetrische Zellteilung entstehen dabei die unter dem Mikroskop leicht erkennbaren V-förmigen Zellpaare (Abb. II.1). Phylogenetisch ist die Gattung *Corynebacterium* den *Actinomycetales* innerhalb der Eubakterien mit hohem G-C-Gehalt (51-65 mol%) zuzuordnen (Liebl, 1991; Stackebrandt E., 1982). Innerhalb dieser Gruppe rechnet man sie aufgrund chemotaxonomischer Vergleiche von Zellwand und Lipidzusammensetzung zusammen mit *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* zur CMN-Gruppe (Barksdale, 1970). Für die Zellwandzusammensetzung charakteristisch sind kurzkettige Mycolsäuren und das ausschließliche Vorkommen von *meso*-2,6-Diaminopimelat zur Quervernetzung des Peptidoglycans, wobei Arabinose und Galaktose den größten Teil der Zellwandzucker ausmachen.

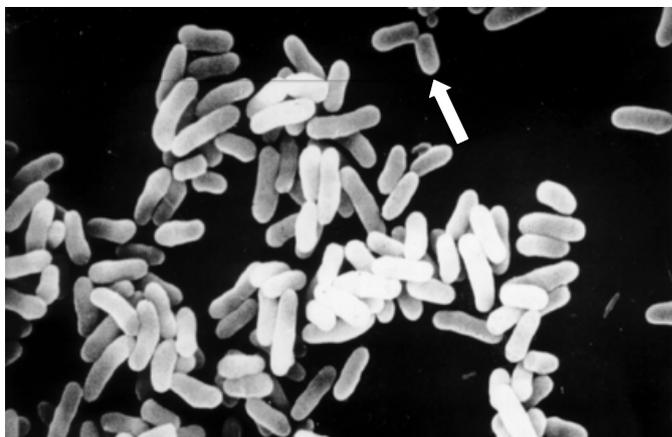


Abb. II.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Sowohl die typische Keulenform als auch das Abwinkeln bei der Teilung (*snapping division*) ist zu erkennen. Der Pfeil markiert zwei Zellen, die nach der Teilung noch V-förmig miteinander verbunden sind.

1.2 Wirtschaftliche Bedeutung der Corynebakterien

Corynebakterien haben durch ihre StoffwechsellLeistungen eine besondere wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Dabei wurden Corynebakterien bereits 1957 (Kinoshita, 1957) als Aminosäureproduzenten entdeckt. In Kulturüberständen von *C. glutamicum* waren große Mengen der Aminosäure L-Glutamat zu finden. Seitdem wurden fermentative Herstellungsverfahren für eine Vielzahl von Stoffen durch *C. glutamicum* und verwandte Spezies (Crueger & Crueger, 1984) entwickelt, welche in der Industrie oder in medizinischen Bereichen eine breite Anwendung finden. In der Tabelle II. 1 sind einige fermentative Einsatzgebiete von Corynebakterien aufgelistet.

Spezies	Einsatz
<i>C. glutamicum</i>	Aminosäure-Produktion (Yamada <i>et al.</i> , 1985)
<i>C. glutamicum</i>	Carotinoid-Produktion (Sandmann, 1994)
<i>C. glutamicum</i>	Pantothenat-Produktion (Sahm & Eggeling, 1999)
<i>C. ammoniagenes</i>	Nukleotid-Produktion (Ogata, 1975)
<i>C. callunae</i>	Aminosäure-Produktion (Kinoshita, 1985)
<i>C. simplex</i>	Biokonversion von Steroiden (Constantinides, 1980)

Tabelle II.1: Industrielle Einsatzgebiete von Corynebakterien.

Von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung ist die fermentative Herstellung von essentiellen Aminosäuren und Vitaminen, die als Supplemente zur ernährungsphysiologischen Futtermittelaufwertung in großen Mengen in der Landwirtschaft benötigt werden; darunter insbesondere Lysin und Threonin (Kircher, 1998; Pühler, 1995). Auch in der Lebensmittelindustrie werden Aminosäuren und Vitamine als Geschmacksverstärker (L-Glutamat, DL-Alanin), Süßstoff (L-Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester = Aspartam) oder als Antioxidantien (L-Cystein, L-Tryptophan, L-Histidin und Vitamin C) eingesetzt. *C. glutamicum* sekretiert zudem keine Proteine mit hydrolytischer enzymatischer Aktivität wie Nukleasen, Glukanasen oder Proteasen. Dies macht das Bakterium zu einem geeigneten Wirt für die Produktion heterologer Exoenzyme. Ein weiterer Vorteil der Produktion von heterologen Exoproteinen in *C. glutamicum* liegt darin, dass Corynebakterien keine Protease in das Kulturmedium sekretieren, ganz im Gegensatz zu den klassischen Proteinproduzenten *Bacillus*, *Streptomyces* und *Streptococcus* (Priest, 1977). Dies verhindert, dass die sekretierten Proteine durch endogene Proteasen sofort wieder abgebaut werden. Zudem ist keine der durch *C. glutamicum* sekretierten Substanzen toxisch.

Ein weiterer positiver Effekt ist, dass die biotechnologisch interessanten Vertreter der Corynebakterien als GRAS-Spezies (*Generally Regarded As Safe*) eingestuft sind und somit der Nahrungskette zugeführt werden dürfen.

Wie bereits erwähnt, ist *C. glutamicum* durch seine natürliche Fähigkeit L-Glutamat zu produzieren, nicht nur von wissenschaftlicher sondern auch von wirtschaftlichem Interesse. Aufgrund dessen wurden wirtschaftlich nutzbare Produktionsverfahren entwickelt, um mit gentechnisch veränderten Stämmen von *C. glutamicum* L-Lysin (Cremer *et al.*, 1988), L-Aspartat oder L-Tryptophan (Ikeda *et al.*, 1994) herstellen zu können. Zunächst wurden die Aminosäure-Produktionsstämme durch ungerichtete Mutation und Selektion auf eine Überproduktion von Aminosäuren hin entwickelt. In den letzten Jahren gelang es, durch gentechnische Verfahren Eingriffe in die Stoffwechselwege zu etablieren, die zu einer Steigerung der Aminosäurenproduktion führten. Um weitere und effektivere Produktionsstämme herstellen zu können, wurde es weiterhin notwendig, das Genom von *C. glutamicum* zu sequenzieren. Mittels der gewonnenen Erkenntnisse über die DNA-Sequenz konnten weitreichende Regulationsnetzwerke in der Aminosäureproduktion erkannt und verändert werden.

1.3 *Corynebacterium glutamicum* im Zeitalter der *functional genomics*

Der Entwicklung immer leistungsfähigerer Sequenziermethoden und der damit einhergehenden Entschlüsselung einer immer größeren Menge von Genomen sowie den Fortschritten auf dem Gebiet der Bioinformatik ist es zu verdanken, dass heute Einschätzungen der Funktion unbekannter Gene oder die gezielte Suche nach an speziellen Biosynthesewegen beteiligten Genen mit Hilfe bioinformatischer Methoden möglich ist. Dies geschieht in der Regel durch Ähnlichkeitssuchen auf DNA- oder Aminosäuresequenzebene mittels Programmen wie BLAST (Altschul *et al.*, 1997) oder FASTA (Pearson, 2000). Dabei werden Vergleiche mit öffentlich zugänglichen Datenbanken (z.B. EMBL; Swiss Prot) vorgenommen, in denen die DNA- oder Aminosäuresequenzen bereits erforschter Gene einer Vielzahl von Organismen hinterlegt sind.

Das Ende der 90er Jahre vom Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld in Zusammenarbeit mit der Degussa AG initiierte „*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032-Genomprojekt“ hatte die vollständige Entschlüsselung des *C. glutamicum*-Genoms zum Ziel. Die Genomgröße von *C. glutamicum* ATCC 13032 konnte zunächst auf 3.28 Mb festgelegt

werden (Tauch *et al.*, 2002). Nachdem die Sequenz des Genoms bekannt war, erfolgte die Einteilung in kodierende und nicht kodierende Bereiche sowie eine Funktionszuweisung, die Annotation. Die Annotation des Genoms wurde am Lehrstuhl für Genetik mit dem Programm GenDB (Meyer *et al.*, 2003) vorgenommen und ist in der EMBL-Datenbank veröffentlicht (Kalinowski *et al.*, 2003).

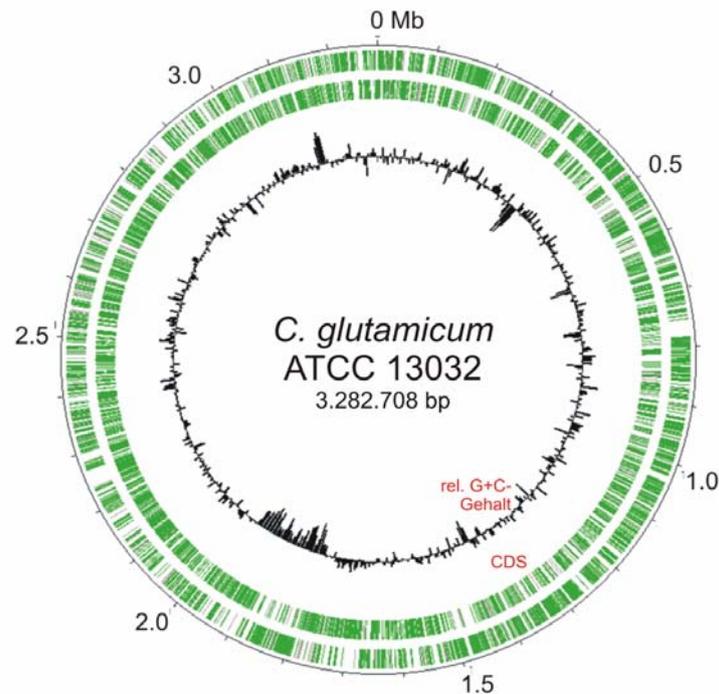


Abb.II. 1: Darstellung des zirkulären *C. glutamicum* ATCC 13032-Chromosoms. Die Kodiersequenzen (CDS) des Hin- und Rückstrangs sind grün hervorgehoben. Abweichungen vom durchschnittlichen G+C-Gehalt sind durch Balken dargestellt. Nach innen weisende Balken zeigen dabei einen niedrigeren, nach außen weisende Balken einen höheren G+C-Gehalt an (Kalinowski *et al.*, 2003).

Dieses Wissen eröffnet gleichzeitig ganz neue Wege zur globalen Analyse der komplexen Vorgänge in einer Zelle (*functional genomics*), wobei die Gesamtheit der RNA (*transcriptomics*) und der Proteine (*proteomics*) in einer Zelle untersucht werden. Die *Transcriptomic* untersucht dabei die Gesamtheit der mRNA, das Transkriptom. Dies kann durch einen Gesamt-Genom-Mikroarray auch für *C. glutamicum* untersucht werden (Hüser *et al.*, 2003). Die *Proteomic* untersucht die Gesamtheit aller Proteine, das Proteom. Dieser Name wurde in Analogie zum Genom, der Gesamtheit aller Gene, gewählt. Das Proteom umfasst die in einer Zelle exprimierten Proteine, die z.B. mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht werden können.

Ausgehend von diesen Analysemöglichkeiten auf dem Weg vom Gen zum Phänotyp ist der erste Schritt zur Verbesserung aminosäureproduzierender Stämme die Aufdeckung der

Transkriptionsregulation als ausführendes Element im Zellgeschehen. Eine Protein-Familie, die als eine der wichtigsten Transkriptionsregulatoren fungierten, sind die Sigmafaktoren.

2 Sigmafaktoren bei Bakterien

Die Genome von Bakterien kodieren durchschnittlich viele tausend unterschiedliche Proteine, die sowohl für die normale Zellfunktion, als auch für die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen notwendig sind. Die Zelle ist in der Lage, durch Regulation der Genexpression die Produktion der einzelnen Proteine zu kontrollieren (Wösten, 1998).

Den ersten Schritt in der Genregulation stellt die Einleitung der Transkription dar, wobei die DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) das Schlüsselenzym ist. Die RNA-Polymerase besteht aus sechs Untereinheiten. Dieses so genannte Holoenzym hat dabei die Untereinheiten $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ und ist spezifisch für die Initiation der Transkription (Burgess *et al.*, 1969; Travers & Burgess, 1969). Die RNA-Polymerase ohne die σ -Untereinheit wird als *core*-Enzym bezeichnet (Lonetto *et al.*, 1992). Das *core*-Enzym stellt dabei den katalytischen Mechanismus für die DNA-abhängige Synthese von RNA-Transkripten dar (Polyakov *et al.*, 1995).

Die zwei α -Untereinheiten halten die Struktur des Enzyms zusammen. Dabei bildet sich zuerst ein Dimer aus den beiden α -Untereinheiten, an das sich nacheinander die β -Untereinheit und die β' -Untereinheit anlagern. Die β' -Untereinheit bindet die DNA-Matrize und die β -Untereinheit die Ribonukleosidtriphosphatsubstrate. Die ω -Untereinheit bildet eine spezifische Interaktion mit der β' -Untereinheit aus und erhöht so die Stabilität. Des weiteren unterstützt die ω -Untereinheit die Bindung der β' -Untereinheit an das *core*-Enzym (Ghosh *et al.*, 2001; Minakhin *et al.*, 2001). Die σ -Untereinheit, die auch Sigmafaktor genannt wird, ist für die Einleitung der Transkription relevant. Bei den Sigmafaktoren handelt es sich um eine Familie von relativ kleinen Proteinen, die mit dem *core*-Enzym assoziieren.

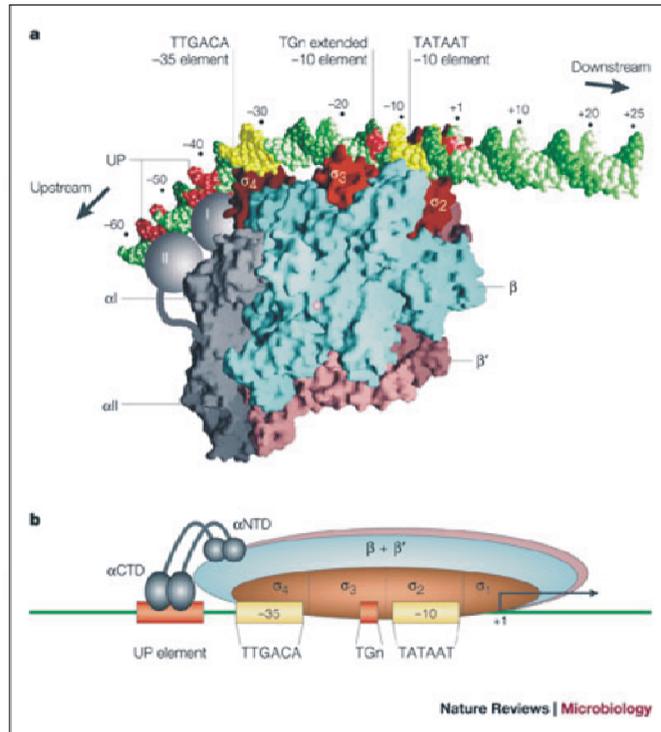


Abb. II. 2: Darstellung des RNA-Polymerase-Holoenzym. A: Kristallstruktur B: Schematische Darstellung aus (Browning & Busby, 2004).

Die Einleitung der Transkription beginnt mit der Bindung des RNAP-Holoenzym an den Promotor. Dabei ist die σ -Untereinheit des RNAP-Holoenzym für die Erkennung der Promotorsequenz zuständig (Fassler & Gussin, 1996; Gross, 1992; Record, 1996). Die Häufigkeit, mit der das RNAP-Holoenzym die Transkription initiiert, hängt von der Promotor-Sequenz und der DNA-Konformation in der Promotor-Region ab. Promotoren prokaryotischer Gene sind vor allem in zwei Regionen besonders stark konserviert (Harley & Reynolds, 1987). Eine Region liegt etwa 35 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstarts. Da nach Übereinkunft die erste transkribierte Base mit +1 numeriert wird, bezeichnet man diese Region als -35-Region. Die zweite konservierte Region, die -10-Region oder Pribnow- bzw. TATA-Box, liegt 10 Basen vor dem Transkriptionsstart. Zwischen diesen beiden Regionen, die jeweils aus Hexanukleotidsequenzen bestehen, liegt ein nicht konservierter Sequenzbereich („*Spacer*“), dessen Größe zwischen 16 und 18 Nukleotiden variiert. Die Konsensus-Promotorsequenz des σ^{70} -Faktors aus *E. coli* besteht aus zwei Motiven mit jeweils sechs Nukleotiden, TTGACA (-35) und TATAAT (-10) (Dombroski *et al.*, 1992; Moyle *et al.*, 1991; Voskuil *et al.*, 1995). Abweichungen in der Promotor-Konsensussequenz spiegeln sich in einer verminderten Promotor-Aktivität wider.

Nachdem das RNAP-Holoenzym an den Promotor gebunden hat, bildet sich ein so genannter „geschlossener Komplex“ aus. Dieser geht in einen „offenen Komplex“ über, sobald eine

12 Basenpaare große DNA-Region „schmilzt“, an die das Enzym gebunden ist. Anschließend beginnt das RNAP-Holoenzym mit der Synthese von kleinen RNA-Molekülen (2-12 bp), wobei es weiterhin an den Promotor gebunden bleibt. Es folgt die Abtrennung der σ -Untereinheit von dem RNAP-Holoenzym. Das *core*-Enzym bewegt sich entlang der Matrizen-DNA, wobei der RNA-Strang synthetisiert wird. Trifft die RNA-Polymerase auf einen Terminator in der mRNA, so kommt es zu einem Abbruch der Transkription.

Die meisten Bakterien sind in der Lage, verschiedene σ -Faktoren zu synthetisieren, dadurch können sie verschiedene Promotoren erkennen. Der σ^{54} -Faktor von *E. coli* erkennt zum Beispiel die Promotor-Regionen -24 und -12 (Merrick, 1993). Dabei handelt es sich um Promotor-Sequenzen mit konservierten GC und GG Elementen (Thöny & Hennecke, 1989).

Diese Vielfalt an σ -Faktoren ermöglicht es den Bakterien, die Genexpression an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Wösten, 1998). Dabei unterscheidet man zwischen dem Hauptsigmafaktor, der für die Expression der *Houskeeping*-Gene verantwortlich ist und den anderen Sigmafaktoren, die nach Stressinduktion oder während verschiedener Entwicklungsstadien die Aufgabe des Hauptsigmafaktors übernehmen. Bei den *Houskeeping*-Genen handelt es sich um Gene, die für Enzyme kodieren, die Schritte in zentralen Stoffwechselwegen katalysieren und Proteine des Cytoskeletts darstellen. Welcher der verschiedene Sigmafaktoren eine Bindung mit dem *core*-Enzym eingeht, ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Sigmafaktors und der Anzahl des *core*-Enzyms. Das *core*-Enzym liegt mit einer Stückzahl von 1500-2000 Molekülen pro Zelle vor, wovon ein Großteil nicht zur freien Verfügung steht, sondern in die Transkription involviert ist (Jishage & Ishihama, 1995). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Sigmafaktor an das *core*-Enzym bindet, steigt mit der Anzahl der vorhandenen Sigmafaktoren.

2.1. Die zwei Familien der bakteriellen Sigma-Faktoren, σ^{54} und σ^{70}

Die bakteriellen σ -Faktoren werden in zwei große Familien unterteilt, deren Aminosäuresequenzen nur eine geringe Homologie zueinander aufweisen (Merrick, 1993; Sasse-Dwight & Gralla, 1990).

Die σ^{70} -Familie, zu der die meisten Sigma-Faktoren gehören, wurden nach dem 70 kDa großen Haupt- σ -Faktor aus *E. coli* benannt (Lonetto *et al.*, 1992). Die σ^{54} -Familie wurde nach einem 54 kDa großen σ -Faktor aus *E. coli* bezeichnet, der für die Stickstoffregulation zuständig ist (Merrick, 1993).

2. Die σ^{54} -Familie

Die σ^{54} -Familie unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell von der σ^{70} -Familie. Durch einen Homologievergleich zwischen bekannten σ^{54} -Proteinen konnten drei hoch konservierte Regionen identifiziert werden. (Abb.II.3)

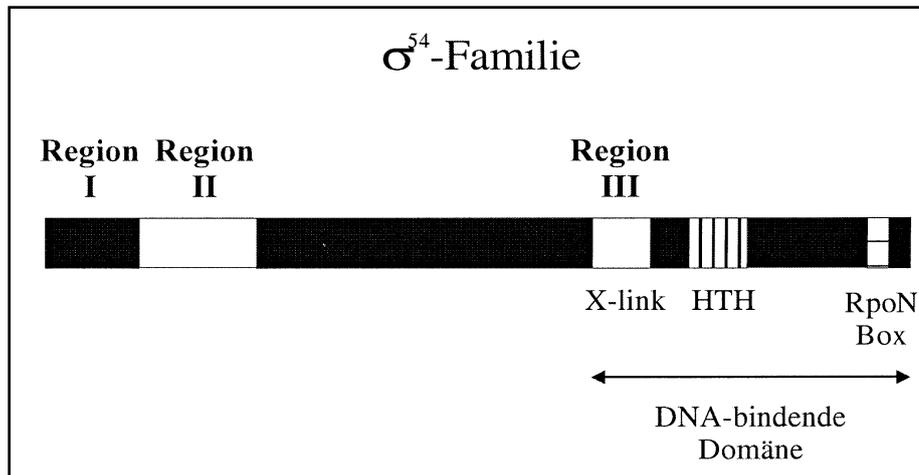


Abb. II. 3: Schematische Darstellung eines σ -Faktors der σ^{54} -Familie (Merrick *et al.*, 1987)

Die Region I umfasst 25 bis 50 Aminosäuren und ist sehr reich an Glutaminresten. Es folgt eine variable Region, die 60 bis 110 Aminosäuren umfasst und als Region II bezeichnet wird. Diese Region besteht vorwiegend aus sauren Aminosäurenresten. Die carboxyterminale Region III ist etwa 400 Aminosäuren lang und beinhaltet ein potentiell helix-turn-helix-Motiv sowie zehn konservierte Aminosäuren, die als „RpoN box“ bekannt sind (Merrick, 1993).

Die Einleitung der Transkription mit einem σ^{54} -abhängigen Promotor ist unterschiedlich im Vergleich zu einem σ^{70} -abhängigen Promotor. So erkennen die σ -Faktoren, die zu der σ^{54} -Familie gehören, die -24 und -12 Promotor-Regionen. Außerdem findet die Transkription von einem σ^{54} -Promotor nur in Anwesenheit eines Aktivators statt, das heißt, dass ein σ^{54} -Holoenzym zwar einen geschlossenen Komplex bilden kann, dieser aber nur in Anwesenheit eines Aktivatorproteins in den offenen Komplex übergeht (Popham *et al.*, 1989; Sasse-Dwight & Gralla, 1990). Somit regulieren die Aktivatorproteine, ausgehend von den Umweltbedingungen und den metabolischen Änderungen, die Genexpression von σ^{54} -abhängigen Promotoren (Merrick, 1993).

Die Untereinheit 1.2 ist für die Formation des offenen Komplexes wichtig (Wilson & Dombroski, 1997). Eine Deletion in dieser Region verhindert, dass das *core*-Enzym über den geschlossenen Komplex hinaus fortschreitet. Mit Ausnahme des *extracytoplasmic function* (ECF)-Typs der σ -Faktoren wurde diese Region bei allen σ -Faktoren der σ^{70} -Familie identifiziert.

Die Region 2 ist unter den verschiedenen Bakterienspezies am stärksten konserviert. Sie lässt sich in die Untereinheiten 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 und 2.5 unterteilen. Die Untereinheit 2.1 ist für die Interaktion des Sigmafaktors mit den Untereinheiten des *core*-Enzyms verantwortlich (Wösten, 1998). Die Region 2.2 ist die am stärksten konservierte Region unter allen Sigmafaktoren der σ^{70} -Familie, ihre Funktion ist bisher jedoch nicht bekannt. Die Untereinheit 2.3 ist für das Öffnen (Schmelzen) der DNA verantwortlich. Dies geht aus Sequenzhomologien zu einer großen Familie von eukaryotischen RNA-bindenden Proteinen hervor, speziell wegen der Anwesenheit einer großen Anzahl von aromatischen Resten (Helmann & Chamberlin, 1988). Die Untereinheit 2.4 ist zuständig für das Erkennen des -10 -Promotor-Bereiches. Dieser liegt 10 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (Harley & Reynolds, 1987). Mutationen in der Region 2.4 bewirken, dass der -10 -Promotor-Bereich nicht mehr erkannt wird (Siegele *et al.*, 1989; Waldburger *et al.*, 1990; Zuber *et al.*, 1989). Die Region 2.4 ist unter der Gruppe der Haupt- σ -Faktoren sehr hoch konserviert. Unter den alternativen σ -Faktoren, die unterschiedliche -10 -Sequenzen erkennen, ist diese weniger stark konserviert (Lonetto *et al.*, 1992). In *E. coli* wurde eine weitere Region, die Region 2.5 entdeckt, die den Kontakt mit den Nukleotiden an den Positionen -14 und -15 des Promotors initiiert (Barne *et al.*, 1997). In *Bacillus subtilis* ist diese Region als -16 -Promotor-Konsensus-Sequenz bekannt (Voskuil *et al.*, 1995).

Die Regionen 3 und 4 werden jeweils in zwei Bereiche unterteilt. Der Bereich 3.1 weist Ähnlichkeiten zu einem helix-turn-helix-Motiv DNA-bindender Proteine auf (Helmann & Chamberlin, 1988). Ein helix-turn-helix-Motiv besteht aus zwei kurzen α -helikalen Segmenten, welche durch eine definierte Drehung verbunden sind. Die erste Helix, die Erkennungshelix, enthält Seitenketten, die mit der großen Furche der DNA durch Wasserstoffbrückenbindungen in Wechselwirkung treten. Die zweite Helix liegt quer zur Erkennungshelix und stabilisiert so den Protein-DNA-Kontakt. Für die Region 3.2 wird angenommen, dass sie für die Bindung der σ^{70} -Faktors an das *core*-Enzym verantwortlich ist (Zhou *et al.*, 1992). Dagegen wird für die Region 4.1 postuliert (Lonetto *et al.*, 1992), dass sie während der Einleitung der Transkription transkriptionelle Aktivatoren bindet (Kuldell & Hochschild, 1994; Li *et al.*, 1994), während die Region 4.2 für die Erkennung der -35 -Region

zuständig ist. Mutationen in diesem Bereich haben gezeigt, dass das RNAP-Holoenzym nicht mehr in der Lage ist, die -35 -Promotorregion zu erkennen (Dombroski *et al.*, 1993; Gardella *et al.*, 1989; Harley & Reynolds, 1987; Siegele *et al.*, 1989).

2.3.1 Haupt- σ -Faktoren

Die σ^{70} -Faktoren, bei Gram-positiven Organismen als σ^A bekannt, gehören zu der Gruppe der Haupt- σ -Faktoren. Sie sind verantwortlich für die Regulation der Genexpression während des exponentiellen Wachstums der Zellkultur und sind somit essentiell für das Überleben der Bakterien unter Standard-Kulturbedingungen (Wösten, 1998). Es wird angenommen, dass in jeder bakteriellen Spezies nur ein Haupt- σ -Faktor auftritt (Gruber & Bryant, 1997). So wird der Haupt- σ -Faktor in *E. coli* von *rpoD* (σ^{70}) kodiert (Helmann & Chamberlin, 1988). In *Mycobacterium* ist er als MysA, in *Streptomyces* als HrdB und in *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien als SigA bekannt (Gruber & Bryant, 1997).

Es hat sich herausgestellt, dass die Promotor-Konsensussequenzen, die von den Haupt- σ -Faktoren von *E. coli* und *B. subtilis* erkannt werden, Ähnlichkeit zu denen von anderen Eubakterien aufweisen (Helmann, 1995; Patek *et al.*, 1996). Dennoch gibt es bakterielle Promotoren, die den -35 -Promoter-Bereich nicht besitzen, dafür aber über einen ausgedehnten -10 -Bereich verfügen, der von dem σ^{70} -Faktor erkannt wird (Dombroski *et al.*, 1993; Keilty & Rosenberg, 1987; Kumar *et al.*, 1993).

2.3.2 Nicht-essentielle σ -Faktoren

Die σ -Faktoren aus dieser Gruppe sind nicht essentiell für das exponentielle Wachstum von Bakterien, obwohl sie eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu den Haupt- σ -Faktoren aufweisen (Lonetto *et al.*, 1992). Es wird postuliert, dass beide Gruppen ähnliche Promotoren erkennen. Die *Enterobacteriaceae*, die *Cyanobactericaea* sowie die Gram-positiven Bakterien mit hohem G-C-Gehalt besitzen diese σ -Faktoren (Gruber & Bryant, 1997).

Die Gruppe der nicht-essentiellen σ -Faktoren wird erneut in drei weitere Klassen unterteilt.

Die erste enthält σ -Faktoren, die erst transkribiert werden, wenn die Bakterien bei ungünstigen Umweltbedingungen in die stationäre Phase eintreten. Dabei ist die Synthese von Stressproteinen ein charakteristisches Merkmal (Hengge-Aronis, 1996). Der bekannteste Sigmafaktor in dieser Untereinheit ist σ^S , der von dem *rpoS*-Gen kodiert wird und bei den

Eubakterien vorkommt (Gruber & Bryant, 1997; Loewen & Hengge-Aronis, 1994). Dabei spielt σ^S nicht nur eine Rolle beim Eintritt der Zellen in die stationäre Phase, sondern dient auch als lokaler Regulator der Genexpression von Zellen, die hyperosmotischem oder saurem Stress ausgesetzt sind. Dabei wird die zelluläre Konzentration von σ^S in *E. coli* sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene reguliert (Takayanagi *et al.*, 1994).

Die zweite Klasse setzt sich aus cyanobakteriellen σ -Faktoren zusammen. Dazu gehören SigB und SigC aus *Anabaena sp.*, die bei Stickstoffmangel exprimiert werden (Brahamsa & Haselkorn, 1992). In *Synechococcus sp.* werden die Gene *sigB* und *sigC* bei Stickstoff- und Kohlenstoffmangel exprimiert (Caslake *et al.*, 1997).

Zu der letzten Untergruppe der nicht-essentiellen Sigmafaktoren gehören die, die bei Gram-positiven Bakterien mit hohem G-C-Gehalt der DNA anzutreffen sind. Hierzu zählen HrdA, HrdC, HrdD und HrdE aus *Streptomyces spp.* (Wösten, 1998). Das Gen *hrdD* wird in exponentiell wachsenden Zellen exprimiert. Der daraus entstehende Sigmafaktor erkennt die Promotoren der Gene *redD* und *actII-orf4*. Diese Gene regulieren die Antibiotikumsynthese (Fujii *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1997). In *Mycobacterium tuberculosis* wird diese Gruppe der Sigmafaktoren durch SigB repräsentiert und ist an der Antwort nach SDS- Hitze- und oxidativem Stress beteiligt (Manganelli *et al.*, 1999). Die Untereinheiten 2.4 und 4.2, die für die Erkennung der -10 und -35 Region verantwortlich sind, ähneln den Regionen von SigA so sehr, dass beide Sigmafaktoren ähnliche Promotor-Konsensussequenzen erkennen (Doukhan *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2003).

2.3.3 Die alternativen σ -Faktoren

Die σ -Faktoren in dieser Gruppe werden für die koordinierte Transkription von großen Gruppen von Genen oder Regulons benutzt. Ihre Aktivierung ermöglicht den Bakterien, auf wechselnde Umweltbedingungen schnell reagieren zu können.

Diese Gruppe wird nochmals in 4 Klassen unterteilt:

- die flagellaren σ -Faktoren
- die *extracytoplasmic function* (ECF) σ -Faktoren
- die Hitzeschock- σ -Faktoren
- die bei der Sporulation beteiligten σ -Faktoren

Die erste Untergruppe setzt sich aus den flagellaren σ -Faktoren zusammen, die für die Expression von Proteinen von Bedeutung sind, die an der Ausbildung des Flagellums

verantwortlich sind (Helmann & Chamberlin, 1988). Viele bewegliche Bakterien besitzen ein Flagellum, das die Zelle befähigt, sich selbständig fortzubewegen. Bei *E. coli* und *Salmonella typhimurium* sind mehrere Sigmafaktoren bekannt, die die Expression der Gene regulieren die an der Ausbildung des Flagellums beteiligt sind (Macnab, 1996).

Zu der zweiten Untergruppe, der Gruppe der ECF- σ -Faktoren, gehören σ -Faktoren, die die Genexpression in Abhängigkeit von Ereignissen, die im extracytoplasmatischen Raum stattfinden, regulieren. Zum Beispiel wird die Expression von Genen für extrazelluläre oder an Membran assoziierte Proteine durch ECF- σ -Faktoren reguliert (Lonetto *et al.*, 1994).

Ein Beispiel für einen ECF- σ -Faktor ist AlgU, welcher die Biosynthese von Alginat in *Pseudomonas aeruginosa* reguliert (Martin *et al.*, 1993a; Martin *et al.*, 1993b). Alginat ist ein viskoses Polysaccharid, welches das Bakterium vor der ungünstigen Umgebung einer mit cystischen Fibrose befallenen Lunge schützen soll (Xie *et al.*, 1996). Die Expression des ECF-Sigmafaktor-Gens *sigE* bei *E. coli* wird erst induziert, wenn Proteine, die mit der äußeren Membran assoziieren, nicht richtig gefaltet sind. Das Signal für diese Induktion kann durch die Anhäufung der nicht korrekt gefalteten Proteine im Periplasma oder in der äußeren Membran erfolgen (Mecsas *et al.*, 1993). Dieses sind nur einige Beispiele der ECF-Typ- σ -Faktoren, die für eine Vielzahl verschiedener Funktionen benötigt werden.

Die dritte Untergruppe der alternativen σ -Faktoren setzt sich aus den Hitzeschock- σ -Faktoren zusammen. Wenn Bakterien hohen Temperaturen oder anderen Stressfaktoren ausgesetzt sind, wie z.B. Ethanol, Schwermetallen oder Wasserstoffperoxid, können so genannte Hitzeschock-Proteine gebildet werden (Gross, 1996). Diese Hitzeschock-Proteine spielen bei der Prävention und Reparatur von Protein-Denaturierungen und Protein-Aggregationen eine wichtige Rolle (Wu, 1995). In *E. coli* wird die Antwort auf einen Hitzeschock durch das positive Regulatorprotein σ^{32} bewirkt (Yura *et al.*, 1993). Der Sigma-Faktor σ^{32} wird bei *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien von *rpoH* kodiert. Die Transkription des Gens *rpoH* ist wiederum bei *E. coli* von σ^{70} und einem zweiten Hitzeschock- σ -Faktor σ^E abhängig (Nakahigashi *et al.*, 1995; Narberhaus *et al.*, 1997; Yura *et al.*, 1993).

Die letzte Untergruppe enthält die an der Sporulation beteiligten Sigmafaktoren. Manche Bakterien reagieren auf starke Stressoren mit der Bildung von Sporen. In diesem Zustand sind die Zellen resistenter gegenüber Stresseinwirkungen, da die Stoffwechsellistung stark verringert wird. Zu diesen Bakterien gehören *Bacillus*, *Clostridium* und *Streptomyces*. In *B. subtilis* wird die Sporulation durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk kontrolliert. Dieses Netzwerk beinhaltet fünf Sigmafaktoren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Sporulation verstärkt exprimiert werden. Bei *B. subtilis* wird die Sporulation durch eine hohe

Zelldichte und Nahrungsmangel induziert (Errington, 1993; Grossman, 1995). Bei *Streptomyces sp.* sind nur zwei Sigmafaktoren an der Sporulation beteiligt.

2.4 Die Sigmafaktoren von *Corynebacterium glutamicum*

In „*Brevibacterium lactofermentum*“ und „*Brevibacterium flavum*“, bei denen es sich um verwandte Spezies von *Corynebacterium glutamicum* handelt, konnten sieben Gene identifiziert werden, die für Sigmafaktoren kodieren (Engels *et al.*, 2004). Diese Sigmafaktoren ließen sich in die drei Gruppen der essentiellen-, nicht-essentiellen- und alternativen (ECF-) Sigmafaktoren unterteilen.

In die Gruppe der ECF-Sigmafaktoren ließen sich fünf Gene zuordnen, deren Name aufgrund der höchsten Homologie zu bekannten Sigmafaktoren vergeben wurde.

CDS	Protein	Organismus	e-Value	GenBank
<i>cg0309</i>	SigC	<i>M. tuberculosis</i>	$3e^{-39}$	AL123456
<i>cg0696</i>	SigD	<i>S. coelicolor</i>	$4e^{-36}$	O86843
<i>cg1271</i>	SigE	<i>M. tuberculosis</i>	$9e^{-72}$	AL123456
<i>cg0877</i>	SigH	<i>M. tuberculosis</i>	$9e^{-71}$	AL123456
<i>cg3420</i>	SigM	<i>S. coelicolor</i>	$1e^{-114}$	O06289

Tabelle II.1: Durch Protein-Homologievergleiche mittels BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) detektierte Sigmafaktoren in *C. glutamicum*. (M = *Mycobacterium*. S = *Streptomyces*)

Die beiden anderen Gene konnten in die Gruppe des essentiellen Sigmafaktors (SigA) und des nicht-essentiellen Sigmafaktors (SigB) unterteilt werden (Oguiza *et al.*, 1996). Dafür wurden Sequenzvergleiche zwischen den beiden Genen mit bereits bekannten Haupt-Sigmafaktoren, aus anderen Organismen durchgeführt. Sowohl die konservierten Regionen des SigA- als auch die des SigB-Proteins konnten so ermittelt werden (Oguiza *et al.*, 1996).

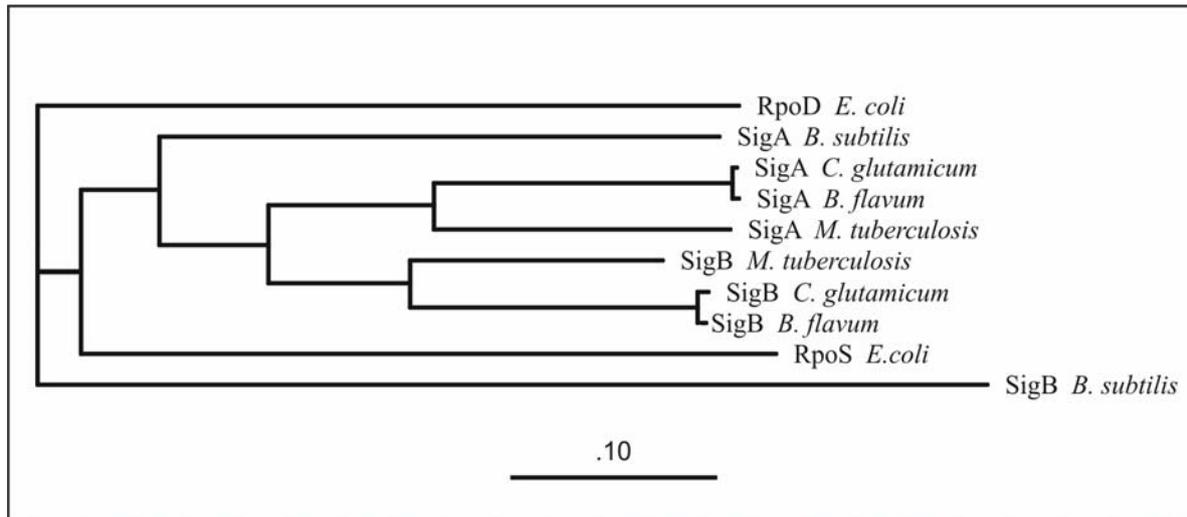


Abb. IV.5: Dendrogramm des multiplen Alignment von SigA und SigB aus *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *E. coli*, *M. tuberculosis* und *B. flavum*

In Bezug auf die phylogenetische Klassifizierung von SigA und SigB ließen sich die beiden Sigmafaktoren in die beiden Klassen des essentiellen- und des nicht-essentiellen-Sigmafaktors unterteilen (Abb.IV.5).

Betrachtet man die Aminosäuresequenz beider Sigmafaktoren und vergleicht diese durch ein multiples Alignment, so lassen sich die konservierten Regionen identifizieren, die typisch für Sigmafaktoren der σ^{70} -Familie sind (Abb. IV.6).

Die beiden Sigmafaktoren lassen sich innerhalb der Region 1.1 unterscheiden. Diese ist innerhalb der essentiellen Sigmafaktoren stark ausgeprägt und vermittelt die Bindung des Sigmafaktors an die RNA-Polymerase. In der Gruppe der nicht-essentiellen Sigmafaktoren ist diese Gruppe nur verkürzt vorhanden. Durch diesen Unterschied innerhalb beider Sigmafaktor-Klassen lassen sich beide Sigmafaktoren von einander unterscheiden.

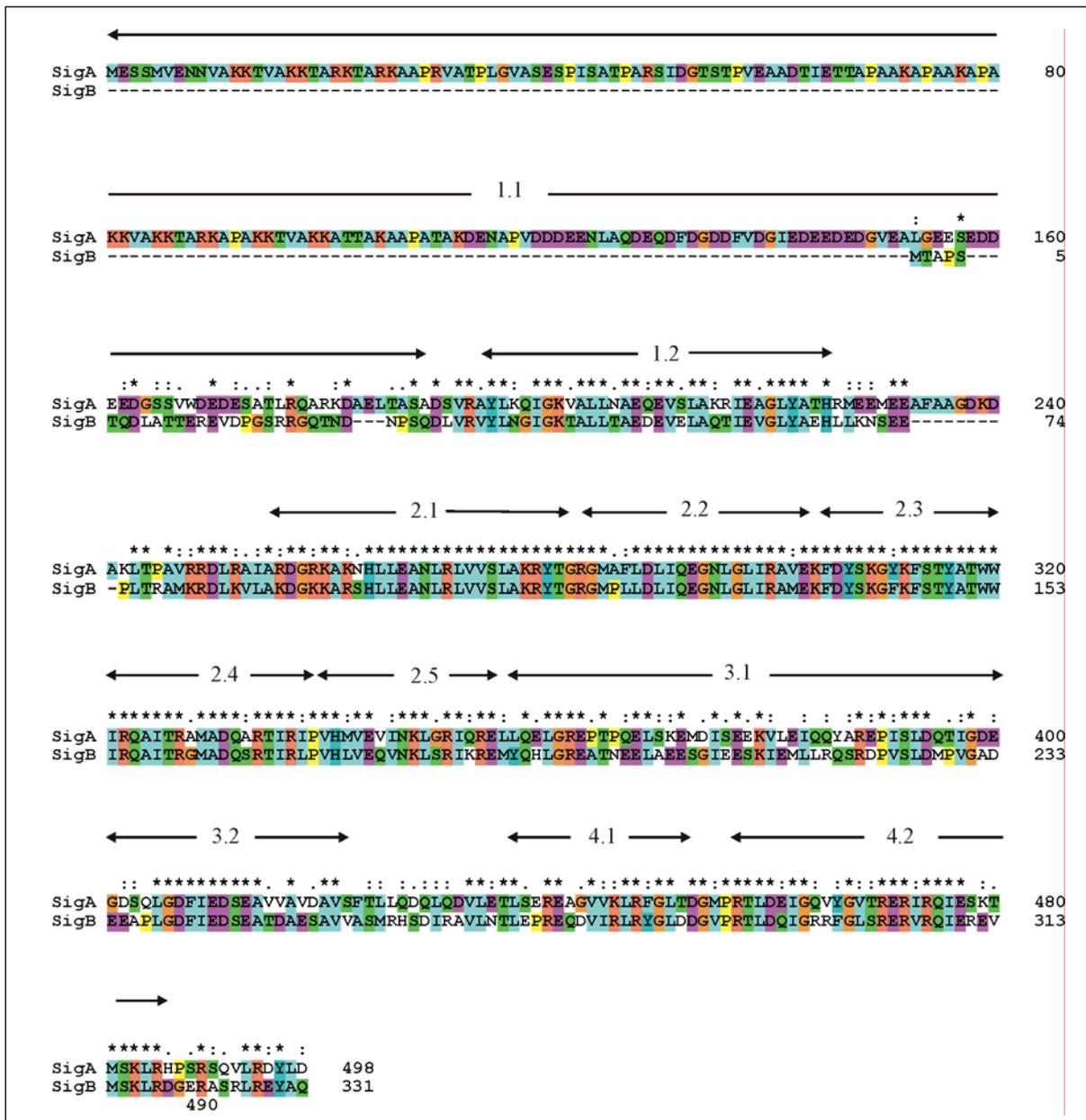


Abb. IV.6: Homologievergleich der Aminosäuresequenz von SigA und SigB aus *C. glutamicum*. Die konservierten Regionen der σ^{70} -Sigmafaktoren wurden mittels Pfeilen dargestellt.

Durch weitere Arbeiten konnte für den essentiellen Sigmafaktor gezeigt werden, dass die Expression während der exponentiellen Wachstumsphase (Halgasova *et al.*, 2001) und die Initiation der Transkription der *Houskeeping*-Gene über eine SigA spezifische Promotorsequenz erfolgt. Diese Konsensus-Promotorsequenz, die von SigA erkannt wird, lautet ttGcca-N_{16/17}-tgngnTA(c/t)aaTgg (Patek *et al.*, 1996).

Der Sigmafaktor SigB, der in die Gruppe 2.3 der nicht-essentiellen Sigmafaktoren eingeordnet werden kann, unterscheidet sich hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz deutlich in der Region 1.1 innerhalb der Sequenz von SigA (Oguiza *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt

werden, dass die Funktion dieses Sigmafaktors in der Antwort nach Säure-, Ethanol-, Kälte- und Hitzestress liegt (Halgasova *et al.*, 2002). Eine Deletion innerhalb des *sigB*-Gens zeigte Veränderungen im Phänotyp hinsichtlich des Wachstumsverhaltens im Schüttelkolben, im Vergleich zum Wildtyp (Halgasova *et al.*, 2002).

3 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des nicht-essentiellen Sigmafaktors SigB und seines Regulons in *C. glutamicum*.

Hierfür sollte zunächst eine Deletionsmutante erstellt werden, um anhand des Phänotyps Aussagen über die Funktion machen zu können. Für die weiteren Charakterisierungen wurden verschiedene Stresse appliziert, wobei Hitze, Kälte, Ethanol, Säure, Sauerstoffmangel, oxidativer Stress (H₂O₂), Eisenmangel und Glukosemangel als Stress getestet wurden. Die jeweilige Auswirkung des Stresses auf das Bakterium sollten zum einen auf Transkriptionsebene und zum anderen durch Wachstums- und Lebendtitertests verifiziert werden.

Zur weiteren Charakterisierung des Sigmafaktors SigB sollte seine Beteiligung an der Wachstumsphasenregulation festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurde zum einen ein SigB-Überexpressionsstamm generiert und zum anderen das Transkriptom des Wildtyps während der exponentiellen Phase mit dem aus der stationären Phase mittels Gesamt-Genom-Microarrays verglichen.

III. Material und Methoden

1 Bakterienstämme und Plasmide

1.1 Bakterienstämme

Tabelle III.1: Verwendete Stämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
RES167	restriktionsdefekter <i>C. glutamicum</i> -Stamm $\Delta(cglIM-cglIR-cglIIR)$, Nx^r	(Tauch <i>et al.</i> , 1995)
CL1	RES167 $\Delta sigB$, Nx^r	diese Arbeit
CL2	RES167 mit Plasmid pCL2, Nx^r	diese Arbeit
CL3	RES167 mit Plasmid pCL3, Nx^r	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α MCR	$F^- endA1 supE44 mcrA thi-1 hsdR17 \lambda^- recA1$ $gyrA96 relA1 deoR \Delta(lacZYA-argF)U169$ $(\Phi80dlacZ\Delta M15) \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
TOP10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ$ $\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-$ $leu) 7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG$	Invitrogen

1.2 Plasmide

Tabelle III.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
PCR-Blunt II	<i>E. coli</i> TOPO cloning Vektor	Invitrogen
pK18 <i>mobsacB</i>	mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor. <i>lacZα</i> , Km^r , <i>mcs sacB</i> -Gen	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pCL1	pK18 <i>mobsacB</i> mit zwei 0,7-kb flankierenden Sequenzbereiche der <i>sigB</i> Genregion	diese Arbeit
pBHK18	<i>broad host</i> Vektor mit pNG2 Replikon	(Serwold-Davis <i>et al.</i> , 1990)
pCL2	pBHK18 mit dem IPTG induzierbaren P_{trc} Promotor von pEC-XK99E, <i>sigB</i> -Gen downstream des Promoters	diese Arbeit
pCL3	pBHK18 mit dem IPTG induzierbaren P_{trc} Promotor von pEC-XK99E.	diese Arbeit

1.3 Verwendete Primer

Die aufgelisteten Primer sind in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen.

Tabelle III.2: Tabelle aller verwendeten Primer

Primer	Sequenz
<i>sigB</i> -del-1	5' GATGTAGAATTCATTGCGGCGTTGGTGGATCT 3'
<i>sigB</i> -del-2	5' GGATATCGGAGTGGCGCATGCTGTCATAACTGGCCTCCTA 3'
<i>sigB</i> -del-3	5' CATGCGCCACTCCGATATCC 3'
<i>sigB</i> -del-4	5'GATCTACTGCAGGTGCACAAGACCGTCGCGTT 3'
<i>sigB</i> Üb-1	5'-GATGGTACC-GAACCTCTTGAACCGCGAAT-3'
<i>sigB</i> Üb-2	5'-GATTCTAGA-CCGACGCTTCGATTGTTAGT-3'
LC- <i>sigA</i> -1	5' GACTTCGACGGCGATGACTT 3'
LC- <i>sigA</i> -2	5' GGATACGGATGGTTCGTGCT 3'
LC- <i>sigB</i> -1	5' GAAGCCACCAATGAGGAACT 3'
LC- <i>sigB</i> -2	5' GTGGCCTCAGAATCCTCAAT 3'
LC- <i>cg0096</i> -1	5' CAGACACCCCGATCTTTCAT 3'
LC- <i>cg0096</i> -2	5' CGCCCTAGATAAGAGGAGTC 3'
LC- <i>cg0527</i> -1	5' GGGCGAAAATTCAGCAACC 3'
LC- <i>cg0527</i> -2	5' GAAGAGGCCAGCGATTTCTA 3'
LC- <i>cg0850</i> -1	5' AAGATTCAGCTGGGGACGTA 3'
LC- <i>cg0850</i> -2	5' AGAGACCACCCCAAATTCCA 3'
LC- <i>cg0878</i> -1	5' AGCGGTTGCAGACCATCTTT 3'
LC- <i>cg0878</i> -2	5' ACGAAGCAATCTGCCGTGAA 3'
LC- <i>cg1083</i> -1	5' TCTTGGCGGAGATTGCCTAA 3'
LC- <i>cg1083</i> -2	5' ACCAACCCGGTGAAGAAGAA 3'
LC- <i>cg1337</i> -1	5' AGCTGATCCAACCTGCAGA 3'
LC- <i>cg1337</i> -2	5' CTGTGCTGCCTCAATGTC 3'
LC- <i>cg1417</i> -1	5' ATTGGTTCGTCGCTCTACCC 3'
LC- <i>cg1417</i> -2	5' ATTCACCGAGGGGTTGATG 3'
LC- <i>cg1791</i> -1	5' TGCAGCAGCAGTCAACATCG 3'
LC- <i>cg1791</i> -2	5' GGTTGCGGAACCGGTGATAA 3'
LC- <i>cg2103</i> -1	5' GTATCTGCGCACTATTTAC 3'
LC- <i>cg2103</i> -2	5' AACTGCTCAAGATCTACCT 3'
LC- <i>cg2418</i> -1	5' CTGATTTACGGTGCCAACA 3'
LC- <i>cg2418</i> -2	5' AGCTAGTCACCCCTGAACTT 3'
LC- <i>cg2842</i> -1	5' TTCTACCTGCGCCAATGCTT 3'
LC- <i>cg2842</i> -2	5' AGGATCTGCCCAAGTACCAA 3'
LC- <i>cg3141</i> -1	5' TCGTTGTCGCGGTAGAAGAT 3'
LC- <i>cg3141</i> -1	5' CGGCGACCTGGTTCTTAACA 3'
LC- <i>cg3330</i> -1	5' TGAAAATCCGACGGCTGCTT 3'
LC- <i>cg3330</i> -2	5' ATCACGGGGTAAGGATCCAT 3'
<i>cg0097</i> _sp1	5' GCATCTTCCCAGAAAGGATGA 3'
<i>cg0097</i> _sp2	5' GGATGATTGGCAATCTCCTC 3'
<i>cg0097</i> _sp3	5' GACGTCGAAGGGTCCGTGAT 3'
<i>cg1083</i> _sp1	5' GCTACGATGCCAGGAAATA 3'
<i>cg1083</i> _sp2	5' CTGGTGTAGAGGGTGTACTT 3'
<i>cg1083</i> _sp3	5' CGGTAACCTGGGCTGGCCAAA 3'
<i>cg1417</i> _sp1	5' GTTTATTCGCGTGGTCAAGG 3'
<i>cg1417</i> _sp2	5' CCTGTTGCAGCGGAAATGAT 3'

<i>cg1417_sp3</i>	5' GGCTAGGCGGGTCAATTT 3'
<i>cg2418_sp1</i>	5' CCATGTGGTCGGTGAAGAAC 3'
<i>cg2418_sp2</i>	5' GCGGCAAGAATTCCTTCAG 3'
<i>cg2418_sp3</i>	5' CGGGTGACGTCGGATTTTCG 3'
<i>cg3141_sp1</i>	5' TTCTGCTGATCGCCTTGCTT 3'
<i>cg3141_sp2</i>	5' CAGCACATTTGCCATGATCC 3'
<i>cg3141_sp3</i>	5' CCGCTCCAAAACCTCAACG 3'
<i>cg3330_sp1</i>	5' GTGGGCATATCCCACTTTGT 3'
<i>cg3330_sp2</i>	5' TGGCGTAGCCTTCTTCAACA 3'
<i>cg3330_sp3</i>	5' GTGTCGACCATCGCTGGAAC 3'

2 Enzyme, Chemikalien und andere Materialien

2.1 Enzyme und Marker

100 Bp-DNA Leiter	MBBL
100 Bp-DNA Leiter, erweitert bis 5000 bp	MBBL
Benzonase	Roche
DNA Molecular Weight Marker	Boehringer
DNA score 1000 Marker	MBBL
DNase (RNase frei)	Qiagen / Sigma
Ligase	Roche / MBI Fermentas
Lysozym	Serva
<i>Taq</i> -Polymerase	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -Polymerase	MBI Fermentas
<i>Pwo</i> -Polymerase	Roche
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas / BioLabs
RNase	Roche
Superskript II RNase H Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Roche / MBI Fermentas

2.2 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Merck bezogen oder sind Bestandteil eines der unten aufgeführten Kits.

Acetonitril	Roth
Agar	Invitrogen
Agarose	PEQLAB
Aminoallyl-dUTP	Sigma
Antibiotika	Sigma
Biotin	Sigma
Brain-Heard Infusion	Merck
5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat-Toluidinsalz (X-Gal)	Gibco BRL
Bromphenolblau (BPB)	Serva

DEPC	Sigma
Dig Easy Hyb	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
1, 4-Dithiotreitol (DTT)	Invitrogen
dNTPs	MBI Fermentas
Eisessig	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Amersham
FluoroLink Cy3 monfunctional dye 5-pack	Amersham
FluoroLink Cy5 monfunctional dye 5-pack	Amersham
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Oxoid
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Serva
LB Broth Base	Invitrogen
LB Agar	Gibco BRL
β -Mercaptoethanol	Roth
MOPS	AppliChem
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Serva
Phenol	Roth
PCR-Puffer für <i>Taq</i> -Polymerase	MBI Fermentas
PCR-Puffer für <i>Pwo</i> -Polymerase	Roche
PCR-Puffer für <i>Pfu</i> -Polymerase	BMI Fermentas
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Serva
Sephadex G50	Amersham / Pharmacia
Sorbitol	Sigma
Thiamin	Sigma
T4 Ligase-Puffer	Roche / MBI Fermentas
Tris	ICN Biomedicals

2.3 Materialien

Elektroporationsküvetten	Invitrogen / BIO RAD
Eppis	Greiner
Filterspitzen	Biozym
Glasperlen (\varnothing 0.1 mm)	Retsch
Glaswaren	Schott
Küvetten	Brand
LightCycler Capillaries	Roche
Mikrotiterplatten	Greiner
Nitrilhandschuhe	Ansell
Parafilm	American National Can
PCR-Stripes	Biozym
PE-Röhrchen	Greiner
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner
Ribotubes	Q BIO gene
Sterilfilter	Schleicher&Schell
Spritzen	Sarstedt / Starlab
UV-Küvetten	Eppendorf

Vinylhandschuhe

Roth

2.4 Kits

MinElute™ PCR Purification Kit (250)	QIAGEN
QIAquick® Gel Extraction Kit (50)	QIAGEN
QIAquick® Spin Miniprep Kit (250)	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit (50)	QIAGEN
QuantiTect™ SYBR®Green RT-PCR Kit	QIAGEN
RNase-Free DNase Set (50)	QIAGEN
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN
5'/3' RACE Kit, 2 nd Generation	Roche
High Pure PCR Produkt Purification Kit	Roche

2.5 Geräte und Apparaturen

Brutschränke	Memmert
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Universität Bielefeld
Fermenter (7L)	MBR
Feinwaagen	Satorius
Gene Pulser, Pulse Controller	BIO RAD
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann
Kühltischzentrifuge 5417R	Eppendorf
LightCycler	Roche
Luftschüttler	Gerhardt
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA® Labortechnik
Mikrowelle Privileg 1026	Privileg
Multifuge 3 L-R	Heraeus
pH-Meter	Knick
Photometer	Eppendorf
Pipettman	Gilson
Ribolyser	Hybaid
ScanArray 4000	Gsi Lumonics
Spannungsgeber	BIO RAD
Speed-Vac SPD 111V	Savant
Peltier Thermal Cycler	MJ Research
PCR-Thermal Cycler PTC-100	MJ Research
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Typhoon-Scanner 8600	Amersham
UV-Transilluminator	UVP
Videoprinter P67E	Mitsubishi
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Eppendorf

2.6 Software

Tabelle III.3: Verwendete Software

Programm	Verwendungszweck	Version	Referenz
BLAST	DNA-Sequenzvergleiche		(Altschul <i>et al.</i> , 1997) http://www.softberry.com/berry.html?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb
BPROM	Promotorvorhersage		Scientific & Education Software
Clone	Restriktionskarten und Primerdesign	6.0	
ClustalX	Multiple Alignments		(Thompson <i>et al.</i> , 1997)
Corel Draw	Bildbearbeitung	9.0	Corel
EMMA	Spoterkennung und Quantifizierung	1.0	(Dondrup <i>et al.</i> , 2003)
Excel	Tabellenkalkulation	7.0	Microsoft
GenDB	Genomdatenbank <i>C. glutamicum</i> , <i>C. efficiens</i> , <i>C. diphtheriae</i>	2.0	(Meyer <i>et al.</i> , 2003)
ImaGene	Spoterkennung und Quantifizierung.	5.0	Bio Discovery
LightCycler	Real time-RT-PCR	3.5	Roche
MBR	PCS (Fermentersteuerung)		MBR http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
NNPP	Promotorvorhersage		(Studholme & Dixon, 2003)
PROMSCAN	Promotorvorhersage		Gsi Lumonics
Scan & Quant Array	Scannen der Arrays		ftp://rdp.life.uiuc.edu/pub/RDP/programs/TreeTool
Treetool	Phylogenie-Visualisierer	2.0.1	
Word	Textverarbeitung	2000	Microsoft

3 Medien und Zusätze

3.1 Nährmedien

Nährmedien werden mit deionisiertem H₂O angesetzt und anschließend autoklaviert

BHIS (Liebl *et al.*, 1989)

- Brain-Heart-Infusion 3.7 % (w/v)
- Sorbitol 9.1 % (w/v)

LBG Vollmedium (Sambrook, 1989)

- LB Broth Base 2 % (w/v)
- Glukose Monohydrat 0.2 % (w/v)

Minimalmedium 1 (MM1) (Katsumata *et al.*, 1984)

- (NH₄)₂SO₄ 1 % (w/v)
- Harnstoff 0.4 % (w/v)
- K₂HPO₄ 0.1 % (w/v)
- MgSO₄ x 7H₂O 0.04 % (w/v)

in 950 ml deionisiertem H₂O auflösen und autoklavieren

- Glukose (50 %) 50 ml
- Thiamin 500 µg
- Biotin 50 µg
- MM1 Spurenelemente 1 ml

PA-Vollmedium (Penassay Broth)

- Antibiotic Medium No. 3 1.75 % (w/v)

SOC-Medium (Hanahan, 1983)

- Tryptone 2 % (w/v)
- Hefeextrakt 0.5 % (w/v)
- Glukose Monohydrat 0.4 % (w/v)
- NaCl 0.06 % (w/v)
- KCl 0.018 % (w/v)
- MgCl₂ • 6 H₂O 0.2 % (w/v)
- MgSO₄ • 7 H₂O 0.23 % (w/v)

3.2 Zusätze zu den Nährmedien

Agar

- 1.5 % (w/v) für Festmedien

Antibiotika

Die Antibiotika werden den Medien nach dem Autoklavieren aus steril filtrierten Stammlösungen zugegeben.

Tabelle III.4: Zum Einsatz gekommene Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
Kanamycin	Km	H ₂ O bidest.	25 µg/ml	50 [µg/ml]
Nalidixinsäure	Nx	0.1N NaOH	50 µg/ml	

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal)

- Stammlösung mit 40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid herstellen und steril filtrieren (Lagerung bei -20 °C)

- 1ml Stammlösung auf 1 l Medium; alternative: 30 µl je Festmediumsplatte ausspateln

Sucrose

- 10 % (w/v) in BHIS-Festmedium

Isopropylthiogalactosid (IPTG)

- 100 mM Stammlösung 0,238 g/ml
in H₂O lösen; sterilfiltrieren

MM1-Spurenelemente

- FeSO₄ x 7H₂O 2 g/L
 - MnSO₄ x 1H₂O 2 g/L
 - NaCl 50 g/L
- in deionisiertem H₂O lösen; autoklavieren

3.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Puffer und Lösungen mit deionisiertem H₂O angesetzt und anschließend sterilisiert.

3.3.1 Lösungen für Fermentation**Säure**

- Phosphorsäure 10 % (w/v)

Lauge

- Natronlauge 1,0 M

Antischaum

- Pluronic BASF

3.3.2 DNA-Isolierung und -Reinigung**HB1**

- Glucose 50 mM
- Tris 25 mM
- EDTA 10 mM

jeweils frisch 10 µl RNase-Lösung* auf 1 ml HB1 geben;
auf pH 7 einstellen

* Herstellung: 10 mg RNase in 1 ml H₂O 30 min kochen; Lagerung bei 4 °C

HB2

- NaOH 0,2 N
- SDS 2 %
- Glycerin 87 %

jeweils frisch in gleicher Menge zusammengeben

Phenol-Chloroform-Mix

- 1:1 Mischung Phenol / Chloroform

SDS-Lösung

- SDS in H₂O 20 % (w/v)

3.3.3 DNA-Transfer**10 % Glycerin**

- Glycerin (87 % (w/v)) 115 ml
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter auffüllen

15 % Glycerin

- Glycerin (87 % (w/v)) 172,5 ml
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter auffüllen

TG-Puffer

- Tris 1 mM
 - Glycerin (87 % (w/v)) 115 ml
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter auffüllen; pH 7.5

3.3.4 Puffer und Lösungen für Vakuum-Blot und Hybridisierung**Antikörperkonjugat-Lösung (pro Filter)**

- Puffer 2 20 ml
- Anti-DIG-AP-Konjugat (bei NBT/X-Phosphat) 4 µl

Blockingreagenz (10 % Stammlösung)

- Blockinreagenz (in Puffer 1) 10 % (w/v)
- aufkochen, autoklavieren und bei 4 °C lagern

Blotting-Puffer A (Depurinierung)

- HCl 0,25 N

Blotting-Puffer B (Denaturierung)

- NaOH 0,5 N
- NaCl 1,5 M
- jeweils frisch 1:1 aus doppelt konzentrierten Stammlösungen zusammensetzen

Blotting-Puffer C (Neutralisierung)

- Tris-HCl 1 M
- NaCl 2 M
- pH 7

Blotting-Puffer D/20fach SSC (Transfer)

- NaCl 3 M
- Na-Citrat 0,3 M
- pH 7

Dehydrierungs-Lösung

- NaOH 0,2 M
- SDS 0,1 % (w/v)

Färbelösung

- Puffer 3 10 ml
- NBT-Lösung 45 µl
- X-Phosphat-Lösung 35 µl

Puffer 1

- Maleinsäure 0,1 M
- NaCl 0,15 M
- NaOH 7 g
- pH 7,5

Puffer 2

- 1 % Blockingreagenz (1/10 Volumen 10 %ige Stammlösung) in Puffer 1; je frisch ansetzen

Puffer 3

- Tris-HCl 0,1 M
- NaCl 0,1 M
- MgCl₂ x 6 H₂O 20 mM
- pH 9,5

Hybridisierungs-Lösung

- SSC 5 fach
- N-Lauroylsarkosin 0,1 % (w/v)
- SDS 0,02 % (w/v)
- Blockingreagenz 1 %
- Lösung bei -20 °C lagern

3.3.5 Gelelektrophorese

Agarose

- Agarose 1-3 % (w/v)
in TA-Gelpuffer lösen, unter Rühren aufkochen und bei 60 °C lagern

Bromphenolblau-Ladepuffer (BPB)

- Glycerin 50 % (w/v)
 - EDTA 1 mM
 - Bromphenolblau 0,05 % (w/v)
- autoklavieren

TA-Elektrophoresepuffer (50fach)

- Tris 2 M
 - Na-Acetat 500 mM
 - EDTA 50 mM
- in deionisiertem H₂O lösen; mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen

Ethidiumbromid-Färbelösung (EtBr)

- Ethidiumbromid 1 µg/ml

3.3.6 DNA-Amplifizierung mittels PCR

dNTP-Mix (Stammlösung)

- dATP 2,5 mM
 - dCTP 2,5 mM
 - dGTP 2,5 mM
 - dTTP 2,5 mM
- in deionisiertem H₂O lösen

3.3.7 DNA-Restriktionsspaltung

10x TA-Spaltungspuffer

Lösung A:

- Tris 4 g
 - KAc 6,5 g
 - MgAc 2,1 g
- in 80 ml deionisiertem H₂O; mit Eisessig auf pH 7,9 einstellen; autoklavieren

Lösung B:

- DTT 50 mM
- 10 ml Ansatz in deionisiertem H₂O; sterifiltrieren; bei -20 °C lagern

Lösung C:

- BSA 10 mg

in 1 ml deionisiertem H₂O, sterilfiltrieren; bei –20 °C lagern

10x TA-Spaltungspuffer

- Lösung A 0,8 ml
- Lösung B 0,1 ml
- Lösung C 0,1 ml

Spaltungspuffer bei –20 °C oder 4 °C lagern

3.3.8 RNA-Isolierung

DEPC-Wasser

- DEPC 0,1 %

MOPS 10x

- MOPS 200 mM
- Na-Acetat 50 mM
- EDTA 10 mM

mit deionisiertem H₂O auf 500 ml auffüllen, pH 7

MOPS-Elektrophoresepuffer

- MOPS 1 x
 - Formaldehyd. gefiltert 6 % (v/v)
- auf 1,5 Liter mit DEPC-H₂O auffüllen

RNA-Ladepuffer

- Glycerin (50 % v/v) 500,0 µl
- Bromphenolblau (0,4 % w/v) 0,4 µl
- EDTA (einer 0,2 M Stammlösung) 5,0 µl
- MOPS 1x 100,0 µl

RNA-Probenpuffer

- Formamid (67 %) deionisiert 335,0 µl
- Formaldehyd (37 %) 121,5 µl
- MOPS 1x 50,0 µl

3.3.9 Array-Hybridisierung

20x SSC-Puffer

- NaCl 3,0 mM
- Natrium-Citrat 0,3 mM

in deionisiertem H₂O

Waschlösung 1

- SSC 2 fach
- SDS 0,2 % (w/v)

Waschlösung 2

- SSC 0,2 fach
- SDS 0,2 % (w/v)

Waschlösung 3

- SSC 0,2 fach

Waschlösung 4

- SSC 0,1 fach

4 Kultivierung von Bakterien**4.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien**

Die Anzucht von *C. glutamicum* und *E. coli* auf Festmedium erfolgt durch Einzelkolonieausstrich auf den entsprechenden Medien und anschließender Inkubation im Brutschrank. *C. glutamicum* wird 1-2 Tage bei 30 °C angezogen, alle *E. coli*-Stämme über Nacht bei 37 °C. Plasmidtragende und rekombinante Stämme werden stets selektiv angezogen. Die kultivierten Platten können anschließend bei 4 °C gelagert werden. Zur dauerhaften Stammkonservierung werden Glycerinkulturen von Einzelkolonieausstrichen angelegt. Dafür werden Zellen in 300 µl LBG resuspendiert, mit 900 µl sterilem 87 %igem Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert. Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgt durch Animpfung mit einer Einzelkolonie von einer frischen Festmediumsplatte. *C. glutamicum*-Kulturen werden in Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei 150 rpm und bei 30 °C angezogen. Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgt dagegen bei 37 °C.

4.2 Bestimmung des Bakterientiters

Das Wachstum einer Bakterienkultur kann im Spektralphotometer verfolgt werden. Dazu wird die optische Dichte (o.D.) der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm ermittelt. Als Referenz dient die jeweilige sterile Nährlösung. Eine o.D.₆₀₀ von 1 entspricht etwa 2×10^8 *E. coli*-Zellen / ml und 1×10^8 *C. glutamicum*-Zellen / ml.

4.3 Stochertest

Für den Stochertest wird etwas Zellmasse der zu prüfenden Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und auf verschiedene Festmedien-Platten nacheinander durch strichförmiges Ausstreichen überimpft. Die Platten werden über Nacht inkubiert und anschließend ausgewertet.

4.4 Anzucht der Bakterien im Fermenter

Die Vorkultur wird in Minimalmedium (MM1) in Schüttelkolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht im Luftschtler angezogen. Die Fermentationen werden in einem digitalen Bioreaktor mit 7L Gesamtvolumen durchgeführt. Eine umfassende Peripherie dient hierbei der Aufrechterhaltung der optimalen Bedingungen des Mikroorganismenwachstums, sowie der Messung analytischer Parameter zur Verfolgung der Fermentation. Der Sauerstoffpartialdruck wird über die Rührerdrehzahl geregelt. Online werden Temperatur, Druck, Begasung, pH, CO₂ und pO₂ aufgezeichnet. Die optische Dichte und der Glukosegehalt werden offline erfasst. Der Fermenter wird mit Hilfe einer Nadel über ein Septum steril angeimpft. Die Kultur wird in MM1 mit einer Glukosekonzentration von 25 g/L fermentiert. Die Probenahme erfolgt über den Verlauf der Fermentation von der exponentiellen Wachstumsphase zur spätstationären Wachstumsphase, welche das Ende der Fermentation darstellt.

4.5 Fermenterparameter:

Tab. III.6: Fermenterparameter

Reaktorvolumen/Füllmenge	5 L
pO ₂	30 %
RPM	100-1500 (pO ₂ -Kontrolle)
Luft	5 L/min
Kopfraumdruck	0,2 bar
pH	7
Antischaum	automatisch
Start o.D.	0,2

4.5.1 Animpfen des Fermenters

- Einzelkolonie in Minimalmedium1 animpfen und ü/N bei 30 °C im Luftschtler bei 150 rpm anziehen
- Der Fermenter wird mit einer Start-o.D. von 0,2 angeimpft, wobei darauf zu achten ist, dass die Temperatur konstant bleibt

4.5.2 Begasungsumstellung

- Der Sauerstoffpartialdruck wird über die Rührerdrehzahl geregelt. Zu Beginn wird über den Kopfraum begast, da bei Blasenbegasung der Kohlenstoffdioxidausstrom zu hoch wäre und das CO₂ von den Bakterien im Stoffwechsel benötigt wird.
- Befindet sich die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase steigt der Bedarf an Sauerstoff stark an und somit auch die Rührerdrehzahl, da diese aber nur bis 1500 rpm zu steigern ist, muß auf Blasenbegasung umgeschaltet werden. Die Versorgung der Kultur mit Kohlenstoffdioxid wird über die eigene CO₂ Produktion der Mikroorganismen gewährleistet

4.5.3 Probenahme

- die Probenahme erfolgt über den kompletten Verlauf der logarithmischen bis zur stationären Wachstumsphase
- die Kultur bzw. abgenommene Probe in Kühlzentrifuge pelletiert und jeweils behandelt
- 30 sec. bei 4 °C pelletieren (12.000 rpm). Überstand verwerfen und Pellet für die Transkriptomuntersuchung sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren
- 2 Min, bei 4 °C pelletieren (12.000 rpm) und den Überstand zur Glukoseanalytik einfrieren
- Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm
- Alle Proben werden zur späteren offline Analyse bei –80 °C eingefroren

4.5.4 Glukosebestimmung

Der Glukosegehalt in dem Kulturüberstand der gezogenen Probe wird extern in der AG Fermentationstechnik der Universität Bielefeld mittels HPLC-Quantifizierung ermittelt.

4.5.5 Bestimmung der Verdopplungszeit t_d

Die Wachstumsgeschwindigkeit r_x während der exponentiellen Wachstumsphase, wird mit folgender Formel berechnet:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

r_x = Wachstumsgeschwindigkeit [g/L*h]

X = Biomasse [g/L]

μ = spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]

dX/dt = Änderung der Biomasse mit der Zeit

nach Integration mit $X = X_0$ und umstellen der Formel ergibt sich folgende Gleichung, mit der man die spezifische Wachstumsrate μ berechnen kann:

$$\mu = \ln \frac{X}{X_0} / t$$

Die Verdopplungszeit t_d lässt sich mit nachfolgender Formel berechnen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

t_d = Verdopplungszeit [h]

Die graphische Bestimmung der spezifischen maximalen Wachstumsgeschwindigkeit μ erfolgt durch Auftragung von $\ln X$ gegen die Zeit, nach folgender Formel:

$$\ln X = \ln X_0 \cdot \mu t$$

Wird in der graphischen, halblogarithmischen Auftragung eine Gerade durch die Werte aus der exponentiellen Wachstumsphase gelegt, erhält man die maximale spezifische Wachstumsrate.

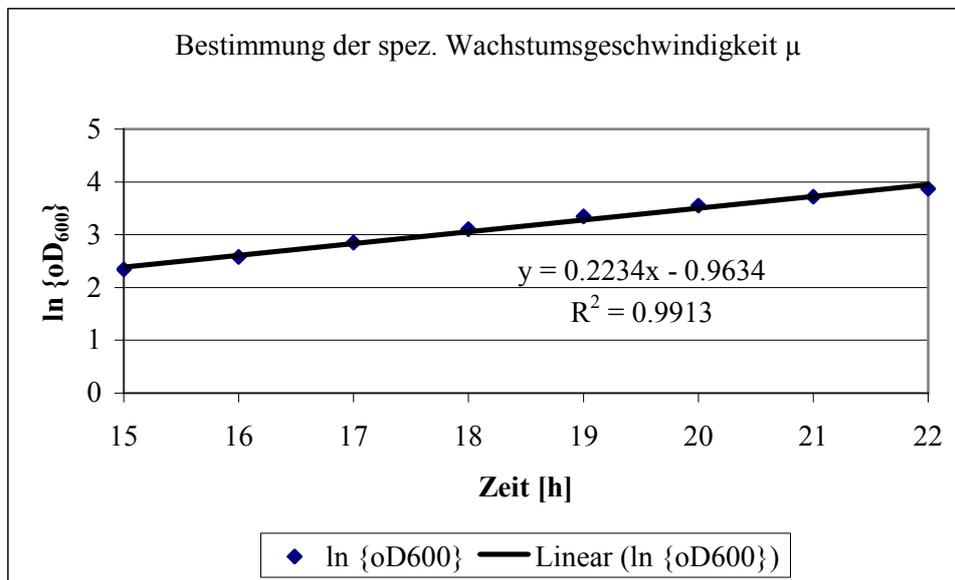


Abb. III.1: Graphische Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ

Aus der Steigung der Geraden ergibt sich eine spezifische Wachstumsrate von $0,22 \text{ h}^{-1}$. Aus der ermittelten Wachstumsgeschwindigkeit läßt sich die, von den Mikroorganismen benötigte Verdopplungszeit t_d berechnen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = 0,2234h = 3,1h \pm 0,2$$

5 DNA-Isolierung

5.1 Gesamt-DNA-Isolierung aus *C. glutamicum*

Für die Isolierung von Gesamt-DNA aus *C. glutamicum* werden die Zellen durch Behandlung mit Lysozym und SDS zunächst lysiert. Durch Zugabe von Pronase E und einer anschließenden Phenolisierung werden die Proteine entfernt, bevor die DNA durch Ethanol-fällung extrahiert werden kann (Tauch *et al.*, 1995).

- ü/N auf Festmedium gewachsene Bakterien in 3 ml HB1 mit 20 mg/ml Lysozym vollständig resuspendieren und 2 h bei 37 °C im Roller inkubieren
- Zugabe von 500 μl einer 20 %igen SDS-Lösung; vorsichtig invertieren
- Zugabe einer Spatelspitze Pronase E gefolgt von einer 2 h Inkubation im 37 °C Roller

- 2-3 ml Phenol-Chloroform-Mix zugeben und vorsichtig invertieren
- Abzentrifugation im JA-17 Rotor bei 4 °C für 20 min mit 8.000 rpm
- Überführung der wässrigen Phase mit einer abgeschnittenen blauen Spitze in ein neues PE-Röhrchen; Phenolisierung wiederholen bis kein Protein mehr ausfällt
- Überstand mit 98 % (v/v) Ethanol (–20 °C) auf 10 ml auffüllen und invertieren bis die DNA ausfällt; 20 min bei 12.000 rpm und 4 °C abzentrifugieren
- Pellet in 5 ml 70 %igem Ethanol (–20 °C) waschen und erneut abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet bei 60 °C trocknen und in 100 µl H₂O resuspendieren; Lagerung bei 4 °C

5.2 Plasmid-DNA Isolierung mit dem QIAquick[®] Spin Miniprep Kit

Plasmid-DNA wird nach dem Manual von Qiagen isoliert. Basierend auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) erhält man so besonders reine Plasmid-DNA. Bei dieser Methode wird die DNA im Anschluss an die Zell-Lyse an eine Anionenaustauschersäule gebunden und zur Entfernung von Proteinen, Polysacchariden, Metaboliten und kurzkettigen Oligonukleotiden mit einer 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Die Plasmid-DNA wird entweder mit EB-Puffer oder H₂O eluiert.

5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit

Das QIAquick[®] Gel Extraction Kit ermöglicht das Isolieren einer definierten DNA-Bande aus einem Agarose-Gel. Die DNA wird dazu im Gel aufgetrennt und anschließend nur kurz mit EtBr angefärbt. Die entsprechende Bande wird unter UV-Licht rasch mit einem Skalpell möglichst genau ausgeschnitten. Die Gelmatrix des Agarblöckchens wird durch Einwirkung chaotroper Salze bei 50 °C unter Schütteln aufgelöst. Die DNA kann dann an eine Silikatmatrix gebunden und durch mehrere Waschstschritte von Agarose und Salzen gereinigt werden. Die DNA-Probe wird mit 20-50 µl EB-Puffer oder H₂O eluiert.

6 DNA-Reinigung

6.1 PCR-Produkt-Aufreinigung mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit

PCR-Produkte, die für Restriktionsspaltungen oder Ligationen eingesetzt werden sollen, müssen zunächst von überschüssigen Nukleotiden, Primern und Salzen gereinigt werden, da diese folgende Reaktionen beeinflussen könnten. Mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit können DNA-Moleküle (>80 Nucleotide) einfach und schnell aufgereinigt werden. Die DNA wird an eine Säulenmatrix gebunden und mit Ethanol-haltigen Puffern gewaschen. Anschließend wird die DNA mit EB-Puffer oder H₂O (≈pH 8) von der Säule gewaschen.

6.2 Sephadex G50-Säulenchromatographie

Bei der Sephadex G50-Säulenchromatographie können Substanzen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte voneinander getrennt werden. Das Reinigungsprinzip beruht darauf, dass kleine Moleküle wie Salze und Nukleotide langsamer in das Säulenmaterial eindringen können und dadurch auch langsamer eluieren als große Moleküle, die zwischen dem Säulenmaterial hindurchlaufen.

- Sephadex G50-Pulver in deionisiertem H₂O quellen lassen und autoklavieren
- Glaskügelchen (Ø ca. 1 mm) durch tränken in Silikonlösung und anschließendes einstündiges Backen bei 180 °C im offenen Gefäß silikonisieren
- silikonisiertes Kügelchen in blaue Spitze geben, diese in Weichagarröhrchen stellen
- 1 ml Sephadex G50 zugeben
- 10 min bei 3.000 rpm zentrifugieren
- Säule in ein neues Röhrchen stellen, zu reinigende DNA-Lösung zugeben
- 15 min bei 3.000 rpm zentrifugieren, durchgeflossene DNA-Lösung weiter verwenden

7 DNA-Analyse

7.1 Agarose-Gelelektrophorese

In einer Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente verschiedener Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Laufstrecke linearer, doppelsträngiger DNA ist weitgehend umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts und somit ihrer Länge. Durch Vergleiche mit einem Längenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Größe kann auf die Größe unbekannter DNA-Fragmente zurückgeschlossen werden. Vor dem Auftragen der Probe auf das Gel wird diese mit dem glycerinhaltigen Ladepuffer Bromphenolblau (BPB) versetzt, wodurch die Dichte der Probe erhöht und ein Absinken in die Geltasche erreicht wird. Gleichzeitig dient die BPB-Bande als Marker für die zurückgelegte Laufstrecke während der Elektrophorese. Die Auftrennung der DNA-Probe wird bei einer Spannung von 50-100 V durchgeführt, wobei die Stromstärke 300 mA nicht überschreiten soll. Anschließend wird die DNA im Gel mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

- 1 bis 3 % (w/v) Agarose in TA-Puffer unter Rühren aufkochen (je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente) und auf 60 °C abkühlen lassen
- Agarose möglichst dünn in die Gelkammer gießen
- Gel ca. 30 min auspolymerisieren lassen
- Gel mit TA-Puffer übergießen und den Gelkamm vorsichtig entfernen
- DNA-Probe und Längenmarker mit 3 µl BPB mischen und in die Geltaschen pipettieren
- Spannung von 50-100 V anlegen
- nach dem Lauf das Gel 1-5 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (EtBr-Lösung) färben und unter UV-Durchlicht fotografieren

7.2 C-Lyse

Die C-Lyse ist eine Methode, bei der Plasmidgehalt und -größe rekombinanter Bakterienklone schnell und einfach in einer modifizierten Gelelektrophorese bestimmt werden können. Dabei werden die Zellen direkt vor dem Auftragen auf das Gel durch eine Behandlung mit NaOH und SDS lysiert und die enthaltene Plasmid-DNA anschließend im Gel aufgetrennt. Als vergleichender Marker wird ein Plasmid bekannter Größe aufgetragen, um die Größe des zu untersuchenden Plasmides abschätzen zu können.

- 1 %iges Agarose-Gel gießen
- pro Lyse 5 µl HB1-Lösung in einer Mikrotiterplatte vorlegen
- kleine Menge Bakterien mit einem Zahnstocher aufnehmen und im Puffer lösen
- Suspension mit 12 µl HB2-Lösung versetzen, mischen und im Gel auftragen
- das Marker-Plasmid mit BPB auf das Gel auftragen

8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase-Chain-Reaction“) ist eine *in vitro*-Methode zur gezielten enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Zu diesem Zweck müssen für die Erstellung geeigneter Primer zumindest deren Randsequenzen bekannt sein.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten und beginnt mit der Denaturierung der Matrizen-DNA (Template) bei 94 °C, sodass die DNA danach einzelsträngig vorliegt. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, können sich die Primer über Wasserstoffbrücken an das komplementäre Stück im Template anlagern. Aufbau und Länge der Primer bestimmen hier die *Annealing*-Temperatur, die etwa 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegt. Die 3'-OH-Enden der Primer dienen im dritten Schritt (Polymerisation) der thermostabilen Polymerase bei 72 °C als Ausgangspunkt für die Komplementierung der DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen. In jedem PCR-Zyklus wird die Menge an DNA-Molekülen theoretisch verdoppelt.

Neben Primern und einer thermostabilen Polymerase werden für den Reaktionsansatz Desoxynukleotide, ein magnesiumhaltiger Puffer und Template-DNA benötigt. In dieser Arbeit werden *Pwo*-, *Pfu*- und *Taq*-Polymerase eingesetzt. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase verfügen *Pwo*- und *Pfu*-Polymerase über eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität („proof-reading“), die eine geringere Fehlerrate bei der Amplifikation zur Folge hat. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die *Taq*-Polymerase keine glatten Enden („blunt ends“) erzeugt, sondern unabhängig vom Aufbau der Matrizen-DNA ein Adenosintriphosphat als letztes Nukleotid anhängt und somit Amplifikate mit 3'-überhängenden Enden („sticky ends“) entstehen.

8.1 Primer Design

Die Effizienz und die Spezifität der PCR sind von der Qualität der verwendeten Primer abhängig. Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, sollte die Mindestlänge der Primer 18 Nukleotide betragen. Sind die Primer 30 Nukleotide und größer, ist keine weitere Spezifitätszunahme mehr zu erwarten. Beide Primer sollten möglichst gleiche Länge und gleiche Schmelztemperatur haben, wobei der G+C-Gehalt zwischen 50-60 % liegen sollte.

Sollen die Primer Erweiterungen wie Restriktionsschnittstellen, Überhänge für Gene-SOEing oder chemische Modifikationen wie Biotinylierungen tragen, werden diese stets an das 5'-Ende angehängt. Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass es nicht zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen oder Dimerisierungen kommt, weshalb der Einsatz von speziellen

Computerprogrammen zu empfehlen ist. Die Primer dieser Arbeit wurden mit dem Programm „Clone Manager“ erstellt.

Um das Klonieren von DNA-Fragmenten in einen Vektor zu vereinfachen, werden möglichst Primer generiert, an deren Sequenzenden Restriktionsschnittstellen angehängt werden.

Berechnung der „Annealing“-Temperatur für Primer

Die „Annealing“-Temperaturen wurden mit der allgemein gebräuchlichen Formel zur Bestimmung der Schmelztemperatur eines bestimmten Oligonukleotides berechnet:

$$T_m = [(Anzahl \text{ von } A+T) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (Anzahl \text{ von } C+G) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}] - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$$

A= Anzahl an Adenin

C= Anzahl an Cytosin

G= Anzahl an Guanin

T= Anzahl an Thymin

8.2 PCR-Reaktionsansätze und Programme

8.2.1 PCR-Reaktionsansatz für *Pwo*-Polymerase

Mastermix für einen 50 µl Ansatz (mit deionisiertem H₂O auffüllen):

- 1 µl Template
- 0,5 µl je Primer
- 5 µl 10x Polymerase-Puffer + MgSO₄
- 5-17 µl MgSO₄
- 2,5 µl dNTP-Mix
- 0,1 µl *Pwo*-Polymerase

8.2.2 PCR-Programm für *Pwo*-Polymerase

- | | | | |
|---|-----------------------------------|--------|-----------------------|
| 1 | 94 °C | 2 min | Vorlauf |
| 2 | 94 °C | 45 sec | Denaturieren |
| 3 | * °C | 45 sec | Annealing |
| 4 | 72 °C | ** | Polymerisation |
| 5 | Schritt 2-4 35-40 mal wiederholen | | |
| 6 | 72 °C | 5 min | finale Polymerisation |
| 7 | 8 °C | ∞ | bis zur Aufbewahrung |

* abhängig von den verwendeten Primern; ** abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes; 1 kb in 45 sec

8.2.3 PCR-Reaktionsansatz für *Pfu*-Polymerase

Mastermix für einen 50 µl Ansatz (mit deionisiertem H₂O auffüllen):

- 1 µl Template
- 0,5 µl je Primer
- 5 µl 10x Polymerase-Puffer + MgSO₄
- 5-17 µl MgSO₄
- 4 µl dNTP-Mix
- 0,5 µl *Pfu*-Polymerase

8.2.4 PCR-Programm für *Pfu*-Polymerase

1	94 °C	2 min	Vorlauf
2	94 °C	45 sec	Denaturieren
3	* °C	45 sec	Annealing
4	72 °C	**	Polymerisation
5	Schritt 2-4 35-40 mal wiederholen		
6	72 °C	5 min	finale Polymerisation
7	8 °C	∞	bis zur Aufbewahrung

* abhängig von den verwendeten Primern; ** abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes; 500 bp / min

8.2.5 PCR-Reaktionsansatz für *Taq*-Polymerase

Mastermix für einen 50 µl Ansatz (mit deionisiertem H₂O auffüllen):

1	µl	Template
0,5	µl	je Primer
5	µl	10x Polymerase-Puffer + MgSO ₄
5-17	µl	MgCl ₂
4	µl	dNTP-Mix
0,25	µl	<i>Taq</i> -Polymerase

8.2.6 PCR-Programm für *Taq*-Polymerase

1	94 °C	3-10 min	Vorlauf
2	94 °C	30 sec	Denaturieren
3	* °C	30 sec	Annealing
4	72 °C	**	Polymerisation
5	Schritt 2-4 35 mal wiederholen		
6	72 °C	3 min	finale Polymerisation
7	8 °C	∞	bis zur Aufbewahrung

* abhängig von den verwendeten Primern; ** abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes; 2 kb/min

9 Gene-Splicing by Overlap Extension

Das Gene-Splicing by Overlap Extension (GeneSOEing) ist eine Methode, bei der *in vitro* DNA-Fragmente mittels PCR neu kombiniert werden können, ohne dass Restriktionsschnittstellen vorhanden sein müssen (Abbildung III.1). Eine mögliche Anwendung ist das Konstruieren von Deletionsmutanten, mit denen ortsspezifisch Mutationen erzeugt werden. Zunächst werden zwei PCR-Produkte erzeugt, die den zu deletierenden Bereich flankieren. Bei den dafür verwendeten Primern (P1-P4) ist darauf zu achten, dass Primer 3 am 5'-Ende einen Überhang trägt, der komplementär zur Sequenz von Primer 2 ist. In der nachfolgenden PCR-Reaktion werden die beiden Produkte im gleichen Verhältnis zur Erstellung des Fusionsprodukts eingesetzt. Durch den Überhang am zweiten Produkt und mit Hilfe der Primer 1 und 4 kommt es zur Fusion der beiden PCR-Produkte. Bei dieser Methode ist darauf zu achten, dass die verwendete Polymerase glatte Enden erzeugt. Für die Erstellung der Vorprodukte wurde für diese Arbeit die *Pwo*-Polymerase verwendet; für die Fusion die *Pfu*-Polymerase.

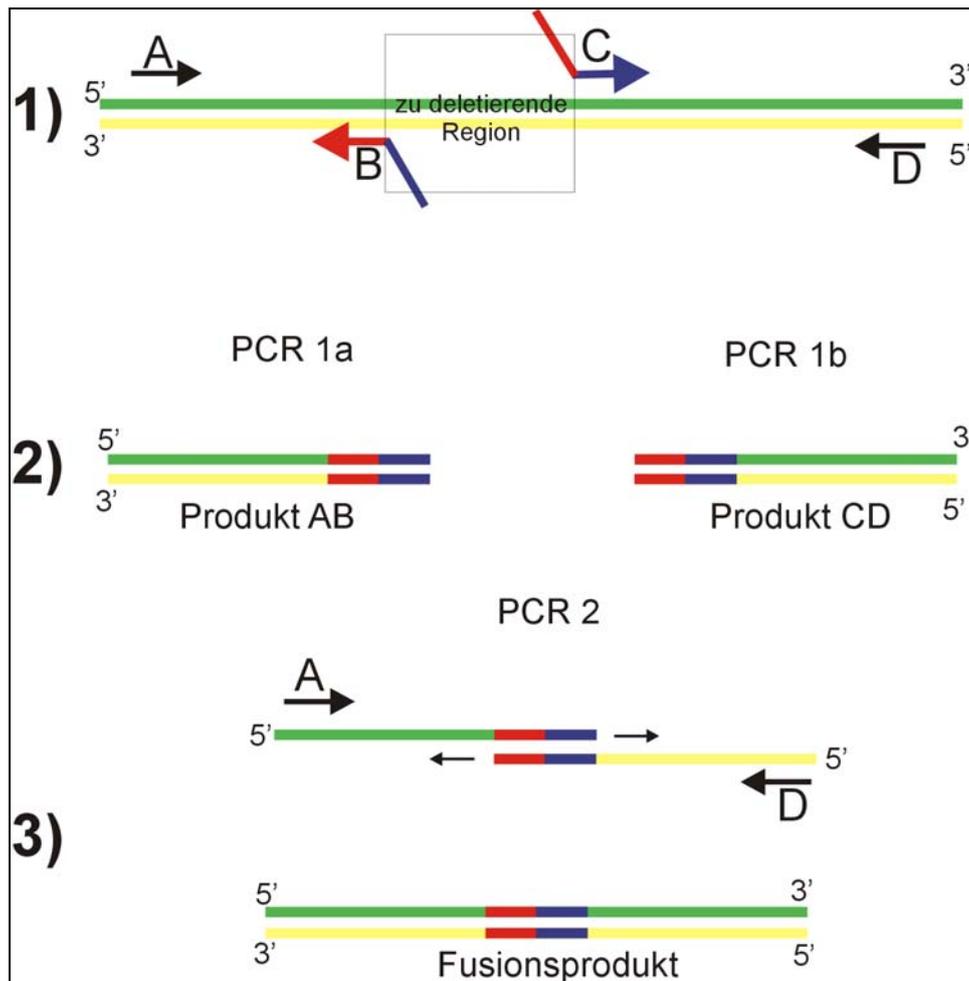


Abb. III.2: Gene Splicing by Overlap Extension. Mit den Primern A bis D werden zunächst zwei Vorprodukte amplifiziert, die im Anschluß fusioniert werden. Nach Möglichkeit werden Primer generiert, an deren Enden Restriktionsschnittstellen angehängt sind.

9.1 Etablierung einer Deletion im Genom

Zur Etablierung einer Deletion im Genom von *C. glutamicum* werden die Bereiche vor und hinter dem zu deletierenden Bereich fusioniert und das Produkt mittels pK18*mobsacB*-System gegen den intakten Abschnitt im Chromosom des Wildtypstamms ausgetauscht. Die Integration des Vektors verleiht dem Stamm eine Km-Resistenz, sodass die Selektion auf Integration des Vektors auf Km-haltigem Nährmedium erfolgt. Gleichzeitig führt die integrierte Form von pK18*mobsacB* zu einer Sucrose-Sensitivität, die die anschließende Selektion auf den Verlust des Vektors auf Sucrose-haltigem Nährmedium ermöglicht: nur solche Zellen, die den Vektor wieder verloren haben, können auf Sucrose wachsen. Die Sucrose-Sensitivität ist auf die Expression des ursprünglich aus *B. subtilis* stammenden Gens *sacB* zurückzuführen, das für das Enzym Levansucrase kodiert. Levansucrase katalysiert die Umwandlung von Sucrose in das für *C. glutamicum* toxische Levan (Schäfer *et al.*, 1994).

Die Exzision kann auf zwei Arten stattfinden: Entweder erfolgt eine homologe Rekombination über dieselbe Flanke wie bei der Integration oder es erfolgt eine Rekombination über die zweite Flanke. Im ersten Fall revertiert der Genotyp, d.h. der Wildtyp ist wieder hergestellt. Im zweiten Fall verbleibt das Deletionskonstrukt im Chromosom, während das native Gen mit dem Vektor verloren geht.

9.2 Deletionsnachweis mit PCR

Eine Mutante kann in einer PCR-Reaktion auf die gewünschte Deletion hin untersucht werden. Dazu wird in einer Hitzebehandlung die DNA der zu untersuchenden Stämme freigesetzt und anschließend der DNA-Abschnitt, in dem die Deletion liegt, mittels PCR amplifiziert. Das so entstehende PCR-Produkt ist für die Mutante um die Größe der Deletion verkürzt; der Wildtyp dient als Kontrolle. Für einen ersten Nachweis können die Primer 1 und 4 der zuvor durchgeführten GeneSOEing Methode verwendet werden. Ist die Suche nach einer Deletionsmutante positiv, so kann zusätzlich mit weiter außen liegenden Test-Primern eine weitere PCR dazu genutzt werden, um sicher auszuschließen, dass das Deletionskonstrukt noch mitsamt dem Vektor im Chromosom integriert ist.

- kleine Menge Zellmaterial in 100 µl H₂O suspendieren
- Eppi-Deckel anstechen und 2x 2 min in einer Mikrowelle aufkochen
- 1 µl der Suspension als Template in einer *Taq*-PCR einsetzen
- Analyse des Amplifikats in einer Agarosegelelektrophorese

Zusätzlich kann man eine Sonde mit dem GeneSOEing-Primern a und b herstellen und diese dann gegen ein gespaltenes Gesamt-DNA-Isolat der möglichen Mutante hybridisieren. (siehe 12. Hybridisierung)

10 Klonierungsexperimente

10.1 DNA-Restriktionsspaltung

Die DNA-Restriktionsspaltung ist einerseits eine Methode zur Analyse von DNA und andererseits ein vorbereitender Schritt für eine anschließende Ligation. Dabei wird das Pentose-Phosphat-Rückgrad der DNA an charakteristischen Sequenzen durch Restriktionsendonucleasen hydrolysiert. Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei entweder versetzt einzelsträngige Enden („sticky-ends“) oder glatte Enden („blunt-ends“). Die Restriktionsspaltung wird in der Regel bei 37 °C im Wasserbad unter Verwendung von 10x TA-Spaltungspuffer durchgeführt.

Nach Beendigung der Spaltung müssen die Restriktionsenzyme inaktiviert oder aus dem Ansatz entfernt werden. Für eine Inaktivierung wird eine Kombination von alternierender Hitze-/Kälte-Einwirkung (–80 °C / 65-95 °C, je nach Herstellerangaben) durchgeführt. Lässt sich ein Enzym nicht durch eine Hitze-Kälte-Behandlung inaktivieren, oder soll der Ansatz für die weitere Verwendung frei von Enzymen sein, kann eine Aufreinigung mittels QIAquick[®] PCR Purification Kit durchgeführt werden.

10.1.1 Spaltungsansatz für Plasmide

- 2,0 µl Vektor
- 2,0 µl 10x TA-Spaltungs-Puffer
- 0,5 µl je Enzym
- 15,5 µl H₂O (bei mehreren Enzymen entsprechend weniger)

10.1.2 Spaltungsansatz für DNA-Fragmente

- 10,0 µl DNA
- 2,0 µl 10x TA-Spaltungs-Puffer
- 0,5 µl je Enzym
- 7,5 µl H₂O (bei mehreren Enzymen entsprechend weniger)

10.2 DNA-Ligation

Bei Ligationsreaktionen werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen des Pentose-Phosphat-Rückgrads der DNA mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Auf diese Weise können beliebige DNA-Fragmente mit kompatiblen „sticky-ends“ oder „blunt-ends“ ligiert werden.

10.2.1 Ligationsansatz für T4-Ligase von MBI Fermentas

- 1-2 µl Vektor
 - 15,0 µl Fusionsprodukt
 - 0,2 µl Ligase
 - 5,0 µl Ligase-Puffer
 - 27,5 µl deion. H₂O
- bei 20 °C starten und über Nacht auf 4 °C runterkühlen

10.3 Identifizierung rekombinanter Plasmide durch Blau-Weiß-Selektion

Der Kloniervektor pK18*mobsacB* enthält eine „multiple cloning site“ (MCS) innerhalb eines *lacZα*-Genfragmentes. Wirtsstämme wie *E. coli* DH5αMCR, die eine Mutation im *lacZα*-Genfragment tragen und daher keine funktionsfähige β-Galactosidase bilden können, werden durch solche Vektoren komplementiert. Werden diese Zellen auf X-Gal-haltigem Nährmedium angezogen, bilden sie blaue Kolonien aus, da bei der Hydrolyse des zunächst farblosen X-Gal durch die β-Galactosidase ein relativ unlöslicher blauer Farbstoff gebildet wird. Wird ein DNA-Fragment in die MCS des Vektors kloniert, zerstört dies die *lacZα*-Untereinheit, d.h. es kann keine Komplementation des Wirtsstammes mehr erfolgen. Die Kolonien solcher Zellen sind weiß, da sie keine funktionsfähige β-Galactosidase bilden können.

11 Hybridisierung von DNA (nach Southern, 1975)

Durch die Hybridisierung können homologe DNA-Sequenzen nachgewiesen werden und dient somit auch der Detektion von chromosomalen Deletionen. Dazu wird die zu testende DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und an einen Filter gebunden. Nach Zugabe einer markierten DNA-Hybridisierungsprobe kommt es zu einem „annealing“ der homologen Bereiche. Dabei wird die Stringenz der Hybridisierung durch die Hybridisierungs- und Waschttemperaturen und den Salzgehalt der Waschpuffer bestimmt. Der Nachweis der homolog gepaarten DNA-Bereiche erfolgt durch eine Farbreaktion, in der X-Phosphat durch die am Anti-Digoxigenin-Antikörper gebundene Phosphatase umgesetzt wird.

11.1 DNA-Transfer durch Vakuum-Blotting

(nach „LKB 2016 VacuGene-Blot“ Manual)

Gegenüber dem Kapillarblot bietet diese Methode den Vorteil, dass weniger Puffer benötigt werden und der Zeitaufwand deutlich geringer ist.

- Gespaltene DNA und Marker im Gel auftrennen
- Gel mit EtBr färben und mit Lineal unter UV-Durchlicht fotografieren
- Nylonmembran (Hybond-N Nylon, 0,45 micron, Amersham) passend zur Blot-Maske schneiden
- Vakuum-Blot nach Vorschrift aufbauen
- Gel genau und luftblasenfrei auf Maskenausschnitt legen
- Vakuum von ca. 50 mbar anlegen
- Gel nacheinander mit folgenden Puffern überschichten, diese anschließend wieder absaugen
- ca. 5 min Blotting-Puffer A (Depurinierung)
- ca. 5 min Blotting-Puffer B (Denaturierung)
- ca. 5 min Blotting-Puffer C (Neutralisierung)
- ca. 20 min 20fach SSC (Transfer der Membran)
- Membran kurz antrocknen, mit Frappan umwickeln und DNA-Seite 5 min mit UV-Licht belichten (crosslinking der DNA)
- Membran sofort zur Hybridisierung einsetzen oder in 3 MM-Papier lagern

11.2 Nicht-radioaktive DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP

Die DNA wird durch „random-primed“ Einbau von dUTP, welches über einen Spacer mit einem Steroid-Hapten verbunden ist, markiert. Nach der Hybridisierung werden die Hybride unter Verwendung eines Antikörper-Konjugates (Antidigoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat) und einer anschließenden vom Enzym katalysierten Reaktion visualisiert.

- DNA in ca. 30 µl H₂O aufnehmen
- DNA 5 - 10 min in kochendem Wasser denaturieren
- Sofort mindestens 10 min auf Eis-EtOH (-20 °C) abkühlen
- 1/10 Volumen Hexanucleotidgemisch zugeben
- 1/10 Volumen dNTP-Markierungsmix zugeben
- 2 µl Klenow-Polymerase (2 U/µl) zugeben, vermischen
- mindestens 2 h, besser ü/N bei 37 °C inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 0,25 M EDTA (pH 8) und 1/19 Volumen 4 M LiCl abstoppen
- 2,5-faches Volumen 98% EtOH (-20 °C) zugeben
- DNA fällen, waschen, trocknen und in 50 µl H₂O aufnehmen

11.3 Nicht-radioaktive Hybridisierung

(„DNA-labeling and Detection Kit Nonradiative“ Manual)

Die Hybridisierung dient dem „annealing“ der Sonden mit homologen DNA-Bereichen auf der Nylon-Membran. Der eigentlichen Hybridisierung wird eine Vor-Hybridisierung mit einem Casein-haltigen Puffer vorgeschaltet, wodurch freie Bindungsstellen auf dem Filter abgesättigt und eine unspezifische Bindung der Sonde verhindert wird.

Vorhybridisierung:

- Nylon-Membran mit DNA-Seite nach innen in Hybridisierungskolben geben
- ca. 20 ml Hybridisierungs-Lösung (68 °C) zugeben
- 1 - 3 h bei 68 °C rollern

Hybridisierung:

- markierte DNA in 10 ml Hybridisierungs-Lösung geben und 5 - 10 min im Wasserbad aufkochen
- Probe mindestens 10 min auf Eis-EtOH (-20 °C) abkühlen
- Vorhybridisierungs-Lösung abgießen, Membran darf dabei nicht austrocknen
- Probe in Kolben geben und mindestens 2 h, besser ü/N bei 68 °C rollern
- Hybridisierungs-Probe in PE-Röhrchen geben und zur erneuten Verwendung bei 10 °C aufbewahren

Waschung:

- Filter 2 mal für 5 min in Wasch-Lösung A bei RT rollern
- Filter 2 mal für 15 min in Wasch-Lösung B bei 68 °C rollern

11.4 Digoxigenin-Nachweis

Zur Visualisierung der Hybridisierung wird eine Inkubation mit Schaf-Anti-Digoxigenin-Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, vorgenommen. Nach Entfernung unspezifischer und überschüssige Antikörperkonjugate durch Waschschrte, können durch eine Inkubation mit X-Phosphat (+NBT-Lösung) in einer direkten Farbreaktion die hybridisierten DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

- Filtermembran 1 min in Puffer 1 rollern, danach 30 min in 30 ml Puffer 2 bei RT im Hybridisierungssofen inkubieren
- Puffer 2 abgießen und Membran mit 30 ml Antikörperkonjugat-Lösung rollern
- Antikörperkonjugat-Lösung abgießen und Filtermembran 2 mal 15 min mit Puffer 1 waschen
- Membran in flacher Schale transferieren und 2 min in Puffer 3 äquilibrieren
- Filter mit 10 ml Färbelösung im Dunkeln färben, bis die Banden sichtbar werden
- Färbereaktion mit TA-Elektrophorese-Puffer abstoppen und Filter trocknen
- Membran im Dunklen nach Dokumentation aufbewahren

12 DNA-Transfertechniken

12.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine hoch effiziente Methode zum Transfer von freier DNA in Bakterienzellen. Die DNA wird durch elektrische Impulse von ca. 10 kV/cm in entsprechend vorbereitete (kompetente) Zellen transferiert. Um einen effektiven Transfer zu

erreichen, müssen sowohl die Bakterien als auch die DNA-Suspensionen möglichst frei von Ionen sein, um einen zu großen Stromfluss zu vermeiden. Die DNA wird zu diesem Zweck entweder über eine Sephadex G50-Säulenchromatographie aufgereinigt oder mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit und deionisiertem H₂O eluiert.

12.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine *E. coli*-Kultur wird bis zur frühlogarithmischen Phase angezogen und anschließend durch schnelles Abkühlen in diesem Zustand „arretiert“. Die Kultur wird mehrfach mit deionisiertem H₂O und 15 %igem Glycerin gewaschen, um die Suspension zu deionisieren. Die kompetenten Zellen werden im Anschluß aliquotiert und sind so für mehrere Monate bei –80 °C haltbar (Tauch *et al.*, 1994).

12.1.2 Elektroporation nach *E. coli*

(nach „Gene Puls“ Manual)

- Aliquot kompetenter Zellen auf Eis auftauen, DNA-Lösung und Küvetten auf Eis vorkühlen
- Pulsbedingung einstellen: 25 µF Kapazität, 400 Ω Widerstand, 2.5 kV Spannung
- DNA-Lösung zu den Zellen pipettieren, 1 min auf Eis inkubieren
- DNA-Zellen-Gemisch in die Küvette geben, diese von außen gut abtrocknen
- Küvette in das Gerät stellen und Puls auslösen (die Zeitkonstante sollte etwa 7-9 betragen)
- Küvette aus dem Gerät nehmen und die Zellen sofort in ein Eppi mit 1 ml SOC-Medium überführen
- 1 h bei 37 °C inkubieren
- Zellen auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattieren

12.1.3 Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Anzucht der *C. glutamicum*-Zellen verläuft ähnlich wie die der *E. coli*-Zellen. Für die Waschschritte wird neben Glycerin auch TG-Puffer verwendet. Die Stringenz des Waschens wird durch mehrfache Wiederholung erreicht (Tauch *et al.*, 2002).

12.1.4 Elektroporation nach *C. glutamicum*

- Kompetente Zellen auf Eis auftauen, DNA-Lösung und Küvette auf Eis kühlen
- Gerät einstellen: 25 µF Kapazität, 200 Ω Widerstand, 2.5 kV Spannung
- 4 ml BHIS-Medium in einem Greiner-Röhrchen im Wasserbad auf 46 °C vortemperieren
- DNA-Lösung zu den Zellen pipettieren, 1 min auf Eis inkubieren
- DNA-Zell-Gemisch in die Küvette geben und außen gut abtrocknen, in das Gerät stellen und Puls auslösen (Zeitkonstante sollte 3,4 - 4,5 ms betragen)
- Küvette entnehmen, die Suspension in das vortemperierte BHIS überführen und gut durchmischen
- 6 min Hitzeschock bei 46 °C im Wasserbad
- Zellen bei 30 °C für 50 min im Wasserbad inkubieren
- auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattieren

13 Gesamt-RNA-Isolierung aus *C. glutamicum* (Qiagen Manual modifiziert)

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* muss zunächst die stabile Zellhülle mechanisch in sandgefüllten Ribotubes im „HYBAID Ribolyser“ aufgebrochen werden. Nach Zugabe eines GITC-haltigen Lysepuffers (Inaktivierung von RNasen) und Ethanol wird die Probe auf die Säule geladen. Die RNA bindet an der Silicium-Gel-Membran, Verunreinigungen wie Proteine, DNA und Zellbestandteile werden in mehreren Waschschrritten mit Waschpuffern entfernt. Die RNA wird mit RNase-freiem H₂O eluiert.

Um die RNA später für Experimente einsetzen zu können, bei denen schon kleinste Mengen an DNA stören würden (LightCycler- und Microarray-Experimente), muss zur Entfernung verbliebener DNA-Reste eine Behandlung mit DNase folgen (Qiagen Manual).

- Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium bis zur exponentiellen Phase
- Zellernte: 5×10^8 - 1×10^9 Zellen in Eppi überführen; Zentrifugation für 30 sec bei 13200 rpm; Überstand verwerfen; in flüssigem N₂ schockgefrieren; Lagerung bei -80 °C
- Zellpellet in 800µl RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol (1µl/1ml RLT) resuspendieren; in Ribotubes überführen
- 2x 30 sec bei Stufe 6,5 im „HYBAID RiboLyser“ ribolisieren; zwischendurch 1min auf Eis inkubieren
- 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppi überführen; mit 250 µl 98 % Ethanol mischen
- Suspension auf Qiagen-Säule geben; 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen; 700 µl RW1-Puffer auf die Säule geben
- 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchfluss verwerfen; Säule in ein neues 2 ml-Gefäß setzen
- 2x mit 500 µl RPE-Puffer waschen und bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchfluss verwerfen
- 2 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugieren; Säule in Eppi setzten
- zur Elution der RNA 2x 50 µl RNase freies H₂O direkt auf die Säulen-Membran geben; jeweils 5 min bei RT inkubieren und bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Zugabe von 10 µl DNaseI (Sigma) und 10 µl DNaseI-Puffer
- 45 min Inkubation bei 25 °C
- Eluat mit 250 µl Ethanol und 300 µl RLT-Puffer mischen; auf eine neue Qiagen-Säule geben; 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben; 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchfluss verwerfen
- 10 µl DNaseI (RNase-Free DNase Set; Qiagen) und 70 µl RDD-Puffer direkt auf die Säulenmenbran geben
- 45 min Inkubation bei 25 °C
- 300 µl RW1-Puffer zugeben
- 30 sec bei 13.200 rpm zentrifugieren; Säule in neues 2 ml-Gefäß umsetzen

- 2x mit 500 µl RPE-Puffer waschen und bei 13.000 rpm zentrifugieren; Durchfluss verwerfen
- 2 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugieren; Säule in Eppi setzen
- Zur Elution der RNA 1-2x 50 µl RNase freies H₂O direkt auf die Säulen-Membran geben; jeweils 5 min bei RT inkubieren und bei 13.000 rpm zentrifugieren

13.1 Denaturierendes RNA-Gel

Im RNA-Gel wandert denaturierte RNA und zeigt zwei Banden mit ribosomaler RNA. Eine Bande wird von der 16S rRNA gebildet, die andere von der 23S rRNA. Das Fluoreszenzverhältnis zwischen ihnen beträgt 1:2. Ist die isolierte RNA sauber, sollten diese beiden Banden deutlich zu sehen sein. Leichte Schlieren dazwischen und unterhalb der 16S-rRNA-Bande zeigt mRNA. Fluoreszenz in den Geltaschen oder weiter oberhalb im Gel zeigen DNA-Verunreinigungen.

- 2,7 g Agarose in 130 ml DEPC-Wasser aufkochen; unter Rühren auf 80 °C abkühlen
- 18 ml 10x MOPS-Puffer zugeben
- 32,4 ml gefiltertes Formaldehyd zugeben
- Gel in RNase freie Gelkammer gießen; 30 min auspolymerisieren lassen
- mit MOPS-RNA Elektrophoresepuffer überschichten
- ca. 30 µg Gesamt-RNA mit

Lade-Master-Mix:

- für jede Probe 2 µl RNA-Ladelösung mit 0,25 µl EtBr versetzen

Probenvorbereitung:

- 1-2 µl RNA + 2 Volumen RNA-Probenpuffer
- 10 min bei 65 °C denaturieren
- anschließend 5 min auf Eis inkubieren
- 2,3 µl Lade-MM in Eppi-Deckel pipettieren
- kurz zentrifugieren und aufs Gel auftragen
- Spannung von etwa 80 V anlegen
- laufen lassen, bis das BPB im unteren Bereich des Gels bandiert
- Geldokumentation mit dem Transilluminator

13.2 PCR-Kontrolle auf DNA

Im Anschluss an die RNA-Isolierung wird eine Kontroll-PCR durchgeführt, um die Probe auf DNA-Reste zu untersuchen. Wird mit den Testprimern ein Amplifikat erhalten, muss ein erneuter DNase-Verdau und eine weitere Aufreinigung durchgeführt werden.

13.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration der Probe wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Einen Hinweis auf eine mögliche Verunreinigung der RNA-Probe gibt der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm A_{260}/A_{280} . Ein Wert von > 0.15 deutet auf eine reine Probe hin. Für die Messung wird eine Verdünnung von 1:60 angesetzt.

14 Microarray-Hybridisierung

Um das Transkriptom einer Zelle zu untersuchen bietet sich die Microarray-Technologie an. Dabei wird die Eigenschaft einzelsträngiger Nukleinsäuren ausgenutzt, bei vorliegenden komplementären Sequenzen spezifische Basenpaarungen einzugehen. Die für die Hybridisierung verwendeten Slides enthalten kovalent gebundene Targets, die einen Großteil der im Genom von *C. glutamicum* vorausgesagten ORFs repräsentieren. Als Sonde wird markierte cDNA zugegeben, die bei einer reversen Transkription der zu untersuchenden RNA entsteht. Bei der Hybridisierung bindet die Sonde über Wasserstoffbrückenbindungen an komplementäre Bereiche auf dem Slide.

Durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Farbstoffe (Cy3 und Cy5) können gleichzeitig zwei verschiedene Proben / Sonden miteinander verglichen werden. Nach der Hybridisierung wird der Slide gescannt und mit Hilfe von Programmen wie ImaGene und EMMA ausgewertet. Da die beiden unterschiedlich markierten Sonden in zwei farblich verschiedenen Kanälen dargestellt werden, ist ein direkter Vergleich der Proben möglich. So kann darauf geschlossen werden, in welcher Probe ein bestimmtes Gen stärker exprimiert ist (Hüser *et al.*, 2003).

14.1 Labeling

Für die Herstellung der Sonden wird die isolierte RNA direkt in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck werden Aminoallyl-dUTPs (aa-dUTPs) eingesetzt, an die später die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt werden.

14.1.1 RT-Reaktion

- 8 µg RNA mit RNase freiem H₂O auf 18 µl Gesamtvolumen auffüllen
- 1 µl AmC₆ random Hexanucleotide zugeben
- 10 min bei 70 °C denaturieren
- vortexen und anzentrifugieren
- 5 min auf Eis inkubieren (Annealing der Hexanucleotidprimer)
- in einem Master Mix wird je Probe zusammengegeben:
 - 6 µl 5x Firstand-Buffer
 - 0,6 µl 50x dNTP Stock Solution
 - 3 µl 0,1 M DDT
 - 0,5 µl RNase-Inhibitor
- 10 µl Master Mix zu jedem Ansatz pipettieren (auf Eis)
- 5 min auf Eis stellen
- 5 min bei RT inkubieren
- 1,5 µl Superscript II RT [200 U/µl] zu jedem Ansatz geben
- 1,5 h reverse Transkription bei 42 °C (dazu Probe bei 24 °C in den Heizblock stellen und auf 42 °C hoch heizen lassen)

14.1.2 Hydrolyse

- 10 µl 50 mM EDTA zugeben
- 10 µl 1 M NaOH zugeben (basisches Milieu)
- vortexen und anzentrifugieren
- 10 min bei 70 °C hydrolysieren

- kurz anzentrifugieren
- 10 µl 1 M HCl zugeben (Neutralisation)

14.1.3 Reinigung der cDNA mit dem MinElute™ PCR Purification Kit

- Probe in 350 µl PB-Puffer aufnehmen; auf Säule geben
- 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren
- Durchlauf erneut auf die Säule pipettieren
- 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren; Durchlauf verwerfen
- 700 µl 70 %iges EtOH auf die Säule geben; 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen; 1 min bei 13.200 rpm trocken zentrifugieren
- 2 mal in 12 µl H₂O (pH 8,5) eluieren; dazu jeweils 1 min einwirken lassen und 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren

14.1.4 Photometrische Bestimmung der cDNA Konzentration

- Eppendorphotometer auf ssDNA einstellen
- 60 µl H₂O (pH 8,0) + 2 µl Probe (sollte mind. 250 µg/ml betragen)

14.1.5 Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 sind alle folgenden Schritte im Dunkeln durchzuführen.

- jede Probe mit 2 µl 1 M Natriumbicarbonat (pH 9,3) versetzen
- jede Probe zu einem Aliquot Cy3 bzw. Cy5 geben
- gut mischen, vortexen, anzentrifugieren

Herstellung der Aliquots:
Farbstoff in 20 µl DMSO lösen
in 2 µl Aliquots in dunkle Eppis füllen
trocknen in Speed-Vac

- 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren

14.1.6 Quenching

- 4,5 µl 4 M Hydroxylamin zugeben
- gut mischen; vortexen und anzentrifugieren
- 15 min bei Raumtemperatur inkubieren

14.1.7 Reinigung der cDNA mit dem MinElute™ PCR Purification Kit

- zur Reinigung DNA-Probe in 350 µl PB-Puffer aufnehmen
- 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren
- Durchlauf erneut auf die Säule pipettieren
- 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren; Durchlauf verwerfen
- 700 µl 70 %iges EtOH auf die Säule geben; 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen; 1 min bei 13.200 rpm trocken zentrifugieren
- 2 mal in 12 µl H₂O (pH 8,5) eluieren; dazu jeweils 1 min auf der Säule einwirken lassen und 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Eluat sollte farbig sein)

14.1.8 Kontroll-Gel

Die Sonden werden in einem 1 %igen Agarosegel überprüft

- 1 µl jeder Probe mit 5 µl 87 %igem Glycerin vermischen; auf Agarosegel auftragen
- 5 µl Bromphenolblau als Marker mitlaufen lassen

Gel anschließend mit dem Typhoon-Scanner scannen

14.2 Array-Hybridisierung

- jeweils ein Wasserbad auf 42 °C und 65 °C vorwärmen; Hybridisierungskammern auf 42 °C vorwärmen
- Array zur Vorhybridisierung in Dig Easy Hyb Lösung geben und im Wasserbad bei 42 °C für 45 min inkubieren
- die Sonden der beiden zu vergleichenden Proben werden zusammengegeben und zwischenzeitlich in der Speed-Vac getrocknet (ohne Heizung)
- getrocknetes Proben-Gemisch in 70 µl Dig Easy Hyb resuspendieren
- vorhybridisierte Slides kurz in deionisiertem H₂O waschen
- anschließend in EtOH tauchen
- unmittelbar danach 3 min bei 1.300 rpm zentrifugieren
- nach dem Start der Zentrifuge die Proben ins 65 °C Wasserbad stellen
- Slides in die Hybridisierungskammer legen und Easy Hyb in die Vertiefungen pipettieren
- Probe kurz anzentrifugieren
- Proben auf trockenen Slide geben und ein Deckgläschen luftblasenfrei auflegen
- Hybridisierungskammer fest verschließen und in 45 °C Wasserbad legen
- Hybridisierung 14-18 Stunden bei 45 °C

14.2.1 Arrays waschen

- Waschlösung 1: 1 mal 5 min waschen (45 °C)
- Waschlösung 2: 2 mal 1 min waschen (24 °C)
- Waschlösung 3: 2 mal 1 min waschen (24 °C)
- Waschlösung 4: 1 mal 30 sec waschen (18 °C)
- Array anschließend sofort für 3 min bei 1.300 rpm trocken zentrifugieren
- bis zum scannen im Dunkeln aufbewahren

15 Expressionsanalyse am LightCycler

Die Analyse der Expressionsstärke wird mit Hilfe des LightCyclers der Firma Roche und dem „QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Zur Messung der Expressionsstärke muss die isolierte und verdünnte RNA zuerst mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. In einer sich anschließenden PCR-Reaktion kann anhand eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige DNA-Moleküle integriert, die PCR-Amplifikation in Echt-Zeit verfolgt werden.

- Erstellung eines Mastermixes für je eine Reaktion (auf Eis):
- 10 µl QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master-Mix
- 6,8 µl RNase freies Wasser
- je 1 µl Primer
- 0,2 µl QuantiTect RT Mix

- Insertion von 1 µl RNA-Lösung (250 ng) in die vorgekühlte PCR-Kapillare
- Zugabe von 19 µl des Mastermixes
- 30 sec bei 3.000 rpm zentrifugieren
- Insertion der Kapillare in den LightCycler; Start des Qiagen-LightCycler-Programms

15.1 Auswertung der Expressionsanalyse

Bevor mit der Analyse der Expressionsdaten begonnen werden kann, muss zuerst die Qualität der Messreihe bestimmt werden. Bei einem optimalen Verlauf der RT-PCR stellt die Schmelzkurve der Primer eine gleichmäßige Gaußverteilung in allen Proben dar. Sollte eine solche Normalverteilung nicht erreicht worden sein, sind die Resultate unter Verwendung neuer Primer zu wiederholen.

Die ermittelten Daten müssen nun in vergleichbare Einheiten, bezeichnet als relative Expressionsfaktoren, umgewandelt werden. Für diese Berechnungen müssen die vom LightCycler berechneten *crossing-points* (Anzahl des Zyklusses bei dem der exponentielle Anstieg der Fluoreszenz maximal ist) auf eine Bezugsgröße (Kontrolle) normiert werden. Nach der Normierung werden die Differenzen zwischen der Norm und den *crossing-point*-Werten ermittelt und die Differenz aufgrund der logarithmischen Amplifikation exponentiell zur Basis 2 genommen (rel. RNA-Menge = $2^{(x-y)}$, x = *crossing-point* der Kontrolle, y = *crossing point* der Probe). Bei den resultierenden Werten handelt es sich um den relativen Expressionsfaktor, der nur innerhalb einer Primerkombination zwischen unterschiedlichen RNA-Isolierungen verglichen werden kann (Pfaffl, 2001).

16 5'-RACE-PCR

Die Methode der 5'-RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde zur Bestimmung der 5'-nichttranslatierten Region der mRNA, ausgewählter Gene, unter Verwendung des 5'/3'RACE Kit, 2nd Generation TM der Firma Roche Diagnostics, verwendet.

Das Prinzip der RACE-PCR beruht auf der Synthese von cDNA. Die isolierte Gesamt-RNA wird, unter zur Hilfenahme eines genspezifischen Primers (Sp1), direkt in einer *reversen Transkription* in cDNA umgeschrieben. Nach dem Verdau der nicht umgeschriebenen RNA wird mittels terminaler Transferase ein poly-A-Schwanz an das 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA prozessiert. Diese poly-A-cDNA wird mittels PCR amplifiziert. Dafür wird zum einen ein poly-dT-anchor-Primer und zum anderen ein Gen spezifischer Primer (Sp2) verwendet. Das resultierende PCR-Produkt wird in den kloniervektor PCR-Blunt II kloniert und anschließend zur Bestimmung des nicht translatierten Bereiches sequenziert.

Die Durchführung erfolgte wie im mit geliefertem Handbuch beschrieben.

17 DNA-Sequenzierung

17.1 Sequenzierung mit LI-COR 4200 und ABI 377

Die DNA-Sequenzierung wurde von dem Sequenzierservice der IIT Biotech GmbH der Universität Bielefeld durchgeführt. Dabei wurden der LI-COR 4200 sowie der ABI 377 eingesetzt, mit den vom Hersteller empfohlenen Methoden. Sequenzierreaktionen erfolgten mit dem *dRhodamine terminator cycle sequencing kit* (Perkin Elmer Biosystems) bzw. dem

Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech). Darüber hinaus wurden Sequenzierungen innerhalb des *C. glutamicum*-Genomprojektes ebenfalls durch Lion Bioscience (Heidelberg), Qiagen (Hilden) und MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt (Tauch *et al.*, 2002).

17.2 Sequenzauswertung

Sämtliche Computeranalysen von DNA-Sequenzen wurden mittels einer SUN SPARC ULTRA 1 Anlage unter dem Betriebssystem Open Windows Version 3.5.1 (Unix) durchgeführt. Für die Assemblierung der Sequenzdaten sowie die Analyse von DNA- und abgeleiteten Proteinsequenzen wurde das *Staden sequence analysis package* (Staden, 1996). Version 99-0 und das FASTA Programmpaket (Pearson and Lipman, 1988) verwendet. Homologievergleiche von DNA- und Proteinsequenzen in aktuellen Versionen der Datenbanken EMBL, GenBank und SWISSPROT erfolgte unter Verwendung des BLAST *search programs* (Altschul *et al.*, 1997). Multiple *alignments* von Proteinsequenzen wurden erstellt mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). RNA-Sekundärstrukturen wurden errechnet mittels MFOLD (Zuker *et al.*, 1999). DNA-Sequenzen, die dem *C. glutamicum*-Genomprojekt entnommen wurden, wurden automatisch mit den Programmen MAGPIE (Gaasterland & Sensen, 1996) bzw. GenDB (Universität Bielefeld) annotiert.

IV. Ergebnisse

1 Molekulargenetische Charakterisierung von *sigB* aus *C. glutamicum*

Die bereits durchgeführten Analysen anderer Arbeitsgruppen lieferten den Hinweis, dass es sich bei SigB um den Sigmafaktor handelt, der der Gruppe der nicht-essentiellen Sigmafaktoren angehört. Auf Grund dessen stellt sich die Frage, in wieweit dieser Sigmafaktor sowohl an der Wachstumsphasenregulation als auch an der Stressantwort nach Stressinduktion in *C. glutamicum* beteiligt ist, wie es von nicht-essentiellen Sigmafaktoren der Gruppe 1 aus anderen Organismen beschrieben worden ist (Hengge-Aronis, 2000).

1.1 Erzeugung einer *sigB*-Deletionsmutante

Um Hinweise über die Funktion von SigB in *C. glutamicum* RES167 (restriktionsdefektes Derivat des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032) zu erhalten, war es notwendig, in einem ersten Arbeitsschritt eine *sigB*-Deletionsmutante zu erstellen. Aufgrund des Fehlens des Sigmafaktors SigB in der Mutante kann durch den daraus resultierenden Phänotyp auf die mögliche Funktion des *sigB*-Gens geschlossen werden.

Zur Herstellung einer *sigB*-Deletionsmutante wurde die GeneSOEing-Technik verwendet (Horton *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1995). Dabei wurden die flankierenden Sequenzabschnitte des zu deletierenden Gens über PCR amplifiziert, in den Vektor pK18*mobsacB* ligiert und anschließend nach *C. glutamicum* transformiert. Dabei integriert der nicht replizierbare Vektor in das Genom, wodurch der Stamm eine Kanamycinresistenz und eine Saccharoseintoleranz erhält. Durch diese Intoleranz herrscht ein positiver Selektionsdruck in Bezug auf eine Desintegration des Vektors nach Ausplattieren der Integrate auf Saccharosehaltigem Medium. Da die Saccharose-resistenten Stämme entweder *sigB*-Mutanten oder Wildtyp-Revertanten sind, muss die korrekte Erzeugung der Deletionsmutante mittels PCR und Southern-Hybridisierung bestätigt werden.

Die möglichen Deletionsmutanten wurden mittels *screening* durch PCR-Nachweise untersucht. Dazu wurde die Gesamt-DNA der Klone isoliert und als *template* für die PCR eingesetzt. Als Primer wurden die äußeren GeneSOEing-Primer *sigB*-d1 und *sigB*-d4 verwendet (Tab III.3). Bei einer Deletionsmutante sollte nur ein Fragment entstehen, welches die Größe der fusionierten GeneSOEing Produktes der ersten PCR enthält. Zum Vergleich

wurde die PCR ebenfalls mit Wildtyp-DNA durchgeführt. Dabei konnte ein Produkt hergestellt werden, das aus dem deletierten Genbereich und den Überhängen vor und hinter dem Gen besteht (Abb. IV.1), die für das Crossingover benötigt werden.

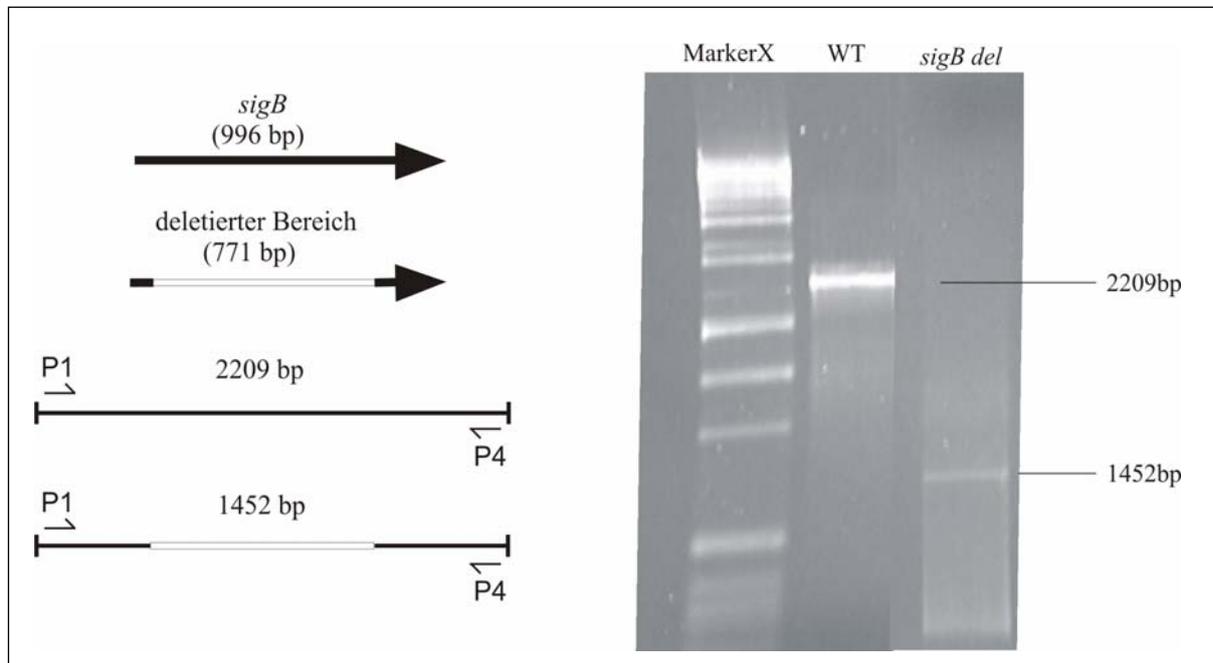


Abb. IV.1: PCR zum Nachweis der Deletion im *sigB*-Gen

Zum weiteren Nachweis wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-DNA der *sigB*-Deletionsmutante isoliert, mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten, im 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Als Sonde wurde ein mit den Primern d1 und d4 erzeugtes PCR-Produkt eingesetzt und mit Digoxigenin-dUTP makiert.

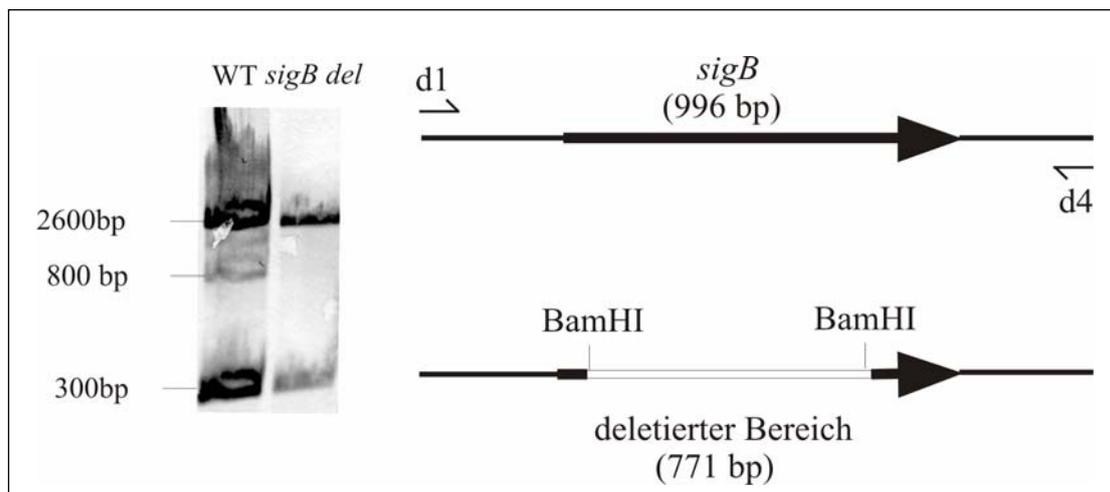


Abb. IV. 2: Blotfilter der Southern-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Sonde. Die Wildtyp- und $\Delta sigB$ -DNA wurde mit BamHI gespalten.

Beim Einsatz der Sonde für die Southern-Hybridisierung wurde bei der *sigB*-Deletionsmutante eine Bande weniger detektiert als beim Wildtyp (Abb. IV. 2). Diese Beobachtung erklärt sich durch die Lage der BamHI-Restriktionsschnittstellen im Genom von *C. glutamicum*, unter anderem liegen sie flankierend um das *sigB*-Gen. Im Rahmen der Mutantenherstellung wurde ein 771 bp großer Bereich aus dem Genom von *C. glutamicum* entfernt. Durch diese Deletion wurden die konservierten Regionen 1, 2 und 3 des nicht-essentiellen Sigmafaktors SigB vollständig aus der Genomsequenz entfernt. Im weiteren Verlauf wird die *sigB*-Deletionsmutante als *C. glutamicum*-Stamm CL1 bezeichnet.

1.2 Expressionsstudien von *sigB* nach Stressapplikation

Ausgehend von den bereits durchgeführten Analysen auf dem Gebiet der Sigmafaktoren aus *C. glutamicum*, wurde zur ersten Charakterisierung des *sigB*-Gens eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene nach Stressapplikationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Wildtyp in Minimalmedium MM1 bis zu einer optischen Dichte von 7 kultiviert und anschließend für 15 Minuten dem jeweiligen Stress ausgesetzt. Bei den getesteten Stressen handelt es sich um Kälte-, Hitze-, Ethanol-, oxidativen- (H_2O_2), Salz- und Säurestress sowie um Sauerstoff-, Eisen- und Glukosemangel (Abb. IV. 3).

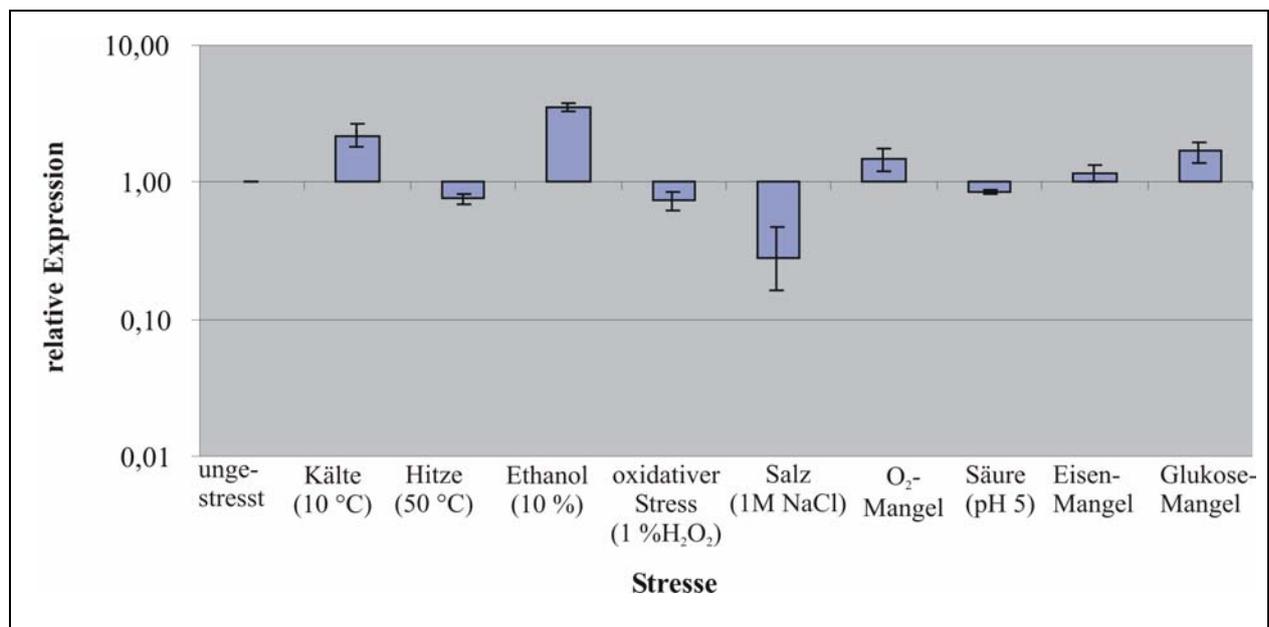


Abb. IV. 3: Expressionsänderungen von *sigB* nach Stressapplikation. Die *sigB*-Expression im ungestressten Wildtyp wurde auf 1 gesetzt.

Die Messung der Expression wurde anhand von drei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten im *LightCycler* durchgeführt. In der Abb. IV. 3 wird die Expression des *sigB*-Gens nach Applikation von Kälte- und Ethanolstress deutlich erhöht dargestellt. Nach der Behandlung von *C. glutamicum* mit Ethanol wird *sigB* um das 3,5 fache stärker exprimiert als in der ungestressten Kontrolle. Bei der Betrachtung der anderen Stressapplikationen fällt auf, dass das *sigB*-Gen durch Natriumchlorid-Zugabe zum Medium um den Faktor drei geringer exprimiert wird. Bei den anderen applizierten Stressen ist keine signifikante Änderung in der *sigB*-Expression zu erkennen.

1.3 Charakterisierung des Wildtyps und der $\Delta sigB$ -Mutante nach Stressapplikation mittels Lebendtitrierbestimmung

Ausgehend von den durchgeführten Expressionsanalysen nach Stressapplikation wurde versucht, die Auswirkungen der jeweiligen Stresse auf den Lebendtitrier des Wildtyps und der *sigB*-Mutante, zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden exponentiell wachsende Zellen 15 Minuten dem jeweils zu testenden Stress ausgesetzt und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Bei den verwendeten Stressen handelt es sich um Kältestress (10 °C), Hitzestress (50 °C), Ethanol-Stress (10 % (v/v)), NaCl-Stress (1 M), oxidativen Stress (1 % (v/v) H₂O₂), Säure-Stress (pH 5) und Eisenmangel.

Nach 36 h Bebrütung bei 30 °C wurden die einzelnen Kolonien pro Platte gezählt und die Überlebensrate im Vergleich zum ungestressten Versuch (15 min bei 30 °C) prozentual dargestellt (Abb. IV.4). Dabei wurde die Kolonienzahl ohne Stressapplikation auf 100% normiert. Diese Ergebnisse basieren auf drei biologischen Replikaten.

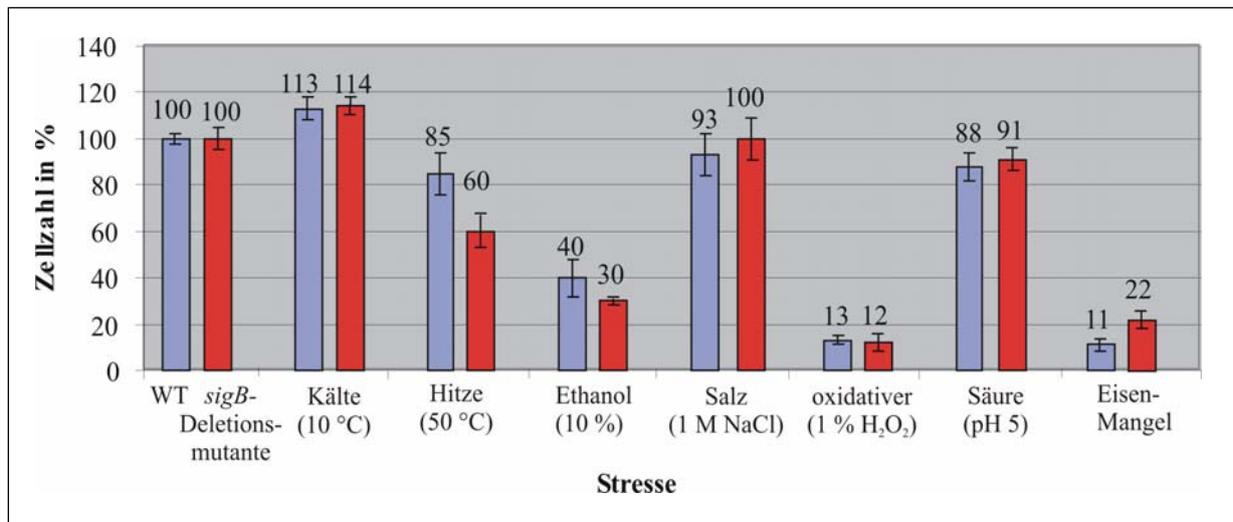


Abb. IV.4: Lebendtitrierbestimmung der *sigB*-Mutante (rote Säule) im Vergleich zum Wildtyp (blaue Säule). Verwendete Stresse: Kälte- (10 °C), Hitze- (50 °C), Ethanol- (10 % (v/v)), Salz- (1 M NaCl), oxidativer- (1 % (v/v) H₂O₂), Säurestress (pH 5) und Eisenmangel

Nach der Applikation des jeweiligen Stresses ist lediglich beim Hitzeschock, Ethanolstress und Eisenmangel ein deutlicher Unterschied in der Überlebensrate zwischen dem Wildtyp und der *sigB*-Deletionsmutante zu erkennen. Dabei reagiert die *sigB*-Deletionsmutante in zwei von drei Fällen sensibler auf den jeweiligen Stress als der Wildtyp. Lediglich beim Eisenmangel ist die Überlebensrate mit 22 % doppelt so hoch wie beim Wildtyp.

Nach der Applikation der anderen Stresse, wie Kälte-, Salz- und Säurestress, blieb die Überlebensrate bei annähernd 100 %. Dieses ist zum einen durch eine zu geringe Konzentration des Stresses zu erklären und zum anderen durch die jeweilige Stressantwort des Organismus, dessen Ausbildung vermutlich *sigB*-unabhängig erfolgt.

Damit konnte durch Expressionsanalysen und durch Lebendtitertests gezeigt werden, dass der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB an der Stressantwort nach Kälte-, Hitze- und Ethanolstress von *C. glutamicum* beteiligt ist.

1.4 Vergleichende Wachstumsanalysen des Wildtyps und der *sigB*-Deletionsmutante mittels Schüttelkolbenkultivierung

Aus anderen Organismen ist bekannt, dass nicht-essentielle Sigmafaktoren nicht nur an der Stressantwort beteiligt sind, sondern ebenfalls eine wichtige Funktion in der Wachstumsphasenregulation aufweisen. Um zu prüfen, ob der Sigmafaktor SigB ebenfalls an der Wachstumsphasenregulation beteiligt ist, wurde das Wachstumsverhalten des Wildtyps mit dem der *sigB*-Deletionsmutante mittels Schüttelkolbenkultivierung verglichen. Für diese

Kultivierung wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Von dieser exponentiell wachsenden Vorkultur wurden 2×10^8 Zellen in frisches Minimalmedium überimpft und anschließend wurde das Wachstum der Kulturen durch Bestimmung der optischen Dichte, über einen Zeitraum von 90 Stunden gemessen. Zur statistischen Absicherung der Daten wurden jeweils sechs parallele Ansätze durchgeführt.

In der folgenden Abbildung IV. 5 sind die Wachstumsverläufe der *sigB*-Deletionsmutante und des Wildtyps dargestellt.

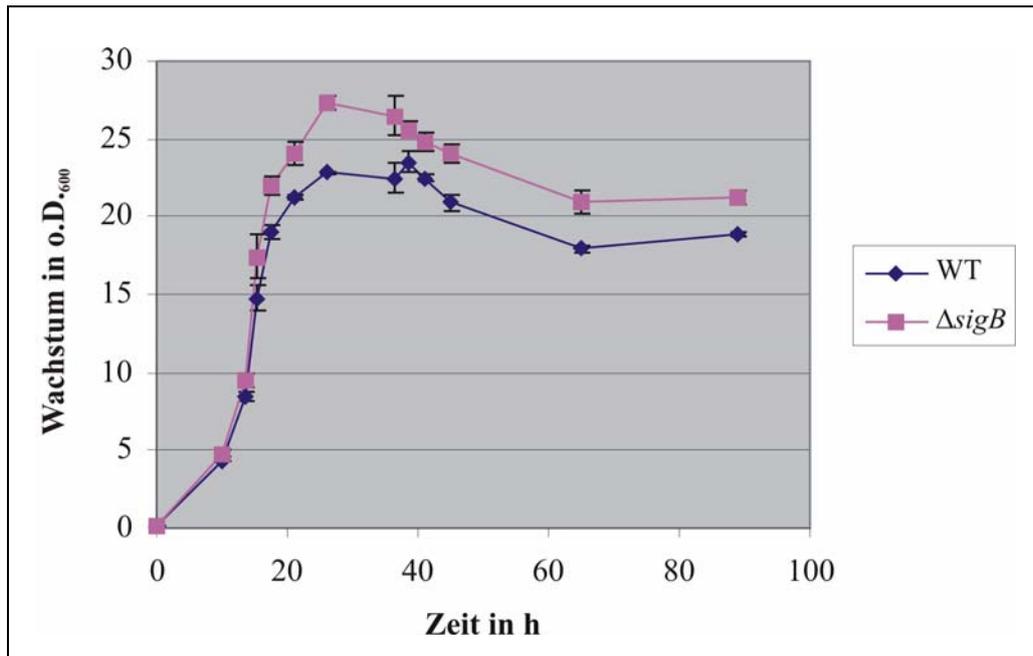


Abb. IV.5: Wachstumsverhalten des Wildtyps und der *sigB*-Deletionsmutante in Minimalmedium MM1. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten.

Vergleichende Wachstumsanalysen der *sigB*-Deletionsmutante und des Wildtyps verdeutlichen eine gesteigerte optische Dichte der Mutantenkultur beim Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase. Dieses Phänomen wird bereits nach 17 h ersichtlich, da zu diesem Zeitpunkt der Wildtyp beginnt, seine Wachstumsrate zu verringern, während die *sigB*-Deletionsmutante weiter exponentiell wächst. Beim Übergang in die stationäre Phase erreicht der Wildtyp eine optische Dichte von 23, während die der *sigB*-Deletionsmutante bei 27 liegt. Diese Beobachtung ist ein erstes Indiz für eine wachstumsphasenabhängige Regulation, an der der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB aus *C. glutamicum* beteiligt sein könnte.

1.5 Vergleichende Wachstumsanalysen des Wildtyps und der *sigB*-Deletionsmutante mittels Schüttelkolbenkultivierung nach Stressapplikation

Ausgehend von den Ergebnissen der Expressionsanalysen des *sigB*-Gens und den Lebendtiternanalysen nach Stressapplikation konnte festgestellt werden, dass das *sigB*-Gen in die Regulation der Stressantwort der Zelle involviert ist. Außerdem konnte durch Schüttelkolbenkultivierungen gezeigt werden, dass SigB eventuell an der Wachstumsphasenregulation beteiligt ist.

Um diese beiden Erkenntnisse miteinander kombinieren zu können, wurden vergleichende Wachstumstests nach Stressapplikation durchgeführt. Bei den getesteten Stressen handelt es sich um dieselben, die bereits für die Expressionsanalyse und Lebendtiternbestimmung verwendet wurden.

Für diesen Versuch wurde sowohl der Wildtyp als auch die *sigB*-Deletionsmutante acht Stunden in Minimalmedium kultiviert. Dieses entspricht der exponentiellen Wachstumsphase. Nachdem die Kulturen die exponentielle Phase erreicht hatten, wurde der jeweilige Stress appliziert. Lediglich durch die Applikation von Kälte (15 °C) und Ethanol (10 % EtOH) konnten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem Wildtyp und der *sigB*-Deletionsmutante festgestellt werden. Aus diesem Grund wird auf die Wachstumsverläufe, die während der Applikation anderer Stresse aufgezeichnet wurden, im Weiteren nicht mehr eingegangen.

Beim Kälteschock wurde eine Temperatur von 15 °C vorgegeben. Dieser Versuch konnte nicht mit der Temperatur von 10 °C durchgeführt werden, wie bei den Versuchen zur Bestimmung der *sigB*-Expression und des Lebendtiters, da eine Kultivierung unter diesen Bedingungen mit den verwendeten Schüttlern nicht möglich war. Die Applikation des Ethanolstresses wurde während des exponentiellen Wachstums der *C. glutamicum*-Kultur durchgeführt. Dafür wurden 10 % (v/v) Ethanol dem Medium hinzugefügt.

Die aufgenommenen Daten ergaben die in den folgenden Abbildungen (Abb. IV.6 und Abb. IV.7) aufgezeigten Wachstumsverläufe.

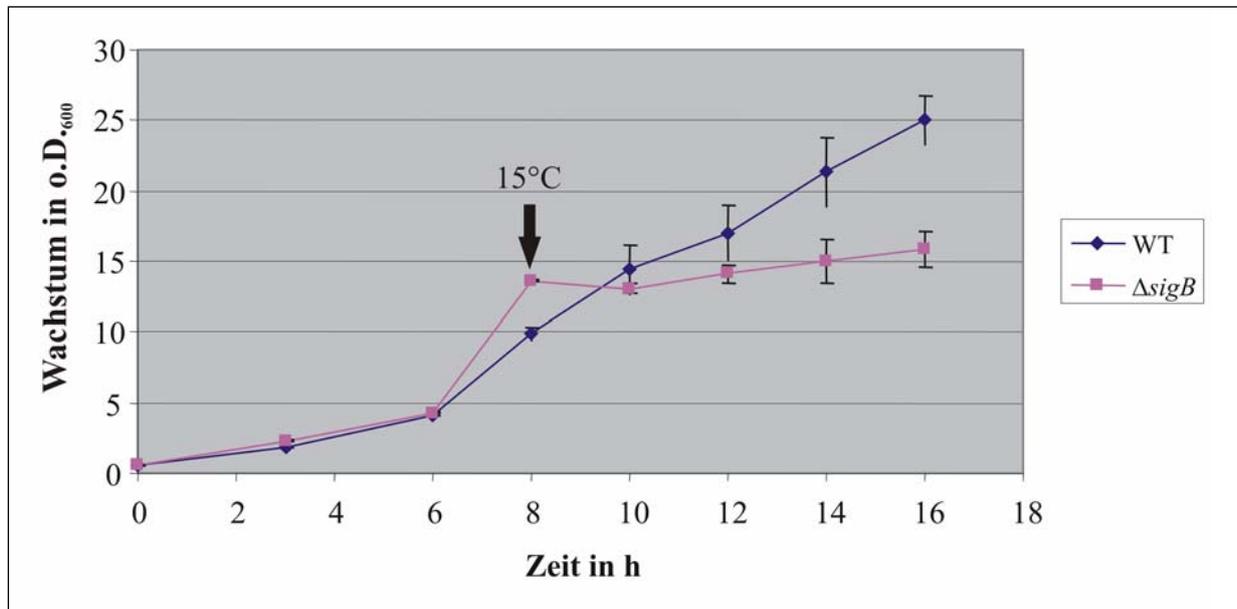


Abb. IV.6: Wachstumskurve der *sigB*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp bei 15 °C. Die Stressapplikation erfolgte während der exponentiellen Phase. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten.

Während der frühen exponentiellen Phase ähnelt sich das Wachstum beider Kulturen sehr. Nach sieben Stunden ist die verringerte Generationszeit der *C. glutamicum*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erkennbar. Initiiert man in der achten Kultivierungsstunde den Kältestress, indem die Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 15 °C verringert wird, so kommt es in der *sigB*-Deletionsmutante zu einer Abnahme der Teilungsrate. Die *sigB*-Deletionsmutante wird durch die Temperaturveränderungen so sehr gestört, dass sie das exponentielle Wachstum für ca. 2 Stunden einstellt und anschließend deutlich verlangsamt weiter wächst. Nach 16 Stunden erreicht die *sigB*-Deletionsmutante lediglich eine optische Dichte von 16, während der Wildtyp in derselben Zeit eine optische Dichte von 25 erreicht. Nach demselben Verfahren wurde der Versuch mit 10 % Ethanol als Stressfaktor durchgeführt. Wiederum wurden beide Stämme acht Stunden in MM1-Medium bei 30 °C kultiviert und anschließend Ethanol appliziert. Das Wachstumsverhalten beider Kulturen wurde ebenfalls über die Zeit bestimmt (Abb. IV.7).

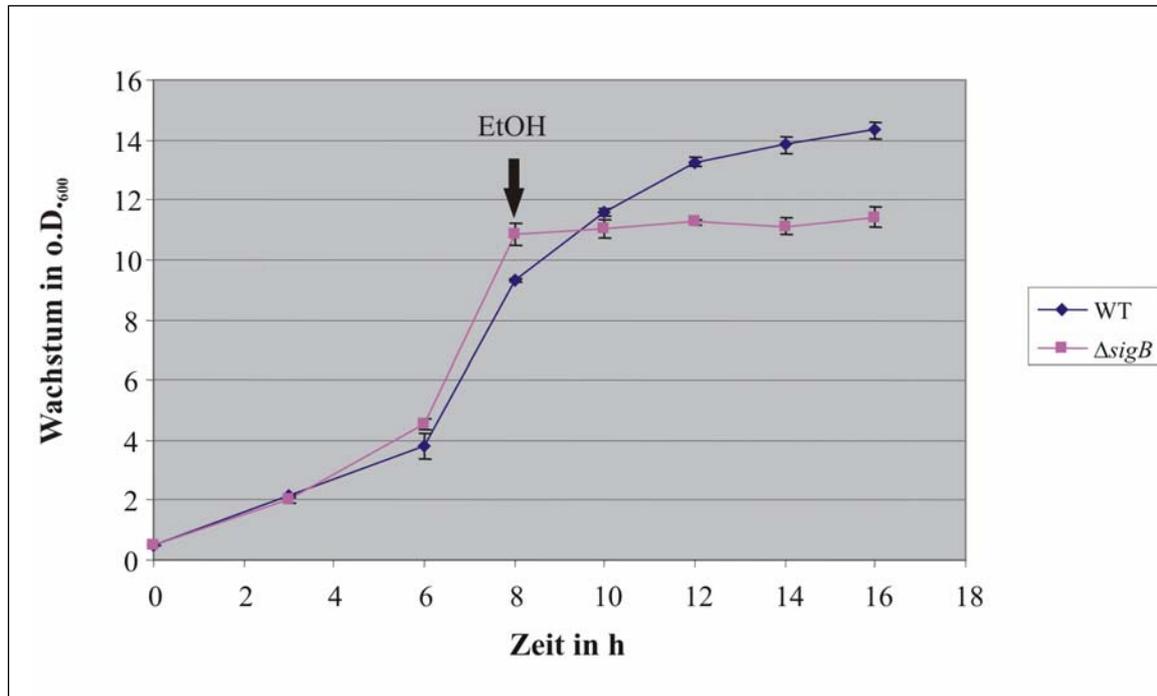


Abb. IV.7: Wachstumskurve der *sigB*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp bei Zugabe von 10 % (v/v) Ethanol. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten.

Während der Kultivierung von *C. glutamicum* RES167 und *C. glutamicum* CL1 in Anwesenheit von 10 % (v/v) Ethanol zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach der Kältestressapplikation. Nach Zugabe des Ethanols zeigten beide Stämme eine Verringerung der Teilungsrate. Dieses wird besonders an der *sigB*-Deletionsmutante deutlich, bei der nur noch eine geringe Teilungsrate festzustellen ist. Der Wildtyp wächst bis zu einer optischen Dichte von 14 weiter, während die *sigB*-Deletionsmutante lediglich eine optische Dichte von 11 erreicht.

Durch diesen Versuch konnte somit verdeutlicht werden, dass die verstärkte Expression des *sigB*-Gens, die nach Stressapplikation erfolgt, ebenfalls einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zelle aufweist.

1.6 Untersuchungen der *sigB*-Expression im Verlauf einer Wachstumsphase

Anhand der durchgeführten Experimente läßt sich die Vermutung äußern, dass SigB an der Wachstumsphasenregulation in *C. glutamicum* beteiligt ist. Um dieses weiter belegen zu können, wurde das Expressionsprofil des *sigB*-Gens während einer Kultivierung im Schüttelkolben mittels *real-time* RT-PCR bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde *C. glutamicum* RES167 in Minimalmedium MM1 kultiviert. Während der einzelnen Wachstumsphasen wurden Proben für die RNA-Isolierung gewonnen

(Abb. IV.8A). Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus Kulturproben, die zu sechs verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, isoliert und die Genexpression des *sigA*- und des *sigB*-Gens mittels *real-time* RT-PCR gemessen (Abb. IV.8B).

Zur statistischen Absicherung der Expressionsdaten wurde die RNA aus drei separaten Anzuchten gewonnen. Die Expression des *sigB*-Gens wurde so durch zwei technische Replikate für jeden Zeitpunkt sechsfach bestimmt. Um die jeweiligen Messungen der zu unterschiedlichen Wachstumsphasen gewonnenen Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die Expression des *sigB*-Gens während der exponentiellen Wachstumsphase, bei einer optischen Dichte von sieben, auf den Expressionsfaktor eins gesetzt.

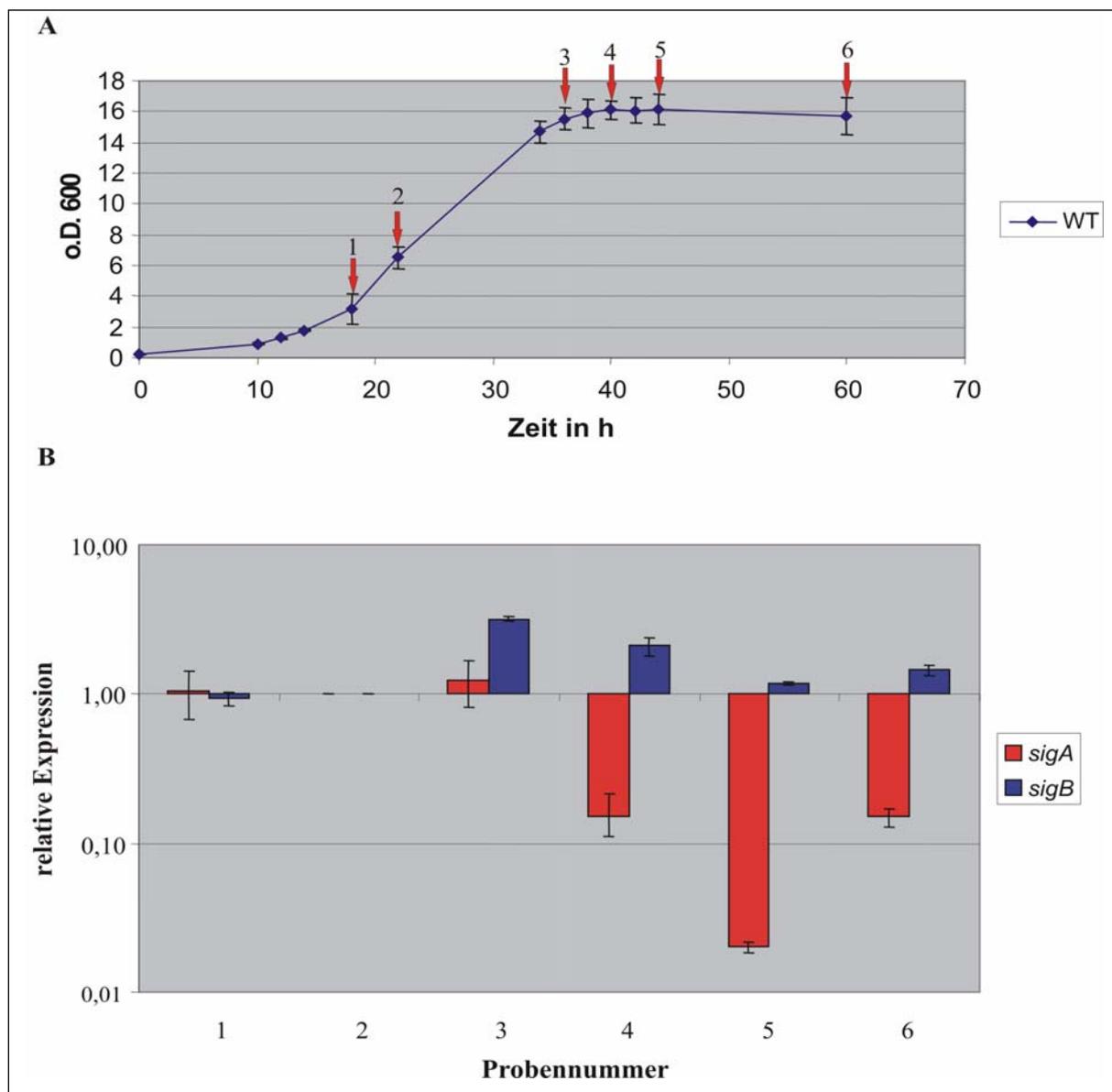


Abb. IV. 8: Wachstum von *C. glutamicum* RES167 in Minimalmedium MM1 und Expression der Sigmafaktorgene *sigA* und *sigB*. **A)** Wachstumsverlauf: Die Pfeile mit den jeweiligen Nummern bezeichnen die Punkte, an denen die RNA-Isolierung durchgeführt wurde. **B)** Relative Expression des *sigA*- und des *sigB*-Gens zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums. Die Nummern entsprechen denen aus dem Wachstumsverlauf.

Aus der Abb. IV.8 B wird ersichtlich, dass die Expression von *sigA* während der exponentiellen Phase annähernd konstant bleibt. Eine deutliche Abnahme der Genexpression von *sigA* um den Faktor 5-10 lässt sich beim Übergang der Kultur in die stationäre Phase erkennen. Im weiteren Verlauf dieser Messreihe bleibt die Expression von *sigA* stark reduziert. Die Expression des *sigB*-Gens verhält sich allerdings nicht konform zu der des *sigA*-Gens. Während der exponentiellen Phase bleibt das Expressionsprofil von *sigB* annähernd gleich. Kurz vor dem Übergang von der exponentiellen Phase in die Stationärphase (Probe Nr. 3) kommt es zu einem Anstieg der *sigB*-Expression. Zu diesem Zeitpunkt wird außerdem das Maximum von einer 3fach höheren Expression im Vergleich zur exponentiellen Phase (Probe Nr. 2) erreicht. Im weiteren Verlauf der Stationärphase nimmt die Expression des *sigB*-Gens wieder ab, bleibt jedoch im Vergleich zur exponentiellen Phase signifikant verstärkt exprimiert.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Expression der *sigB*-Gens wachstumsphasenabhängig beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase erfolgt.

1.7 Identifizierung der Wachstumsphasenregulation durch eine *sigB*-Überexpression

Ausgehend von den durchgeführten Schüttelkolbenexperimenten konnte gezeigt werden, dass das *sigB*-Gen beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase verstärkt exprimiert wird. Durchgeführte Wachstumsvergleiche des Wildtyps mit der *sigB*-Deletionsmutante konnten verdeutlichen, dass diese eine höhere Zellzahl erreicht als der Wildtyp. Zur weiteren Analyse dieses Ergebnisses, wurde ein plasmid-tragender *C. glutamicum*-Stamm erstellt (*C. glutamicum* CL2), in dem die Expression des *sigB*-Gens durch IPTG-Zugabe induziert werden kann. Dabei dienten die Plasmide pBHK18 (*low-copy*-Replikationsursprung) und pEC-XK99E (Expressionskassette) als Bausteine für das IPTG-induzierbare *low-copy*-Expressionssystem (Abb. IV.9). Das *sigB*-Gen wurde ohne den nativen Promotor hinter den IPTG-induzierbaren P_{trc} -Promotor kloniert. Somit konnte ein *low-copy*-Expressionsplasmid generiert werden, in dem das *sigB*-Gen unter der Kontrolle des P_{trc} -Promotors steht.

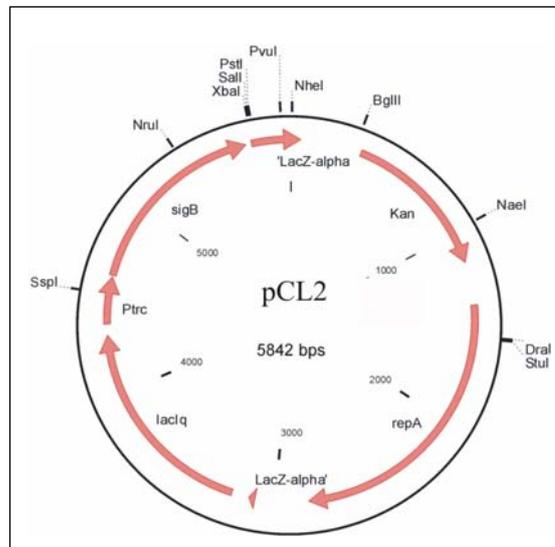


Abb. IV.9: Restriktionskarte des Plasmids pCL2. Das *sigB*-Gen steht unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren P_{trc} -Promotors.

Bei vergleichenden Wachstumsanalysen des Stammes *C. glutamicum* CL3, der das Expressionsplasmid ohne *sigB*-Gen trägt und somit als Kontrolle fungiert, mit *C. glutamicum* CL2 konnte ohne IPTG-Zugabe kein Wachstumsunterschied festgestellt werden. Durch die Zugabe von IPTG während des exponentiellen Wachstums kommt es dagegen zur Überexpression des *sigB*-Gens (Abb. IV.10). Dieses hat zur Folge, dass das exponentielle Wachstum von *C. glutamicum* CL2 unterbrochen wurde. Bei *C. glutamicum* CL3 konnte nach IPTG-Zugabe kein Unterschied beim exponentiellen Wachstum festgestellt werden.

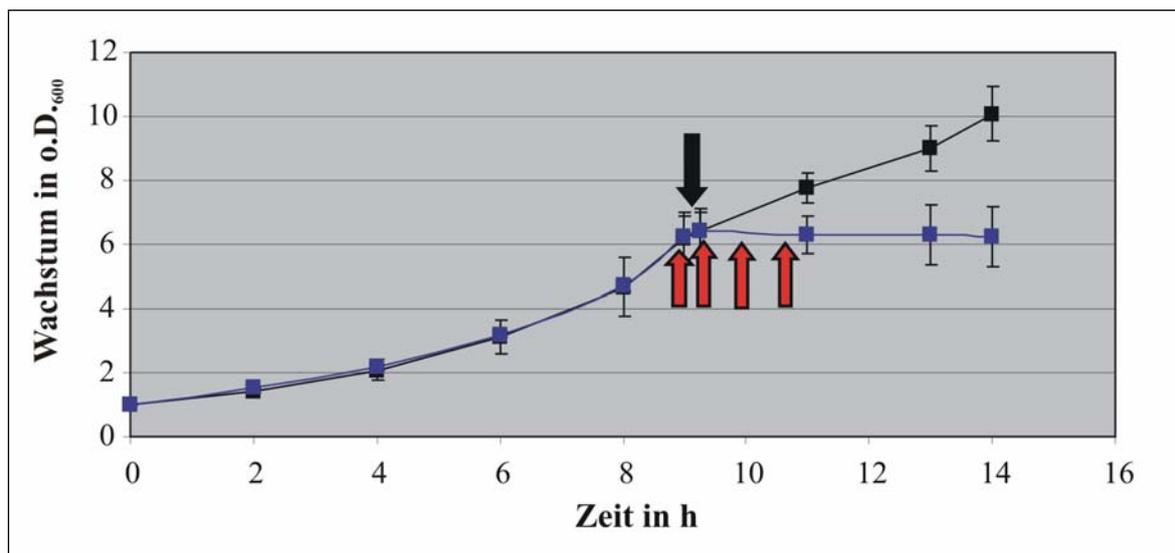


Abb. IV.10: Vergleichende Wachstumsanalyse von *C. glutamicum* CL3 (schwarze Kurve) mit *C. glutamicum* CL2 (blaue Kurve). Der schwarze Pfeil verdeutlicht den Zeitpunkt (nach 9 h) der IPTG-Zugabe. Die roten Pfeile verdeutlichen die Zeitpunkte der Probenahme (vor, 15 min, 60 min und 90 min nach IPTG-Zugabe), an denen die Expression des *sigB*-Gens durch *real-time* RT-PCR bestimmt wurde. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei biologischen Replikaten.

Während der IPTG-Zugabe wurden beide Stämme über einen Zeitverlauf (vor, 15, 60 und 90 min) beprobt und die relative Expression des *sigB*-Gens mittels *real-time* RT-PCR bestimmt. Diese Expressionsanalysen konnten verdeutlichen, dass die Transkriptionsrate des *sigB*-Gens 15 min nach IPTG-Zugabe um das 1,5fache steigt. Nach 60 min, wenn *C. glutamicum* CL2 das Wachstum einstellt, konnte eine Verdopplung der Expression des *sigB*-Gens gemessen werden. Die höchste Expression erreichte das *sigB*-Gen 90 min nach IPTG-Zugabe. Die Expression liegt 3,3fach höher als die zum Zeitpunkt vor der IPTG-Zugabe. Die Messung der Expressionsrate nach IPTG-Zugabe in *C. glutamicum* CL3 zeigte keine Veränderung hinsichtlich der Expression von *sigB* über den genannten Zeitablauf.

Betrachtet man die Expressionsrate des *sigB*-Gens in Abwesenheit von IPTG, so kann eine 10fach verstärkte *sigB*-Expression im Verhältniss zum Wildtyp gemessen werden (Tab.IV.1). Diese wird nach IPTG-Zugabe auf das 3fache gesteigert.

Stamm	relative <i>sigB</i> -Expression
Wildtyp (exponentielle Phase)	1
<i>C. glutamicum</i> CL2 vor IPTG-Zugabe	10,41
<i>C. glutamicum</i> CL2 60 min nach IPTG-Zugabe	20,67
<i>C. glutamicum</i> CL2 90 min nach IPTG-Zugabe	33,59

Tab. IV.1: Relative Expression des *sigB*-Gens im Wildtyp und der *C. glutamicum* CL2 vor, 60 min und 90 min nach IPTG-Zugabe. Die Expression des *sigB*-Gens im Wildtyp wurde auf 1 normiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte verifiziert werden, inwiefern der nicht-essentielle Sigmafaktor *sigB* aus *C. glutamicum* sowohl an der Stressantwort, als auch an der Wachstumsphasenregulation beteiligt ist. Durch Expressionsanalysen, Titerungstests und Schüttelkolbenexperimente konnte gezeigt werden, dass *sigB* nach Applikation von Kälte- und Ethanolstress in die Stressantwort involviert ist. Außerdem konnte veranschaulicht werden, dass die Expression des *sigB*-Gens beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase induziert wird und eine Überexpression des *sigB*-Gens das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* negativ beeinflusst.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung und Analyse des SigB-abhängigen Regulons, das für die Wachstumsphasenregulation notwendig ist. Damit dieses Regulon mittels DNA-Microarray-Hybridisierungen identifiziert werden konnte, mussten Versuchsparameter definiert werden, die es ermöglichen, *C. glutamicum* stressfrei über die Wachstumsphase zu kultivieren. Ausgehend von den bereits durchgeführten Experimenten

konnte davon ausgegangen werden, dass diese Versuchsparameter nicht für die Identifizierung des SigB-Regulons geeignet sind.

Betrachtete man sich die Ergebnisse der *sigB*-Überexpression, so ließ sich feststellen, dass die Expression des *sigB*-Gens bereits ohne IPTG-Zugabe durch den P_{trc} -Promotor erfolgte. Zur Detektion des SigB-Regulons war dieses System somit nicht geeignet, da das SigB-Regulon bereits durch die Basal-Expression von *sigB* exprimiert wurde. Eine Expressionssteigerung der durch SigB transkribierten Gene war somit nach IPTG-Zugabe nur bedingt detektierbar.

Der zweite Versuch, durch den die Bestimmung des SigB-Regulons möglich wäre, ist der Vergleich einer Schüttelkolbenkultivierung von *C. glutamicum* und der *sigB*-Deletionsmutante. Aufgrund der Tatsache, dass während einer Schüttelkolbenkultivierung der Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase nicht genau bestimmt werden kann, war auch dieses System für die Charakterisierung des SigB-Regulons nur bedingt einsetzbar. Ein weiteres Problem bei diesem Versuch sind die unterschiedlichen Wachstumsraten zwischen dem Wildtyp und der *sigB*-Deletionsmutante. Somit ist nur bedingt detektierbar, ob sich beide Kulturen in derselben Wachstumsphase befinden. Dieses erschwert die Probenname in der *sigB*-Deletionsmutante, in der ebenfalls dieselben Zeitpunkte verglichen werden müssen, damit Gene, die nicht durch SigB reguliert werden, aus dem Datensatz entfernt werden können.

2 Identifizierung des SigB-Regulons von *C. glutamicum*

Ausgehend von den Ergebnissen, die mittels Schüttelkolbenkultivierung gewonnen wurden, ließ sich feststellen, dass SigB sowohl an der Stressantwort als auch an der Wachstumsphasenregulation beteiligt ist. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Aufklärung der Wachstumsphasen-abhängigen *sigB*-Expression gelegt. Um diese Fragestellung beantworten zu können war es notwendig, die Expression des *sigB*-Gens über die Wachstumsphasen in einem möglichst Stress-armen System zu bestimmen.

Aus diesem Grund musste eine Kultivierungsmethode von *C. glutamicum* etabliert werden, in der das Vorhandensein von Wachstumsphasen-abhängigen Stressen minimiert werden kann. Außerdem sollte durch diese Kultivierungsmethode der Eintritt der Kultur in die stationäre Phase exakt detektierbar sein.

Bei der verwendenden Kultivierungsmethode handelte es sich um die Glukose-limitierte *batch*-Fermentation.

2.1 Glukose-limitierte *batch*-Fermentation von *C. glutamicum* und Bestimmung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit μ sowie der Verdopplungszeit t_d

Während einer Kultivierungsphase von *C. glutamicum* im Schüttelkolben kommt es zur Einwirkung unterschiedlichster Stresse. Bei diesen Stressen handelt es sich zum einen um Temperaturschwankungen, Veränderungen im pH-Wert und unterschiedlich hohe Sauerstoffsättigungen im Medium. Um diesen Stressen entgegen wirken zu können, wurden die zu vergleichenden *C. glutamicum*-Stämme in einem 7 Liter-Bioreaktor mit 5 Liter-Arbeitsvolumen kultiviert. Eine umfassende Geräteperipherie diente hierbei der Aufrechterhaltung der optimalen Bedingungen des Mikroorganismenwachstums sowie der Messung analytischer Parameter zur Verfolgung der Fermentation. Der Sauerstoffpartialdruck, der bei einer Konzentration von 30 % gehalten wurde, wurde über die Rührerdrehzahl geregelt. Des weitern wurde der pH-Wert durch Zugabe von 2 M NaOH bzw. 10 % H_3PO_4 konstant auf 7 eingestellt. Die Temperatur des Mediums wurde über die gesamte Kultivierung bei 30 °C gehalten. Da es sich bei dieser Fermentation um eine Glukose-limitierte Fermentation handelt, wurde die Kultur in MM1 mit einer Glukoseanfangskonzentration von 25 g/L fermentiert.

Aufgrund dieser Kultivierungsart war es möglich, durch verschiedene Sonden die Parameter Temperatur, Druck, Begasung, pH, CO₂ und pO₂ automatisch aufzuzeichnen. Die optische Dichte und der Glukosegehalt wurden jedoch manuell erfasst. Durch diese Parameter war es in Echtzeit möglich, den Übergang des *C. glutamicum*-Stamms vom exponentiellen Wachstum in die stationäre Phase zu detektieren und reproduzierbare Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeiten einzelner Stämme zu geben.

Während der Kultivierung wurden ebenfalls Proben zur RNA-Isolierung gewonnen, und das Expressionsprofil von *sigA* und *sigB* wurde über den Wachstumsverlauf bestimmt.

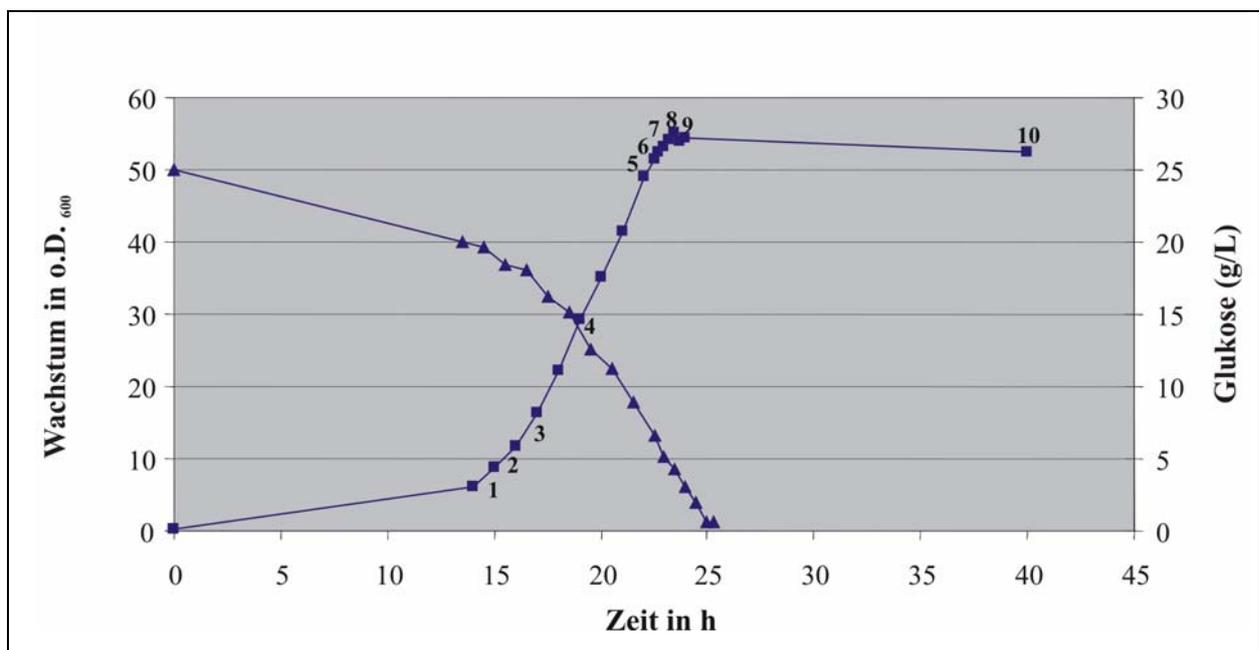


Abb. IV.11: Glukose-limitierte *batch*-Fermentation von *C. glutamicum* RES167 mit 25 g/L Glukose in MM1-Medium. Die Dreiecke geben den Gehalt an Glukose über den Wachstumsverlauf an (g/L); Die Quadrate symbolisieren die Zeitpunkte, zu denen die o.D. der Kultur bestimmt wurde. Die Nummern verdeutlichen die Punkte, an denen Proben für die RNA-Isolierung gewonnen wurden.

In der Abbildung IV.11 ist der Wachstumsverlauf von *C. glutamicum* RES167 während einer *batch*-Fermentation mit 25 g/L Glukose als Kohlenstoffquelle dargestellt. Anhand der Glukosemenge im Medium lässt sich der Übergang der Zellen von der exponentiellen in die stationäre Phase detektieren. Des Weiteren lässt sich anhand des exponentiellen Wachstums die maximale Wachstumsgeschwindigkeit, die ebenfalls zur Charakterisierung einzelner Stämme verwendet werden kann, bestimmen.

Aus der ermittelten Wachstumsgeschwindigkeit ließ sich die von den Mikroorganismen benötigte Verdopplungszeit t_d berechnen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = 0,2234h^{-1} = 3,1 \pm 0,2h^{-1}$$

So konnte für *C. glutamicum* RES167 die spezifische Verdopplungszeit von $3,1 \text{ h}^{-1}$ im verwendeten Fermenter bestimmt werden.

Des Weiteren wurde sowohl während der exponentiellen Phase, der Transitionsphase und der stationären Phase die Kultur beprobt und die Expression der Sigmafaktorgene *sigA* und *sigB* mittels *real-time* RT-PCR bestimmt (Abb.IV.12). Ausgehend von den Schüttelkolbenexperimenten sollte verglichen werden, ob die unterschiedlichen Kultivierungsmethoden Auswirkungen auf das Expressionsprofil von *sigA* und *sigB* über den Wachstumsverlauf haben.

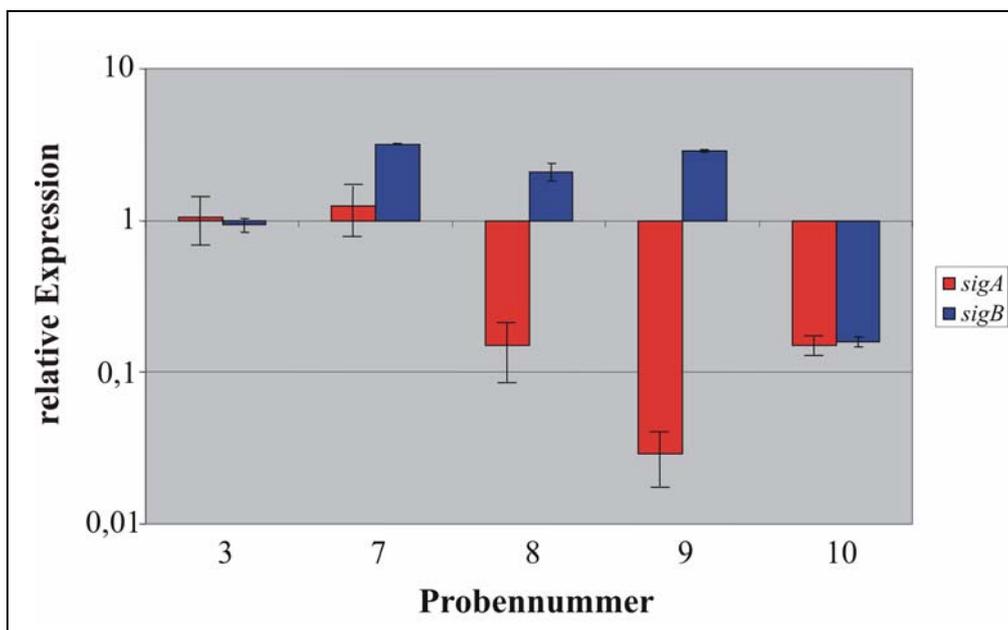


Abb. IV.12: Wachstumsphasen-abhängige Variation des intrazellulären Levels der *sigA*- und *sigB*-mRNA. Mittels *real-time* RT-PCR-Analysen konnten die Transkriptionsraten des *sigA*-Gens (rot) als auch des *sigB*-Gens (blau) während unterschiedlicher Wachstumsphasen bestimmt werden. Die Probennummern entsprechen unterschiedlichen Zeitpunkten der *batch*-Fermentation (Abb. IV.11). Die relative Expression wurde auf das exponentielle Wachstum normiert (Probe 4 der Fermentation).

Die Abbildung IV.12 veranschaulicht das Ergebnis der *real-time* RT-PCR der Gene *sigA* und *sigB* zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung von *C. glutamicum* RES167 verglichen mit der frühen exponentiellen Wachstumsphase.

Auch während der Kultivierung von *C. glutamicum* mittels *batch*-Fermentation lässt sich eine konstante Expression des *sigA*-Gens während der exponentiellen Wachstumsphase feststellen, die beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase signifikant verringert wird. Dieselbe RNA wurde ebenfalls benutzt, um das Expressionsprofil von *sigB* über den Wachstumsverlauf zu detektieren. Auch hier zeigten sich im Vergleich zum Schüttelkolbenexperiment

keinerlei Unterschiede. Die Expressionsrate des *sigB*-Gens wurde beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase erhöht (3,2fach) exprimiert.

Durch die *online*-Bestimmung des Glukosegehalts während der *batch*-Fermentation konnte festgestellt werden, dass das Expressionsmaximum des *sigB*-Gens in der Übergangsphase von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase lag.

2.2 Glukose-limitierte *batch*-Fermentation von *C. glutamicum* CL1 und Bestimmung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit μ sowie der Verdopplungszeit t_d

Damit die Auswirkung der *sigB*-Deletion auf das Wachstumsverhalten der Mutante mit dem des Wildtyps verglichen werden konnte, musste dieser Stamm unter äquivalenten Bedingungen mittels *batch*-Fermentation kultiviert werden, wie für den Wildtyp unter 2.1 beschrieben.

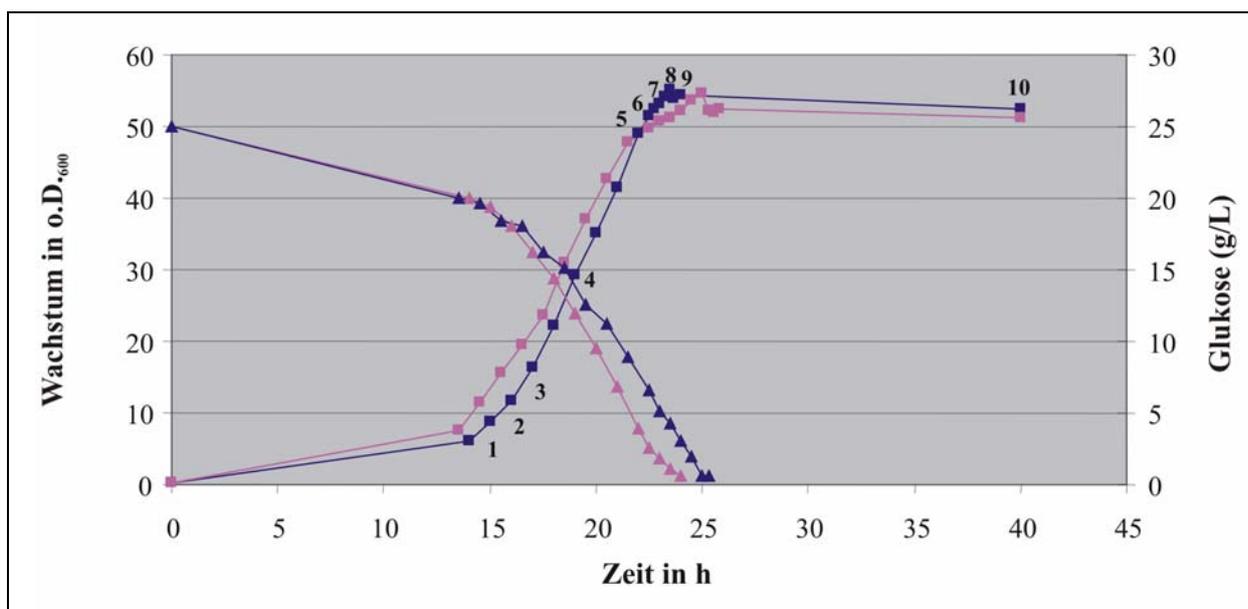


Abb. IV.13: Glukose-limitierte *batch*-Fermentation von *C. glutamicum* RES167 (blau) und *C. glutamicum* CL1 (rosa) mit 25 g/L Glukose in MM1-Medium. Die Dreiecke geben den Gehalt an Glukose über den Wachstumsverlauf an (g/L). Die Quadrate symbolisieren die Zeitpunkte, zu denen die o.D. der Kultur bestimmt wurde. Die Nummern verdeutlichen die Punkte, an denen Proben für die RNA-Isolierung gewonnen wurden.

Aus der Abbildung IV.13 lässt sich erkennen, dass die Deletion des *sigB*-Gens lediglich eine geringe Auswirkung auf das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* CL1 aufweist. Durch die Bestimmung der spezifischen maximalen Wachstumsgeschwindigkeit μ lässt sich die Verdopplungszeit t_d errechnen.

Somit läßt sich aus der ermittelten Wachstumsgeschwindigkeit von $0,14 \text{ h}^{-1}$ folgende Verdopplungszeit t_d berechnen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = 0,265 \text{ h}^{-1} = 2,62 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$$

Vergleicht man die beiden Verdopplungszeiten, so fällt auf, dass diese im Wildtyp 3,1 h beträgt, während die $\Delta sigB$ -Mutante eine verkürzte Verdopplungszeit von 2,62 h aufweist. Somit ist anzunehmen, dass die Deletion des *sigB*-Gens eine positive Auswirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *C. glutamicum* hat.

Des Weiteren wurde sowohl während der exponentiellen Phase als auch in der Transitionsphase und der stationären Phase die Kultur beprobt und die Expression des Sigmafaktorgens *sigA* mittels *real-time* RT-PCR bestimmt (Abb.IV.14).

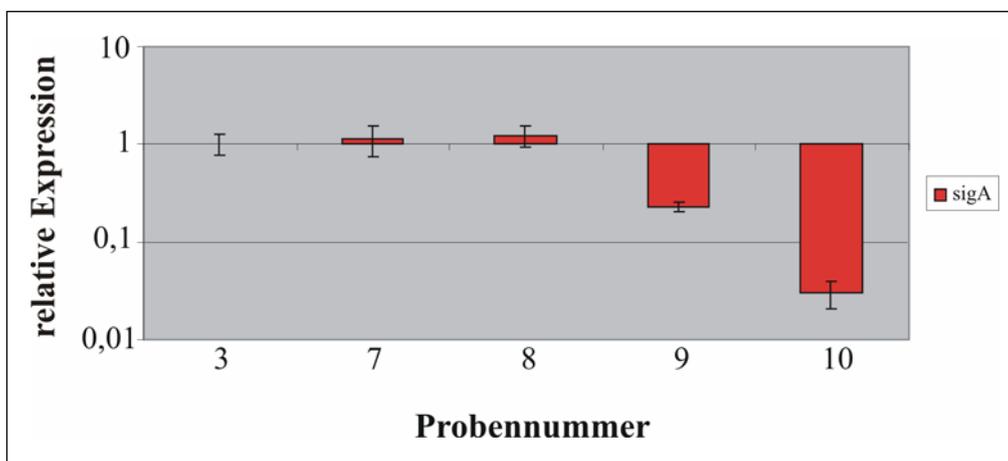


Abb. IV.14: Wachstumsphasen-abhängige Variation des intrazellulären Levels der *sigA*-mRNA. Mittels *real-time* RT-PCR-Analysen konnten die Transkriptionsraten des *sigA*-Gens während unterschiedlicher Wachstumsphasen bestimmt werden. Die Probennummern entsprechen unterschiedlichen Zeitpunkten der *batch*-Fermentation (Abb. IV.13). Die relative Expression wurde auf das exponentielle Wachstum normiert (Probe 4 der Fermentation).

Während des exponentiellen Wachstums der $\Delta sigB$ -Mutante konnte eine kontinuierliche Expression des *sigA*-Gens gemessen werden. Während der Transitionsphase (Probennummer 8) wurde kein Rückgang der *sigA*-Expression detektiert. Die Transkriptmenge des *sigA*-Gens blieb in der *sigB*-Deletionsmutante konstant und fiel erst während der stationären Phase auf einen Minimalwert zurück.

3 Charakterisierung des SigB-Regulons von *C. glutamicum* mittels vergleichender Gesamtgenom-DNA-Microarrayanalyse

Zur globalen Analyse des Transkriptoms eines Bakteriums ist die Microarray-Technologie eine gute Möglichkeit. Hierbei wird die Eigenschaft von einzelsträngigen Nukleinsäuren, spezifische Basenpaarungen mit komplementären DNA-Sequenzen einzugehen, genutzt. Während der Hybridisierung binden markierte Nukleinsäuren (Sonden) an ein DNA-Fragment auf einem festen Träger (Array) und ergeben ein definiertes Signal an einer definierten Stelle auf dem Array. Anhand der Ortsinformation und der Stärke des Signals kann man Rückschlüsse auf die Identität und die Transkriptmenge eines Gens ziehen. Auf einem Array können zwei verschiedene Proben hybridisiert werden, da sie mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Mit Hilfe der Programme ImaGene und EMMA (Dondrup *et al.*, 2003) können die Expressionsunterschiede anschließend identifiziert und quantifiziert werden.

3.1 Vergleichende transkriptionelle Analyse des *C. glutamicum*-Wildtyps während der exponentiellen Wachstumsphase und der Transitionsphase

Ausgehend von den Expressionsanalysen des *sigB*-Gens über den Wachstumsverlauf, die mittels *real-time*-RT-PCR bestimmt werden konnten, ließ sich die höchste Expressionsrate des *sigB*-Gens beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase feststellen. Da Sigmafaktoren jeweils spezifische Promotoren erkennen, wird das Regulon des jeweiligen Sigmafaktors nach dessen Translation exprimiert. Vergleicht man bestimmte Wachstumsphasen untereinander, z.B. die Transitionsphase, in der eine verstärkte Expression des Sigmafaktors erfolgt, mit der exponentiellen Phase, in der die Expression minimiert vorliegt, mittels Gesamtgenom-DNA-Microarrays, so lassen sich die Gene identifizieren, die einen Promotor tragen, an den der jeweilige Sigmafaktor binden kann.

Für die transkriptionelle Analyse des Wildtyps mittels Microarray-Technologie wurden jeweils zwei Kulturen parallel in Minimalmedium MM1 angezogen. Die Probengewinnung erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. IV.13 Nr. 4) und der Transitionsphase (Nr. 8). Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit. Anschließend wurde die Reinheit der RNA mittels PCR überprüft. Bei der Hybridisierung werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, Cy3 und Cy5. Aufgrund ihrer chemischen

Unterschiede können diese unterschiedlich gut detektieren werden. Um auszuschließen, dass sich methodische Fehler in diesem Teil der Auswertung befinden, wurde die bei der reversen Transkription erhaltene cDNA der biologischen Replikate in einer „Label-Umkehr“ markiert und für weitere Auswertungen zusammengefasst. Bei der Auswertung wird das Verhältnis der beiden Fluoreszenzfarbstoffe in einem *Spot* bestimmt. Dabei werden die gebräuchlichen Cyanin-Farbstoffe mit einer Wellenlänge von 550 nm (Cy3) und 649 nm (Cy5) angeregt. Der Hauptteil der dabei auftretenden Fluoreszenz wird mit Wellenlängen von 570 nm (Cy3) bzw. 670 nm (Cy5) abgestrahlt. Die detektierten Emissionsstärken werden als Grad der Schwärzung in einem 16-Bit-Graustufenbild (65536 Graustufen) protokolliert. Das Verhältnis beschreibt die Expressionsunterschiede des Gens in den beiden verglichenen Zuständen. Für die Spoterkennung der gescannten Arrays wurde das Programm ImaGene (Bio Discovery 5.0) genutzt. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm EMMA (Dondrup *et al.*, 2003). Dieses wurde sowohl für die Normalisierung mit der *LOWESS*- Funktion als auch für die statistische Auswertung (*t*-Test) der Daten verwendet. Diese Tests ermitteln unter Berücksichtigung der Datenvarianz der technischen und biologischen Replikate die Wahrscheinlichkeit, mit der davon ausgegangen werden kann, dass ein Gen unter den zwei verglichenen Zuständen unterschiedlich stark exprimiert ist. Für jedes Gen erhält man bei der Auswertung mit EMMA einen *a-value*, der die Signalstärke angibt, und einen *m-value*, welche die Differenz der Transkriptmengen vor und nach erhöhter Expression des *sigB*-Gens beschreibt. Diese Werte werden für einen ersten Überblick in einem *Scatterplot* dargestellt (Abb. IV.15), der das Ergebnis der Hybridisierung zeigt. Dabei symbolisiert jeder Datenpunkt in der Abbildung ein Gen. Gene mit einem *m*-Wert größer als 0,6 oder kleiner als -0,6 zeigen eine signifikante Veränderung der Genexpression während der Transitionsphase im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase (Hüser *et al.*, 2003). Aus technischen Gründen wurde die Signifikanzgrenze in diesem Experiment auf einen *m*-Wert von größer 1 und kleiner -1 gesetzt. Der *Scatterplot* wurde aus vier Microarrayexperimenten generiert, dabei wurden 16 Replikate pro Gen gemessen und nur solche als signifikant verändert betrachtet, die in mindestens 12 Replikaten signifikante Veränderungen in der Expression aufwiesen.

Unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass 111 Gene während der Transitionsphase signifikant verändert exprimiert sind. Davon konnten 66 Gene als signifikant verstärkt transkribiert und 45 Gene als signifikant geringer transkribiert identifiziert werden (Abb. IV.15).

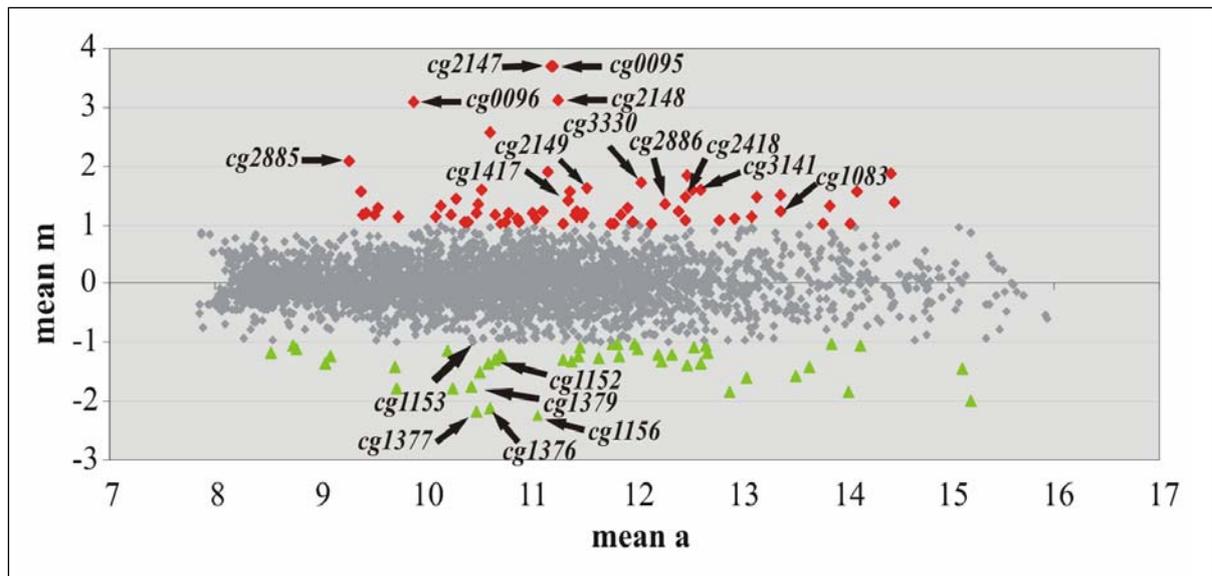


Abb. IV.15: Scatterplot des Microarray-Experiments von *C. glutamicum* RES167 Probe 8 gegen Probe 4 aus Abb. IV. 13. Dargestellt sind alle auf dem Array gespotteten Gene aus *C. glutamicum*. Schwarze Rauten symbolisieren Gene, die nicht signifikant verändert sind; rote Rauten symbolisieren Gene, die während der Transitionsphase (Probe 8) signifikant verstärkt exprimiert sind; grüne Rauten symbolisieren Gene, die während der Transitionsphase (Probe 8) signifikant verringert transkribiert werden. Die Pfeile verweisen auf Gene, auf die im weiteren Verlauf eingegangen wird.

Da Sigmafaktoren bestimmten Promotoren erkennen und so die Transkription des regulatorischen Netzwerks initiieren, richtet sich das Hauptaugenmerk bei der Suche des SigB-Regulons auf die Gene, die während der Transitionsphase verstärkt exprimiert werden. Ausgehend von den 111 signifikant verändert transkribierten Genen werden lediglich 66 Gene während der Transitionsphase verstärkt exprimiert. Um einen Überblick über die regulierten Gene zu bekommen, wurden die 10 Gene mit der stärksten Expression beim Übergang von der exponentiellen Phase zur stationären Phase in einer Tabelle dargestellt (Tab. IV.1). Eine vollständige Liste der verändert transkribierten Gene mit einem m -Wert von größer als 0,6 oder kleiner als $-0,6$, befindet sich im Anhang.

CDS	Gename	m-Wert	Annotation
<i>cg2147</i>	<i>bioY</i>	3,70	Membranprotein, BioY-Familie
<i>cg0095</i>	<i>bioB</i>	3,69	Biotinsynthase
<i>cg2148</i>		3,11	ABC Transporter, ATP-Bindeprotein
<i>cg0096</i>		3,08	Hypothetisches Protein
<i>cg0097</i>		2,57	Hypothetisches Protein
<i>cg2885</i>	<i>bioA</i>	2,09	Adenosylmethionin-8-amino-7-oxononoate Aminotransferase
<i>cg0291</i>		1,90	3,4-Dioxygenase- β -Untereinheit
<i>cg1129</i>	<i>aroF</i>	1,87	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonat-Aldolase
<i>cg1091</i>		1,85	Hypothetisches Protein
<i>cg3330</i>		1,71	Putatives, sekretiertes Protein

Tabelle IV.2: Übersicht über die 10 Gene, deren Expression während der Transitionsphase am stärksten gegenüber der exponentiellen Wachstumsphase ansteigt.

Zur genaueren Identifizierung der entsprechenden Gene und ihrer Funktion in *C. glutamicum* wurde mit Hilfe des Programms GenDB (Meyer *et al.*, 2003) deren Annotation überprüft. Hierbei fiel auf, dass es Unterschiede in der Expression von Genen aus dem Biotin-Stoffwechselweg gibt. Des Weiteren ließ sich eine Reihe von Regulatorgenen identifizieren. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Datensatz nicht nur ausschliesslich um das SigB-Regulon handelt, sondern dass es durch die Transkriptionsregulatoren zu Überlagerungen einzelner Regulons kommt.

Um diese vermischten Datensätze voneinander trennen zu können war es notwendig, weitere DNA-Microarray-Hybridisierungen durchzuführen, in denen dieselben Zustände in einer *C. glutamicum sigB*-Deletionsmutante miteinander verglichen werden.

3.2 Vergleichende transkriptionelle Analyse der *C. glutamicum sigB*-Deletionsmutante CL1 während der exponentiellen Wachstumsphase und der Transitionsphase

Ausgehend von den Transkriptomanalysen des *C. glutamicum* RES167-Stammes während der Transitionsphase, die mittels Gesamtgenom-DNA-Microarray durchgeführt wurden, ließ sich das SigB-abhängige Regulon nicht hinreichend charakterisieren. Da Sigmafaktoren die Transkription einzelner Gene initiieren, sollte das SigB-Regulon während der Transitionsphase in einer *sigB*-Deletionsmutante nicht exprimiert werden. Aus diesem Grund war es erforderlich, dass die *sigB*-Deletionsmutante ebenfalls mittels Glukose-limitierter *batch*-Fermentation kultiviert (Abb. IV.13) und die RNA-Proben während der exponentiellen Phase und der Transitions-phase gewonnen wurden. Dabei mußte darauf geachtet werden, dass Zeitpunkte für die Microarray-Hybridisierungen ausgewählt wurden, die denen für die

Microarray-Hybridisierungen des Wildtyps möglichst ähnlich sind. Durch diese Probenauswahl lassen sich Wachstumsphasen-bedingte Expressionsunterschiede minimieren. Die RNA-Isolierung und die anschließende DNA-Microarray-Hybridisierung wurde wie unter 3.1 beschrieben durchgeführt.

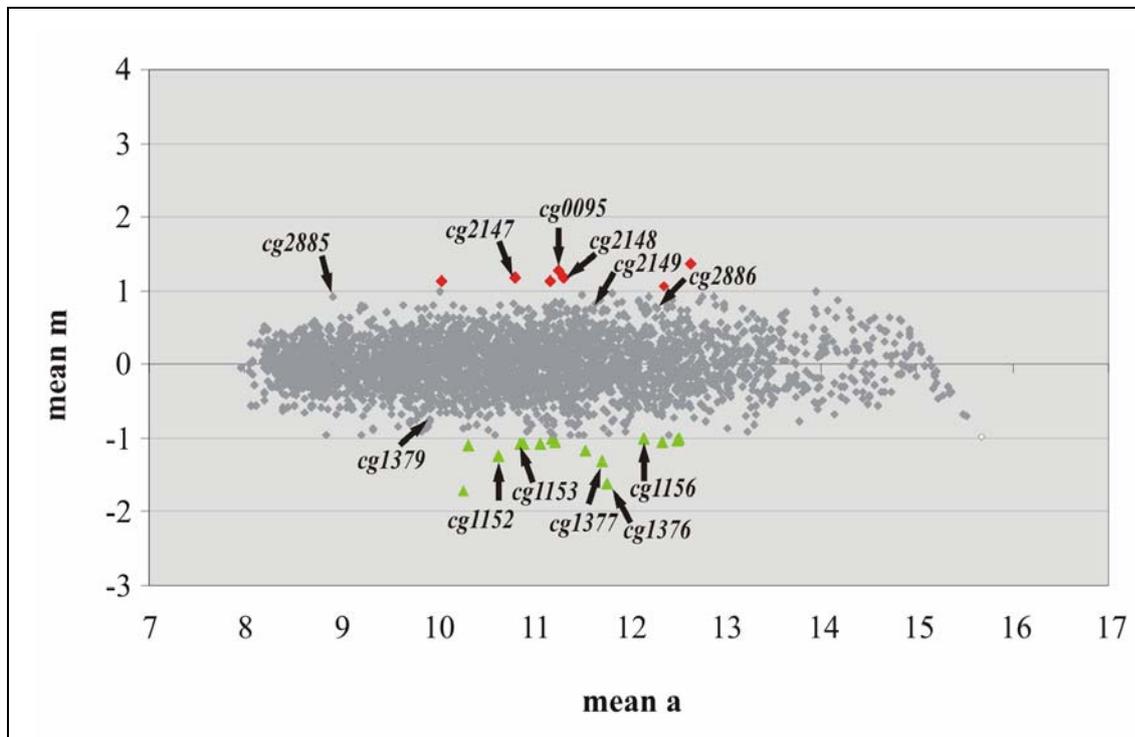


Abb. IV.16: Scatterplot des Microarray-Experiments der *C. glutamicum sigB*-Deletionsmutante (Probe 8 gegen Probe 4 aus Abb. IV.13). Dargestellt sind alle auf dem Array gespotteten Gene aus *C. glutamicum*. Schwarze Rauten symbolisieren Gene, deren Expression nicht signifikant verändert ist; rote Rauten symbolisieren Gene, die während der Transitionsphase (Probe 8) signifikant verstärkt exprimiert sind; grüne Rauten symbolisieren Gene, die während der Transitionsphase (Probe 8) signifikant vermindert transkribiert werden. Die Pfeile verweisen auf Gene, auf die im weiteren Verlauf eingegangen wird.

Das Ergebnis der Hybridisierung wird mittels Scatterplot verdeutlicht, wobei jeder Spot in der Abbildung ein Gen symbolisiert. Gene mit einem m-Wert größer als 1 oder kleiner als -1 zeigen eine signifikante Veränderung der Genexpression während der Transitionsphase im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase. Der Scatterplot wurde ebenfalls aus vier Microarrayexperimenten generiert. Dabei wurden 16 Replikate pro Gen gemessen und nur solche als signifikant verändert betrachtet, die in mindestens 12 Replikaten signifikante Veränderungen in der Expression aufwiesen.

Unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass 22 Gene der *sigB*-Deletionsmutante während der Transitionsphase signifikant verändert exprimiert sind. Davon konnten 7 Gene als signifikant verstärkt transkribiert und 15 Gene als signifikant verringert transkribiert identifiziert werden (Abb. IV.16).

Um einen groben Überblick über die regulierten Gene zu bekommen, wurden die 7 Gene, deren Expression am stärksten während des Übergangs in die stationäre Phase erfolgt, in einer Tabelle dargestellt (Tab. IV.2). Eine vollständige Liste der verändert transkribierten Gene mit einem m-Wert von größer als 0,6 oder kleiner als -0,6 befindet sich im Anhang.

CDS	Gename	m-Wert	Annotation	SigB unabhängige Expression
<i>cg0378</i>		1,61	Putatives Phagen-assoziiertes Protein	X
<i>cg0095</i>	<i>bioB</i>	1,55	Biotinsynthase	
<i>cg2147</i>	<i>bioY</i>	1,51	Membranprotein, BioY-Familie	X
<i>cg2148</i>		1,51	ABC-Transporter	X
<i>cg2485</i>	<i>phoD</i>	1,48	Phosphodiesterase	
<i>cg1227</i>		1,48	Putatives Membranprotein	X
<i>cg0160</i>		1,45	Hypothetisches Protein	

Tabelle IV.2: Übersicht über die 7 Gene, deren Expression während der Transitionsphase am stärksten ausfällt, ausgehend von der vergleichenden Hybridisierung von *C. glutamicum* CL1 während der Transitionsphase und der exponentiellen Phase. Gene deren Expression in der Transitionsphase SigB-unabhängig erfolgt wurden mit einem X markiert.

Aufgrund der Tatsache, dass das Hybridisierungsexperiment in einer *sigB*-Deletionsmutante durchgeführt wurde, kann das SigB-Regulon beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase nicht exprimiert werden. Betrachtet man die Gene, deren Expression am stärksten erfolgt genauer, so lassen sich einige Gene identifizieren, die sowohl im Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante beim Übergang in die stationäre Phase verstärkt exprimiert werden. Setzt man die Suche nach ORFs fort, die sowohl im Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante beim Übergang zur stationären Phase verstärkt exprimiert werden, so lassen sich 22 Gene identifizieren. Diese Gene können nicht dem SigB-Regulon angehören, somit verringert sich die Anzahl der SigB regulierten Gene von 66 auf 44. Die vollständige Liste mit den 44 verstärkt transkribierten Gene befindet sich im Anhang.

Betrachtet man ebenfalls die Gene, die sowohl im Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante beim Übergang zur stationären Phase geringer exprimiert werden, so vermindert sich die Anzahl von 45 auf 26 Gene. Die vollständige Liste der 26 verringert transkribierten Gene befindet sich im Anhang.

Bei näherer Betrachtung der *sigB*-unabhängig reprimierten Gene in der Transitionsphase ist es möglich, diese in unterschiedliche Gruppen zu unterteilen (Tabelle IV.3).

CDS	Gen-name	Funktion	m-value <i>sigB</i> ⁺ ^a	m-value <i>sigB</i> ⁻ ^b
BIOTIN-BIOSYNTHESE UND TRANSPORT				
<i>cg0095</i>	<i>bioB</i>	Biotinsynthase	3,69	1,55
<i>cg2147</i>	<i>bioY</i>	Membranprotein, BioY-Familie	3,70	1,51
<i>cg2148</i>		ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein	3,11	1,51
<i>cg2149</i>		Permease (Cobalt-Permease-Subfamilie)	1,63	0,75
<i>cg2885</i>	<i>bioA</i>	Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoate-Aminotransferase	2,09	0,91
<i>cg2886</i>	<i>bioD</i>	Dethiobiotin-Synthetase-Protein	1,32	0,76
<i>cg1227</i>		ABC-Typ-Kobalt-Transport-System	1,58	1,48
FUNKTION UNBEKANNT				
<i>cg0378</i>		Putatives Phagen-Protein	1,14	1,61
SULFONAT (ESTER)-METABOLISMUS UND TRANSPORT				
<i>cg1147</i>	<i>ssuI</i>	Reduktase der Sulfonatdegradation	-1,25	-1,70
<i>cg1152</i>	<i>seuB</i>	Sulfonat-Ester-Monooxygenase	-1,35	-1,25
<i>cg1153</i>	<i>seuC</i>	Sulfonat-Ester-Monooxygenase	-0,99	-1,07
<i>cg1156</i>	<i>ssuD2</i>	Alkanesulfonat-Monooxygenase	-2,23	-1,00
<i>cg1376</i>	<i>ssuD1</i>	Alkanesulfonat-Monooxygenase	-2,11	-1,61
<i>cg1377</i>	<i>ssuC</i>	Aliphatischer Sulfonat-ABC-Transporter	-2,17	-1,32
<i>cg1379</i>	<i>ssuB</i>	Aliphatischer Sulfonat-ABC-Transporter	-1,75	-0,74
ZELLTEILUNG				
<i>cg2378</i>	<i>mraZ</i>	MraZ-Protein	-1,02	-1,16

Tabelle IV.3: Gene, die während der Transitionsphase *sigB*-unabhängig exprimiert werden. m-Werte, die unter ± 1 liegen, wurden rot markiert. ^a: m-Wert im *C. glutamicum* Wildtyp; ^b: m-Wert im *C. glutamicum*-Stamm CL1

Die Gene, die in der Transitionsphase *sigB* unabhängig exprimiert werden, lassen sich im wesentlichen in zwei funktionale Kassen unterteilen. Die erste beinhaltet die Gene, die an der Biotin-Biosynthese und am Biotin-Transport beteiligt sind. Die Expression der Gene *cg0095*

(*bioB*), *cg2147 (bioY)-cg2149*, *cg2885 (bioA)* und *cg2886 (bioD)* ist sowohl beim Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante während der Transitionsphase verstärkt. Durch die erhöhte Expression dieser Gene sowohl im Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante lässt sich auf eine zusätzliche Biotinlimitation während der Fermentation schließen, auf die mit einer gesteigerten Expression dieser Gene reagiert wird (Hatakeyama *et al.*, 1993).

Die zweite Klasse beinhaltet Gene, die an der Verwertung von Sulfonaten und Sulfonateestern als Schwefelquellen beteiligt sind (Koch *et al.*, 2005b). Bei diesen Genen handelt es sich um *cg1147 (ssuI)-cg1156 (ssuD2)* und *cg1376 (ssuD1)-cg1379 (ssuB)*, die alle während der Transitionsphase sowohl im Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante verringert exprimiert werden. Dieses kann auf eine erhöhte Konzentration an freiem Sulfat oder Sulfid innerhalb der Zelle zurückgeführt werden. Die erhöhte Konzentration dieser Stoffe führt zu einer Repression des SsuR-Regulators, der als transkriptioneller Aktivator der *ssu*-Gene fungiert (Koch *et al.*, 2005a).

3.3 Analyse der Gene, die während der Transitionsphase in Abhängigkeit von SigB unterschiedlich stark transkribiert werden

Die Gene, die während der Transitionsphase verstärkt exprimiert werden, ließen sich aufgrund ihrer Funktionen innerhalb der Zelle in neun funktionale Gruppen unterteilen. Die vollständige Liste befindet sich im Angang (siehe VII.5).

Die erste Gruppe *Aminosäuremetabolismus und -transport* beinhaltet Gene für proteolytische Enzyme (*cg0998*, *cg1939*) und Gene, die an der Peptidaufnahme beteiligt sind (*cg2884*). Desweiteren werden die Gene verstärkt exprimiert, die an der Biosynthese der aromatischen (*aroF*) oder der verzweigtkettigen (*ilvE*) Aminosäuren beteiligt sind. Die Transaminase B, die durch *ilvE* kodiert wird, ist für den letzten Schritt der Transaminierung der drei verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin zuständig (Mc Hardy *et al.*, 2003). Der Transaminase B lassen sich somit zwei Funktionen zuschreiben. Zum einen ist die Beteiligung an der Umwandlung von 2-Ketosäuren in ihre korrespondierenden Aminosäuren bekannt und zum anderen ist IlvE an der Verteilung von Aminogruppen zwischen Glutamat und anderen Amino- oder Ketosäuren beteiligt. Dagegen wird das Gen *leuB*, das den letzten Schritt in der Leucinbiosynthese katalysiert, verringert exprimiert, obwohl beide Gene *ilvE* und *leuB* dasselbe Intermediat, 2-Oxo-4-Methyl-3-Carboxypentanoat bzw. 4-Methyl-2-Oxopentanoat, bei dem es sich um ein spontanes Decarboxylierungsprodukt handelt, verwenden.

Die zweite Gruppe, *Kohlenstoffmetabolismus und -transport*, beinhaltet nur einige wenige Gene, die in Abhängigkeit von SigB verstärkt exprimiert werden. Bei einem dieser Gene handelt es sich um *cg1479 (glgP1)*, das für eine putative Glukanphosphorylase kodiert, die für die Speicherung von Kohlenstoffquellen in Form von Glykogen verantwortlich ist. Andere Gene wie *cg0756 (cstA)*, ein putatives Kohlenstoffmangelprotein, *cg1791 (gap)* und *cg1790 (pgk)*, die die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und die Phosphoglyceratkinase synthetisieren, werden während der Transitionsphase verringert exprimiert. Die Gene *cg1791* und *cg1790*, die an der Glykolyse beteiligt sind, liegen im Genom von *C. glutamicum* als Operon vor (*gap-pgk-tpi-ppc*) (Schwinde *et al.*, 1993). Desweiteren werden die Gene (*cg0699*, *cg2705/amyE-cg2704*), die sowohl am Kohlenstoffmetabolismus als auch an der Kohlenstoffaufnahme beteiligt sind, in Anwesenheit von SigB ebenfalls reprimiert.

Die dritte Klasse, *Stressabwehr*, beinhaltet eine beachtliche Anzahl von Genen, die während der Transitionsphase verstärkt exprimiert werden. Bei diesen Genen handelt es sich um *cg1073* (Glyoxylase), *cg2078* (Methionin-R-Sulfoxidreduktase) und *hmp* (Stickoxidbindendes Flavohemoprotein), die an der Entgiftung der Zelle beteiligt sind.

Weiterhin konnten Gene identifiziert werden, die in *Membranprozesse* involviert sind. Sowohl die Gene *cg0467*, *cg1623* und *cg2676*, die an der Metallaufnahme beteiligt sind, als auch *uppS1*, welches an der Zellwandbiosynthese beteiligt ist, konnten in Anwesenheit von SigB als verstärkt transkribiert bestimmt werden.

Die fünfte Klasse *Phosphatmetabolismus und Regulation* beinhaltet Gene, die im Phospholipidmetabolismus (*cg1718* und *cg3194*), an der Regulation der Phosphataufnahme und der Phosphatmangel-Antwort (*phoU* und *phoR*) beteiligt sind. In *E. coli* misst das PhoU-Protein die Konzentration an anorganischem interzellularem Phosphat, wobei es als negativer Regulator der organischen Phosphataufnahme fungiert (Steed & Wanner, 1993). Das *C. glutamicum phoR*-Gen kodiert für den Transkriptionsregulator des Zweikomponenten-Regulationssystems PhoRS, das unter geringen Phosphatkonzentrationen aktiviert wird und so das Überleben der Zelle unter geringen Phosphatkonzentrationen ermöglicht (Kocan *et al.*, 2006).

Die sechste Klasse, *regulatorische Prozesse*, beinhaltet vier Gene mit induzierter Transkription, die aus einem weiteren Zweikomponenten-Regulationssystem (*cgtS10*, *cgtR10*) bestehen. Aus *C. glutamicum* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich bekannt, dass die Expression dieses Zweikomponenten-Regulationssystems bei Ammoniummangel erfolgt (Silberbach *et al.*, 2005).

Die Gruppe Transkription und Translation beinhaltet drei Gene, die verringert exprimiert werden. Die Gene *rplJ* und *rplL* liegen innerhalb des *C. glutamicum*-Genoms als Operon vor und kodieren die ribosomalen Proteinuntereinheiten L10 und L7/L12. Dasselbe Wachstumsphasen-abhängige Expressionsverhalten des *rplJ-rplL*-Operons konnte ebenfalls für einen weiteren Actinomyceten, *Streptomyces coelicolor*, gezeigt werden (Blanco *et al.*, 2001). Bei dem dritten Gen dieser Gruppe, *sigA*, handelt es sich um den essentiellen *house-keeping*-Sigmafaktor SigA. In Übereinstimmung mit dem ermittelten Expressionsprofil des *sigA*-Gens über die Wachstumsphase (Abb. IV.12), konnte auch mittels Microarray-Hybridisierung gezeigt werden, dass die Expression des *sigA*-Gens in Anwesenheit von SigB reprimiert wird. Dabei handelt es sich um eine indirekte Konsequenz des erhöhten Wettbewerbs der beiden Sigmafaktoren (SigA und SigB) um die Bindung an das RNA-Polymerase-Holoenzym.

In der Gruppe *Vitamin- und Cofaktorenbiosynthese* befinden sich drei Gene, die unterschiedliche Cofaktoren codieren. Das Gen *coaA*, das die Pantothenatkinase kodiert, katalysiert den ersten Schritt der CoenzymA- (CoA) Biosynthese (Jackowski & Rock, 1986). Das entstehende CoA wirkt dabei als Acyl-Gruppen-Träger im Zitronensäure-Zyklus (Rock *et al.*, 2003; Vallari *et al.*, 1987). Ein weiteres Gen (*cg0999*), das in die Pyridoxinbiosynthese involviert ist, wird innerhalb der Transitionsphase verstärkt exprimiert, während *cg0899* eine verringerte Expression aufweist. *Cg0899* ist vermutlich Teil der Molybdän-Cofaktorbiosynthese.

Die letzte Gruppe *Funktion unbekannt* beinhaltet 25 Gene, deren Proteine ebenfalls aus anderen Organismen bekannt sind, deren Genprodukten jedoch bisher keine eindeutige Funktion zugewiesen werden kann.

Zusammenfassend läßt sich erkennen, daß SigB aus *C. glutamicum* die Transkription einer Vielzahl von Genen beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase reguliert. Durch die Expression des Regulons wird die Zelle auf die veränderten Verhältnisse während der stationären Phase vorbereitet. So werden Gene exprimiert, die auf die Verringerung der Ressourcen reagieren. Ebenso wird die Membranzusammensetzung dahingehend verändert, dass die Zelle während der stationären Phase besser geschützt ist. Um auftretenden Stressen entgegenwirken zu können werden Transkriptionsregulatoren exprimiert, um ein Überleben der Zelle während der stationären Phase zu ermöglichen.

3.3 *In silico-* und *in vivo-*Identifizierung der SigB-Konsensus-Promotorsequenz von *C. glutamicum*

Ausgehend von dem SigB-transkribierten Regulon, das mittels DNA-Microarray-Hybridisierungen identifiziert wurde, sollte sowohl durch bioinformatische als auch durch molekularbiologische Methoden versucht werden, die Promotorsequenz zu identifizieren.

Für die Bestimmung des SigB-Promotors in *C. glutamicum* mittels bioinformatischer Methoden wurden die nicht-codierenden Regionen 300 bp *upstream* der 58 identifizierten Gene verwendet. In diesen Regionen wurde durch drei unterschiedliche Programme der Promotor bestimmt. Bei diesen Programmen handelt es sich um BPROM (BPROM, 2002), NNPP (NNPP, 1999) und PROMSCAN (Studholme & Dixon, 2003). Mit Hilfe dieser Programme ist es möglich, basierend auf mathematischen Algorithmen, die auf bereits bestehende Promotorsequenzen als Datenbanken zurückgreifen, innerhalb einer Sequenz einen Promotor vorherzusagen. Da es sich bei dieser Vorhersage um Wahrscheinlichkeiten handelt, wurden die Auswahlkriterien so gewählt, dass nur die vorhergesagten Promotoren als signifikant betrachtet wurden, die mindestens von zwei der drei Programme an der gleichen Stelle identifiziert wurden.

Ausgehend von den 58 Genen konnten so bei 26 davon Promotorsequenzen identifiziert werden. Bei näherer Betrachtung der 32 Gene, bei denen kein Promotor gefunden werden konnte, liegen neun davon in putativen Operons. Damit liegt der jeweilige Promotor *upstream* des ersten Gens dieser Operons und die nachfolgenden Gene besitzen somit keinen eigenen Promotor. Desweiteren konnte bei 23 Genen lediglich eine stärker degenerierte Promotorsequenz festgestellt werden, die jeweils nur von einem Programm identifiziert wurde.

Zur genaueren Betrachtung wurden die 26 vorhergesagten Promotoren von Genen, die während der Transitionsphase verstärkt exprimiert werden, in einer Tabelle (Tabelle IV.4) dargestellt.

CDS	m-Wert RES167	Gen- name	vorhergesagte Promotorsequenz	Programm
<i>cg0096</i>	3,08		caatgcatgatcgctcggaactacctgact acgct cgccgc ccaa T -N ₇₈ -ATG	b,c
<i>cg0465</i>	1,21		aagtaatcaacgcacaaaatgaagttaaggct atgct aacttaA-N ₆₁ -ATG	a,b,c
<i>cg0753</i>	1,04		aaccctccggataaacc aaaaa acaatctct taacata aagtagtt-N ₁ -GTG	b,c
<i>cg0806</i>	1,20		gttgggaagcaaaagaacatcatctgtgctt tattgt ctaT-N ₁₈₁ -ATG	a,b,c
<i>cg0998</i>	1,57		gaaccattcgcagcgggttcgaaaatgct gatgatt aaaccact-N ₇₉ -ATG	b,c
<i>cg1082</i>	1,39		gcaggtggagttgcccgtcttgagtggggct gaaat catccgcgA-N ₁₉₅ -ATG	a,b,c
<i>cg1083</i>	1,23		taagcctgcagccgacgggattaaggcagct aacatt gagaca C -N ₁₁₅ -TTG	a,b
<i>cg1091</i>	1,85		tgggggcttgcatattgtttcgttgctt caactaaagt taactC-N ₁₃₁ -GTG	b,c
<i>cg1131</i>	1,59		gagcagcgactttccgattcatgctgtgg caatct gcctactc-N ₁₂₄ -ATG	a,c
<i>cg1132</i>	1,11	<i>coaA</i>	cgcttggaggcatcgggtcatcaggtcagct aacct ttcacA-N ₂₀₇ -ATG	a,c
<i>cg1227</i>	1,58		acttaaatttcatagacacgggtgctcggt gaaaat ccgggC-N ₆₇ -ATG	a,b,c
<i>cg1304</i>	1,58		Gat ttt ctg ttg ccttcataagctaaagtt ctaatt tcctaaat-N ₃₁ -ATG	a,b
<i>cg1417</i>	1,41		gacgtcga aaag caatgaatttaatgcttt aacct ggattt T -N ₄₅ -ATG	b,c
<i>cg1930</i>	1,29		taaagcttgccctatttaagaagaactgctata taagat catccA-N ₆₃ -ATG	a,b
<i>cg2105</i>	1,14		cctccggtgacgggtactcaagctcgtacat acgat cat tg T-N ₁₆₂ -GTG	b,c
<i>cg2418</i>	1,48	<i>ilvE</i>	ctgactagtgatctgtcaggtagcaggtg tacct taaaat C -N ₁₀₈ -ATG	b,c
<i>cg2676</i>	1,18		taagttctggaacataaattagctgacacg taagta aacttA-N ₂₃ -ATG	a,c
<i>cg2810</i>	1,43		tatttgatcataattcccctgacctgctgt tatgg tataaaaA-N ₁₂₂ -GTG	a,c
<i>cg2842</i>	1,31	<i>phoU</i>	tagttgctatccccattattaggtgatt caatct taaA-N ₅₀ -ATG	a,b
<i>cg2850</i>	1,14		ttcgttgacgggtgccgtccccaccgcggg gataat cacatC-N ₂₁₂ -ATG	a,b
<i>cg2999</i>	1,12		ttgtgattgagaggagtcggcgatttcgt tagagt ttggtC-N ₁₄₅ -ATG	b,c
<i>cg3022</i>	1,15		aagtgtcttgattcactttgtgatgacggt taccat agccaT-N ₂₂₁ -ATG	a,c
<i>cg3141</i>	1,61	<i>hmp</i>	catcatattaaggccaaattgcttggatcct gggat ttattta A -N ₅₅ -TTG	a,c
<i>cg3194</i>	1,06		ctcctt taaaa agtgctgactcacttt tactct ataA-N ₁₁₉ -ATG	a,c
<i>cg3330</i>	1,71		acgtgaaaggcacctaaagcgattaacgg taagtg cgcgagagg T -N ₂₄ -ATG	a,c
<i>cg3338</i>	1,04		cgcc taatt ttgtgtccatgacccaagat tactct cgggcaA-N ₇₅ -ATG	b,c

Tabelle IV.4: Übersicht über die 26 Promotorsequenzen der Gene aus dem SigB-Regulon von *C. glutamicum*, die während der Transitionsphase von SigB-abhängig verstärkt exprimiert werden. Sowohl die -10-Region als auch die mittels RACE-PCR identifizierten Transkriptionsstartpunkte wurden fett markiert. Die bioinformatisch bestimmten Transkriptionsstartpunkte werden durch Großbuchstaben symbolisiert. Die putative -35-Region wurde unterstrichen dargestellt. Abgebildet sind nur die Sequenzen, die durch mindestens zwei Programme identifiziert wurden. Bei diesen Programmen handelt es sich um (a) NNPP 2.2. (b) BPROM und (c) PROMSCAN

Ebenfalls wurden Promotoren in der *upstream* Region der 37 Gene, die während des Übergangs in die stationäre Phase verringert exprimiert wurden, bestimmt. Dabei konnte bei 15 Genen innerhalb der 300 bp-*upstream* Region ein Promotor durch jeweils zwei Programme identifiziert werden. Innerhalb der 15 Gene konnten fünf identifiziert werden, deren Promotoren bereits aus anderen Arbeiten bekannt waren. Bei diesen Genen handelte es sich um *cg1453* (*leuB*), *cg1790* (*pgk*), *cg1991* (*gap*), *cg2092* (*sigA*) und *cg3100* (*dnaK*), deren Promotoren als SigA-reguliert beschrieben wurden (Patek *et al.*, 2003; Barreiro *et al.*, 2004).

Zur genaueren Veranschaulichung wurden die 15 bekannten Promotoren in einer Tabelle (Tabelle IV.5) zusammengefasst.

CDS	m-Wert RES167	Gen name	vorhergesagte Promotorsequenz	Programm
<i>cg0572</i>	-1,43	<i>rplJ</i>	cgcgatttgggtatttcggccgatcctgccctaaagtaaatagA-N ₂₆₁ -ATG	a,c
<i>cg0699</i>	-1,07	<i>guaB2</i>	tccgatttaaggacaagctactaaagtttagataattgtggA-N ₃₃ -ATG	a,b,c
<i>cg0756</i>	-1,61	<i>cstA</i>	ggggatgactagccccactctaaatgggttaggatgggtatA-N ₂₃₄ -GTG	a,b
<i>cg0812</i>	-1,24	<i>dtsR1</i>	cctgttcagtgatgtaaatcaccgcggaaatattgtggacgT-N ₃₆ -ATG	a,c
<i>cg1109</i>	-1,84	<i>porB</i>	tagaagctttgatgatctacatcacaatttacaatgtgtgG-N ₅₉ -ATG	a,b
<i>cg1453</i>	1,04	<i>leuB</i>	ttgggcaggtacgagctgtgatcaatcagctacactaG-N ₄₀ -ATG	b,c
<i>cg1595</i>	-1,11	<i>uspA2</i>	gaagactatgactagacattcggacaatagtaagatgtgagC-N ₅₅ -ATG	a,b
<i>cg1790</i>	-1,06	<i>pgk</i>	ataccggtgccagcgccacacaatgtgtggcaactctgggacaG-N ₆₄ -ATG	a,c
<i>cg1791</i>	-2,01	<i>gap</i>	gcatctgctgcgaaatcttgtttccccgctaaagttgaggaC-N ₁₉₀ -ATG	a,b,c
<i>cg1911</i>	-1,07		gaatcctaagatgagtatattaagccctgtttataattgtta-N ₁₆₀ -GTG	a,b,c
<i>cg2092</i>	-1,03	<i>sigA</i>	cccttgtgacatcggcgcagttgttcaactataatggaacgC-N ₃₈₁ -ATG	a,b,c
<i>cg2513</i>	-1,22	<i>phoH2</i>	gcagctatcggtgctgtctgaccgctggtaacatttctc-N ₅₂ -GTG	b,c
<i>cg3096</i>	-1,17		cttttgaaaggctttcggcgttgagctgcgagaattttgaG-N ₁₆₁ -ATG	a,b
<i>cg3100</i>	-1,58	<i>dnaK</i>	ctttgtggcatttaccgcttcttatatatgtaagcttgagT-N ₁₁₃ -ATG	a,b
<i>cg3195</i>	-1,16		gttttggtcagttgtcacgatctccaaccatagtggtccgA-N ₂₂₉ -TTG	a,b,c

Tabelle IV.5: Übersicht über die 15 Promotersequenzen der Gene von *C. glutamicum*, die während der Transitionsphase SigB-abhängig verringert exprimiert werden. Sowohl die -10-Region als auch die bereits identifizierten Transkriptionsstartpunkte wurden fett markiert. Die bioinformatisch bestimmten Transkriptionsstartpunkte werden als Großbuchstaben symbolisiert. Die putative -35-Region wurde unterstrichen dargestellt. Abgebildet sind nur die Sequenzen, die durch mindestens zwei Programme identifiziert worden sind. Bei diesen Programmen handelt es sich um (a) NNPP 2.2. (b) BPROM und (c) PROMSCAN

Da fünf der Promotoren, die während der Transitionsphase verringert exprimiert werden, ebenfalls *in vitro* als SigA reguliert identifiziert wurden, ist es notwendig, die identifizierten Promotoren, ebenfalls *in vitro* zu bestimmen. Aufgrund der großen Datenmenge wurde der Transkriptionsstart exemplarisch für sechs Gene mittels RACE-PCR bestimmt. Bei der RACE-PCR, deren Abkürzung für *Rapid Amplification of cDNA-Ends* durch *Polymerase Chain Reaction* steht, wird die mRNA eines bestimmten Gens mittels *reverser Transkription* in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung genspezifischer Primer und Synthetisierung eines polyA-Schwanzes an das 5'-Ende der cDNA lässt sich der Transkriptionsstart durch Vervielfachung der Sequenz mittels PCR und anschließender Sequenzierung bestimmen. Nachdem der Transkriptionsstart mittels Sequenzierung bestimmt worden war, wurde anhand der Gesamtgenomsequenz (Kalinowski *et al.*, 2003) die genomische Lage des Promotors bestimmt.

Bei den Genen, deren Transkriptionsstart bestimmt wurde, handelt es sich um sechs, die in den Microarrayexperimenten unter den 20 am stärksten exprimierten Genen waren und die eine Zugehörigkeit zu verschiedenen funktionellen Klassen aufwiesen. Bei diesen

Genen/Operons handelt es sich um *cg0096/cg0097*, *cg1083(cgtS10)/cg1084(cgtR10)*, *cg1417*, *cg2418(ilvE)* *cg3141(hmp)* und *cg3330*.

In allen sechs Fällen stimmte der experimentell bestimmte Promotor mit dem bioinformatisch bestimmten überein. In der Tabelle IV.4 sind sowohl die Promotorsequenzen als auch der Transkriptionsstart in der Sequenz dargestellt. Die experimentell bestimmten Transkriptionsstartpunkte sind gekennzeichnet. Ausgehend von der durchgeführten Validierung der bestimmten Promotorsequenzen mittels RACE-PCR ist es möglich, diesen Datensatz zur Generierung einer SigB-Konsensussequenz zu verwenden (Abb. IV.17).

Zur Bestimmung der Promotor-Konsensussequenz von SigB wurden die ermittelten Promotoren miteinander verglichen und die Häufigkeit jeder Base an einer bestimmten Position innerhalb der Promotorsequenz durch ein Sequenzlogo verdeutlicht. Bei der hierfür benutzten Software handelt es sich um WebLOGO (Crooks *et al.*, 2004). Das Sequenzlogo repräsentiert ein Alignment als Stapel von Buchstaben, wobei die Höhe jedes einzelnen Buchstabens proportional zur gemessenen Frequenz des korrespondierenden Nukleotids ist. Die Gesamthöhe jedes Stapels ist proportional zur Sequenzkonserviertheit, die in Bits gemessen wird. Verwendet man Nukleotide zur Generierung eines WebLOGOs, so beträgt die maximale Konservierung jeder einzelnen Base $\log_2 4 = 2$.

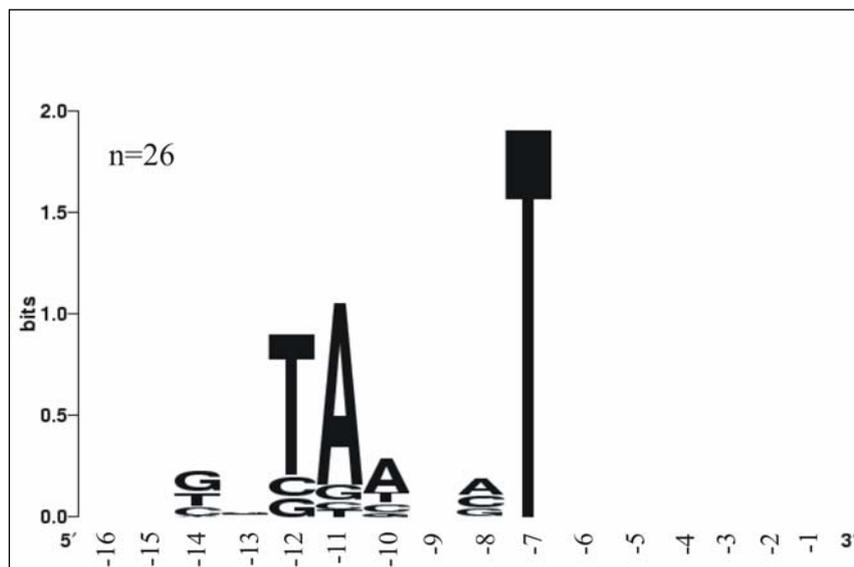


Abb. IV.17: Positionsspezifischer SequenzLogo-Plot der -10 -Region von SigB-abhängigen Promotorsequenzen in *C. glutamicum*. Jeder Buchstabe repräsentiert die Wahrscheinlichkeit jedes Nukleotids innerhalb des SigB-Promotors. Zur Erstellung wurden die 26 SigB-regulierten Promotoren verwendet. Das SequenzLogo wurde mit dem Program WebLOGO erstellt (Crooks *et al.*, 2004).

An den Positionen, in denen im SequenzLogo kein Nukleotide angezeigt wird, ist keins der Nukleotide signifikant überrepräsentiert.

Zur Bestimmung der Promotor-Konsensussequenz der 15 verringert exprimierten Gene wurde diese ebenfalls mittels WebLOGO generiert (Abb. IV.18)

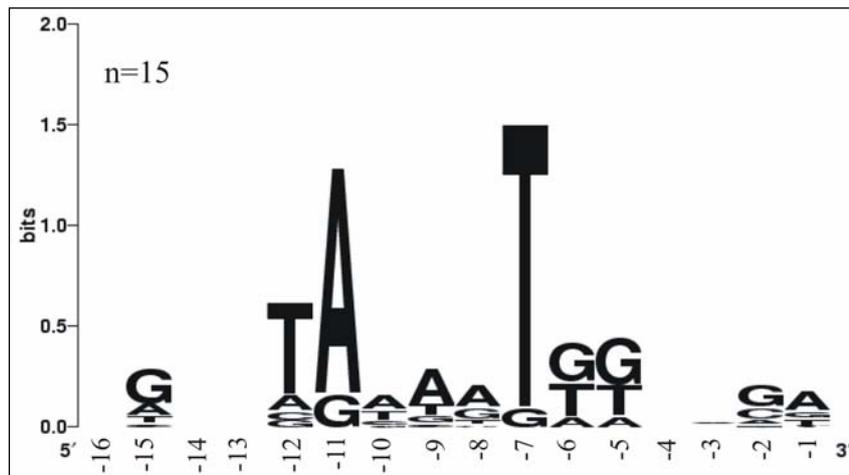


Abb. IV.18: SequenzLogo-Plot der -10 -Region der 15 Gene, die während der Transitionsphase in *C. glutamicum* verringert exprimiert werden. Das SequenzLogo wurde mit dem Program WebLOGO erstellt (Crooks *et al.*, 2004).

Vergleicht man dieses LOGO mit der bereits veröffentlichten -10 -Konsensussequenz für den SigA-Promoter (tgngn[TA(c/t)aaT]gg) (Patek *et al.*, 2003), so lassen sich hohe Übereinstimmungen innerhalb beider Sequenzen identifizieren. Vergleichende Analysen zwischen der -10 -Konsensussequenz des SigA-Promoters (Abb. IV.18) und der des SigB-Sigmafaktors (Abb. IV.17) verdeutlichten, dass beide Hexamere der -10 -Regionen hohe Homologien zueinander aufweisen. Die Unterschiede, die zwischen beiden Sequenzen gefunden werden konnten, ließen sich lediglich in der *downstream*-Sequenz der -10 -Region und innerhalb des Hexamers, ausmachen. Insbesondere sind die konservierten Nukleotide [g] an der Position -6 und an der Position -5 der SigA-Konsensussequenz innerhalb des SigB Konsensussequenz nicht konserviert. Des weiteren ist das Nukleotid [a] an Position -9 lediglich in der SigA-Konsensussequenz konserviert. *Upstream* der -10 -Region des SigB-Promoters, die auch als *extended* -10 -Region bezeichnet wird, konnte an Position -14 ein konserviertes Nukleotide [g] identifiziert werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die -10 -Region des SigB-Promoters (TAAanT) von *C. glutamicum* eine hohe Ähnlichkeit zur -10 -Konsensussequenz des SigA-Promoters [TA(ct)aaT] aufweist. Dieses läßt sich auf die hohe Konserviertheit der Aminosäuresequenz der Region 2.4, die für die Bindung des Sigmafaktors an der -10 -Region verantwortlich ist, zurückzuführen. Die Unterschiede innerhalb der Konserviertheit der *extended* -10 -Region lassen sich auf die Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenz der Region 2.5 zurückzuführen.

3.4 Charakterisierung des Expressionsverhaltens von SigB-regulierten Genen über den Wachstumsverlauf in der *sigB*-Deletionsmutante CL1

Ausgehend von den DNA-Microarray-Experimenten und den Promotoranalysen konnte gezeigt werden, dass beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase 153 Gene abhängig von SigB verstärkt exprimiert werden. Betrachtet man allerdings die Konsensussequenzen des SigA- und SigB-abhängigen Promotors, so weisen beide Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der -10 Region auf. Um verifizieren zu können, ob der Promotor, der von dem Sigmafaktor SigB erkannt wird, ebenfalls vom dem Sigmafaktor SigA erkannt wird, wurden Expressionsanalysen von zehn Genen über den Wachstumsverlauf durchgeführt. Bei den untersuchten Genen handelt es sich zum einen um diejenigen, deren Promotor durch SigB erkannt wird, als auch um bereits bekannte Gene, die durch den Hauptsigmafaktor SigA transkribiert werden. Bei den *housekeeping*-Genen handelt es sich um *sigA*, *hom* (kodiert für Homoserindehydrogenase) und *gap* (kodiert für Glyceraldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase) (Patek *et al.*, 2003).

Stellvertretend für die 153 putativ SigB-regulierten Gene wurden die sechs ausgewählt, deren Promotoren innerhalb dieser Arbeit sowohl durch RACE-PCR-Analysen als auch durch bioinformatische Methoden bestimmt werden konnten. Dabei handelt es sich um die Gene *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330*.

Das Expressionsprofil dieser Gene wurde mittels *real-time* RT-PCR sowohl im Wildtyp (Abb. IV.19) als auch in der *sigB*-Deletionsmutante CL1 (Abb. IV.21) über den Wachstumsverlauf bestimmt. Sollte es sich bei den Genen *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* um SigB-regulierte Gene handeln, so müßten unterschiedliche Expressionsprofile über den Wachstumsverlaufs innerhalb des Wildtyps und der *sigB*-Deletionsmutante detektierbar sein. Als Kontrollen wurden die *housekeeping*-Gene verwendet, die im Wildtyp ein deutlich divergentes Expressionsprofil im Vergleich zu SigB-regulierten Genen aufweisen sollten (Abb. IV.20).

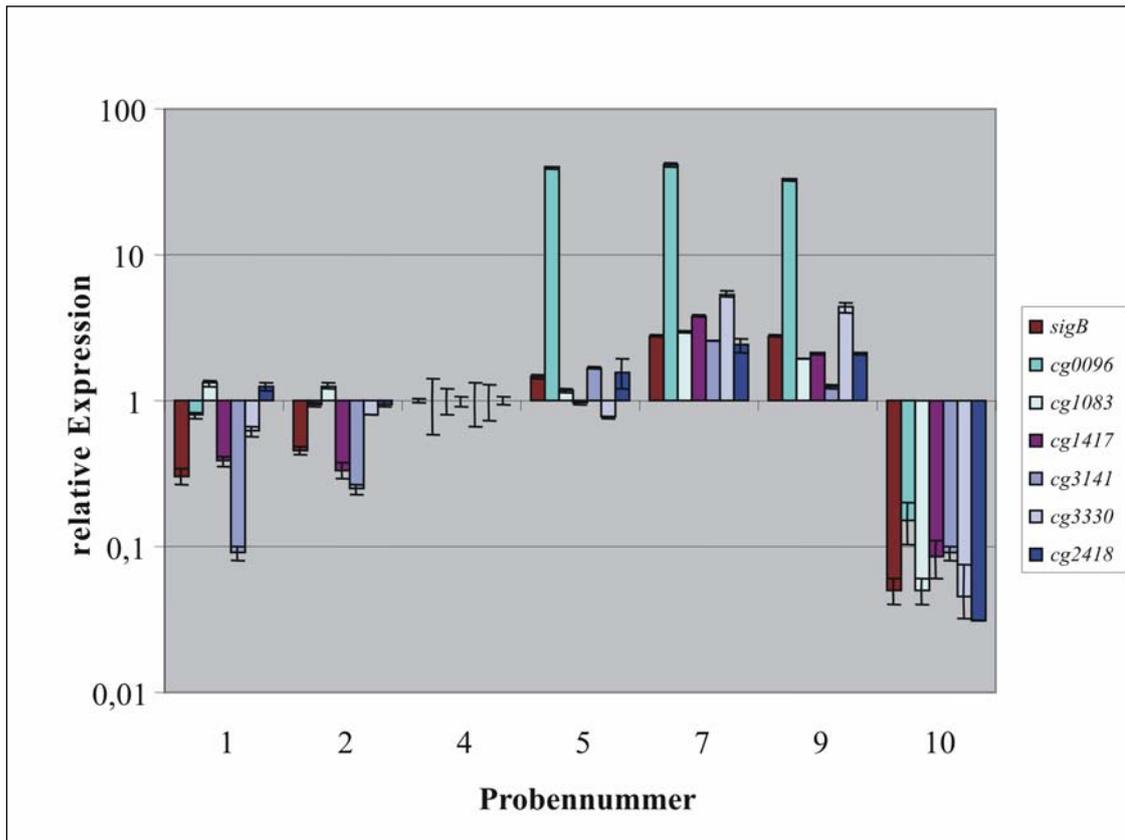


Abb. IV.19: Bestimmung der relativen Expressionsraten der Gene *sigB*, *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* während der Wachstumsphasen mittels *real-time* RT-PCR in *C. glutamicum* RES167. Die Transkriptionsrate der Probennummer 4 (exponentielle Phase, Abb. IV.13) wurde auf 1 normiert.

In der Abbildung IV.19 wurde das Expressionsprofil der Gene *sigB*, *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* über den Wachstumsverlauf in *C. glutamicum* RES167 bestimmt. Die Probennummern symbolisieren unterschiedliche Wachstumsphasen (Abb. IV.13). Dabei handelt es sich bei den Probennummern 1, 2 und 4 um exponentiell wachsende Zellen. Die Probennummern 5 und 7 wurden während der Transitionsphase gewonnen. Die Probennummern 9 und 10 stehen für Zellen, die während der stationären Phase geerntet wurden.

Betrachtet man das Expressionsprofil von *sigB* über den Wachstumsverlauf, so läßt sich die bereits beschriebene Wachstumsphasenabhängige Expression feststellen. Die Expressionsrate des *sigB*-Gens wurde beim Übergang (Probennummern 5 und 7) von der exponentiellen zur stationären Phase und während der stationären Phase (Probennummer 9) verstärkt exprimiert. Dabei konnte eine maximale Expression zum Zeitpunkt 7 mit 2,8fach gemessen werden. Vergleicht man dieses Expressionsprofil mit dem der Gene *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* über den Wachstumsverlauf, so fällt auf, dass jedes der SigB-regulierten Gene ein ähnliches Expressionsprofil über die Wachstumsphase aufweist wie *sigB* eine

Expressionssteigerung erfolgt lediglich beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase.

Betrachtet man im Gegensatz dazu das Expressionsprofil von *sigA*, *hom* und *gap*, die als *housekeeping*-Gene beschrieben worden sind und somit von SigA transkribiert werden (Patek *et al.*, 2003), lässt sich über den Wachstumsverlauf in *C. glutamicum* RES167 ein divergentes Expressionsprofil feststellen (Abb. IV.20).

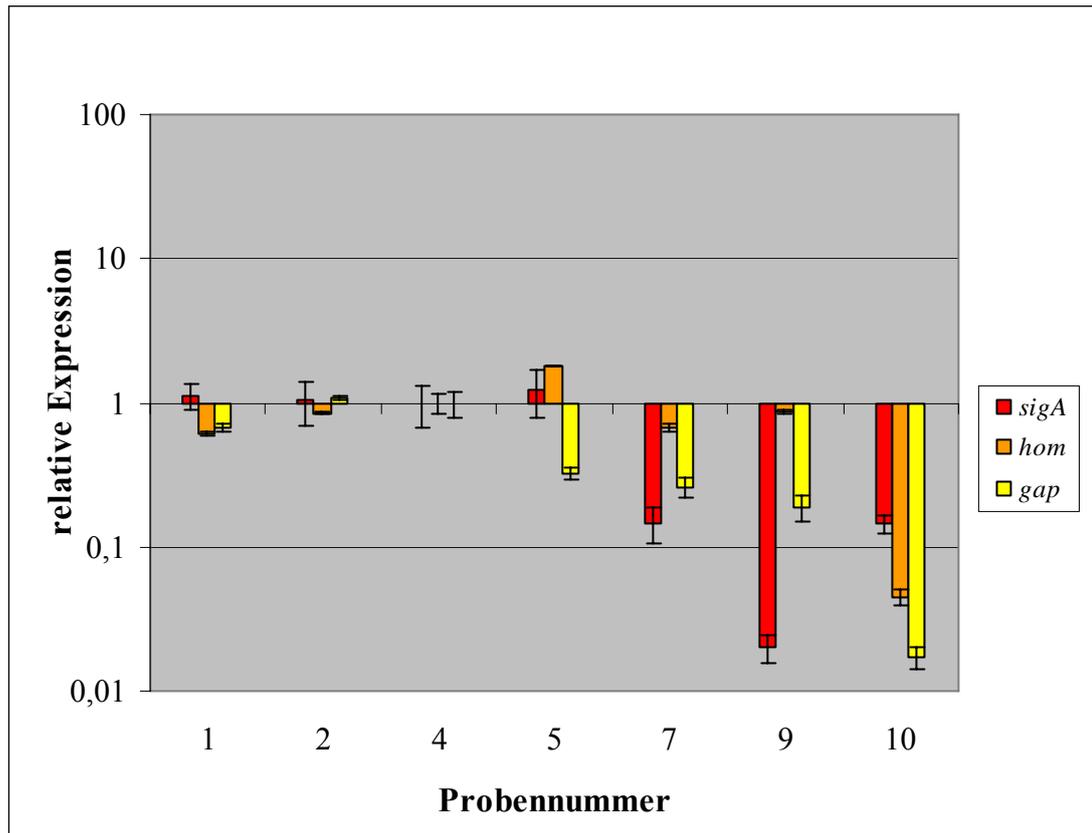


Abb. IV.20: Bestimmung der relativen Expressionsrate der Gene *sigA*, *hom* und *gap*, die einen SigA-Promoter besitzen (Patek *et al.*, 2003), während des Wachstumsverlaufs mittels *real-time* RT-PCR in *C. glutamicum* RES167. Die Transkriptionsrate der Probennummer 4 (exponentielle Phase, Abb. IV.13) wurde auf 1 normiert.

Wie bereits aus vorherigen Experimenten bekannt, liess sich eine konstante Expression des *sigA*-Gens in der exponentiellen Wachstumsphase feststellen, die beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase signifikant verringert wird. Dasselbe Expressionsprofil über den Wachstumsverlauf weisen die beiden *housekeeping*-Gene *hom* und *gap* auf. Dieses Expressionsprofil zeigt, dass der Sigmafaktor SigB trotz seiner hohen Homologie zum Sigmafaktor SigA nicht an der Promotorsequenz binden und die Expression der Gene *hom* und *gap* während der stationären Phase aufrecht halten kann. Betrachtet man allerdings das Expressionsprofil der SigB-regulierten Gene *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* in einer *sigB*-Deletionsmutante (Abb. IV.21), so fällt auf, dass die Expression beim

Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase nicht verstärkt wird, wie es im Wildtyp-Stamm der Fall ist.

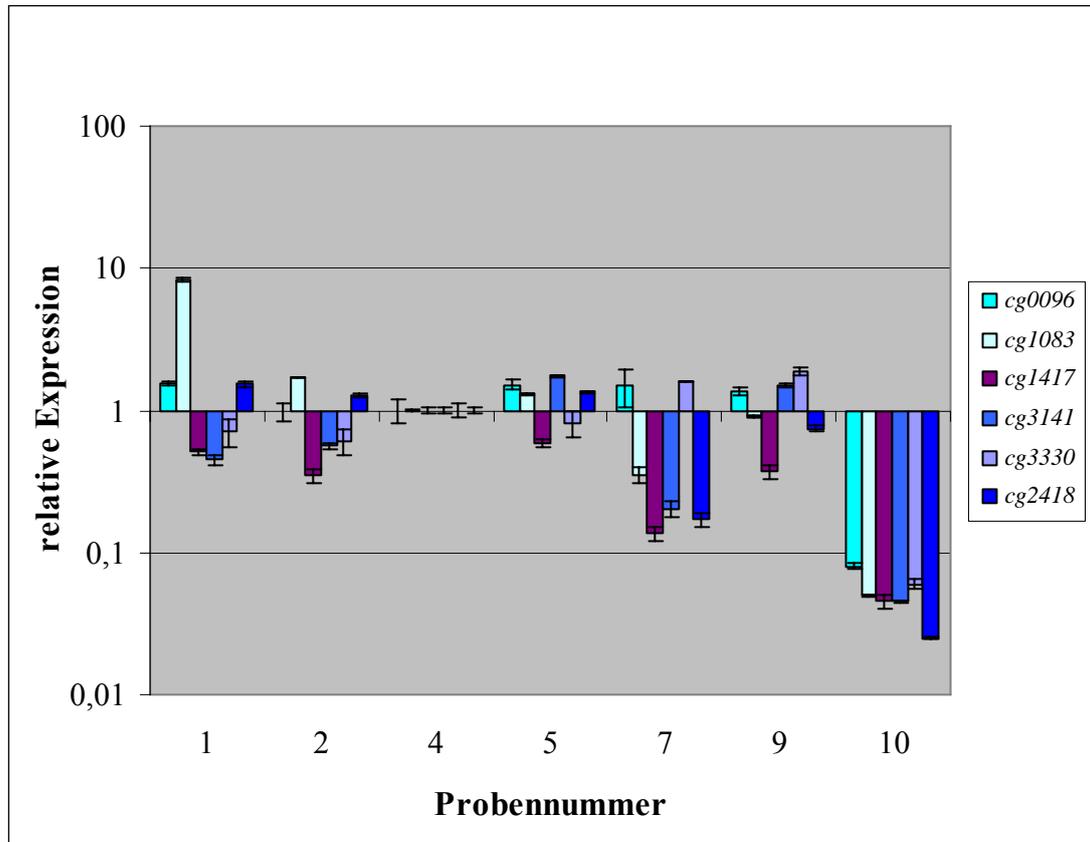


Abb. IV.21: Bestimmung der relativen Expressionsrate der Gene *cg0096*, *cg1083*, *cg1417*, *cg2418*, *cg3141* und *cg3330* während des Wachstumsverlaufs mittels *real-time* RT-PCR in *C. glutamicum* CL1. Die Transkriptionsrate der Probennummer 4 (exponentielle Phase, Abb.IV.13) wurde auf 1 normiert.

Die Expression der SigB-transkribierten Gene verhält sich während der exponentiellen Wachstumsphase nach dem gleichen Muster, dass zuvor für die SigA-regulierten Gene beschrieben wurde. Während des exponentiellen Wachstums liegen die Gene konstitutiv exprimiert vor, beim Übergang in die stationäre Phase ist allerdings frühzeitig ein signifikanter Rückgang der Expression festzustellen.

Somit konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass die mittels RACE-PCR und bioinformatischer Programme bestimmten Promotoren durch SigB erkannt werden und die stärkste Expression dieser Gene beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase erfolgt. Dieses stimmt mit dem Wachstumsphasen-abhängigen Expressionsprofil des *sigB*-Gens überein. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Gene auch während der exponentiellen Phase oder innerhalb einer *sigB*-Deletionsmutante durch SigA erfolgen kann.

V. Diskussion

Der Prozess der Transkription und seiner Regulation wird seit 40 Jahren intensiv an den prokaryotischen Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* untersucht (Hecker *et al.*, 1996; Helmann *et al.*, 2001; Hengge-Aronis, 2000).

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase von *E. coli* dient als Modelenzym für die bakterielle zelluläre RNA-Synthese. Dabei besteht die RNA-Polymerase aus mehreren Untereinheiten, $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$ (*core*-Komplex) und σ (Darst, 2001). Mit der Bindung des σ -Faktors an den *core*-Komplex kommt es zur Ausbildung des Holoenzym, welches für die jeweilige Promotorerkennung und die Effektivität der Transkriptionsinitiation verantwortlich ist.

So stellte sich zunächst die Frage, welche Sigmafaktoren im Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 vorhanden sind und welche Aufgaben diese innerhalb der Regulationsnetzwerke erfüllen. Aus diesem Grund ist es notwendig, die jeweiligen Funktionen der einzelnen Sigmafaktoren festzustellen.

Im Genom von *Corynebacterium glutamicum* konnten sieben Gene identifiziert werden, die für Sigmafaktoren kodieren. Diese Sigmafaktoren ließen sich aufgrund ihrer Homologie in die drei Gruppen der essentiellen-, nicht-essentiellen- und alternativen (ECF-) Sigmafaktoren unterteilen. Als ein erster Schritt in der Charakterisierung aller Sigmafaktoren und ihrer Regulationsnetzwerke wurde im Rahmen dieser Arbeit der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB und sein Regulon charakterisiert.

SigB ist der nicht-essentielle Sigmafaktor in *C. glutamicum*, der in die Stressantwort involviert ist

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei SigB um den nicht-essentiellen Sigmafaktor aus *C. glutamicum* ATCC 13032 handelt, der an der Wachstumsphasenregulation und an der Initiation der Stressantwort beteiligt ist. Diese Ergebnisse wurden mittels Expressionsstudien und Mutationsanalysen erzielt.

Ausgehend von den durchgeführten Arbeiten ließ sich veranschaulichen, dass die *sigB*-Deletionsmutante sensitiver auf die Applikation von Kälte- und Ethanolstress reagiert als der Wildtyp. Dieses spiegelt sich sowohl in der Expressionssteigerung des *sigB*-Gens als auch in dem Wachstumsverhalten nach Stressapplikation wider.

Bei vielen Organismen konnte gezeigt werden, dass die Kältestressadaptation durch die Akkumulation von Kryoprotektanten erfolgt. Dabei sind dies meistens kompatible Solute, die

metabolisch inert, polar und bis zu einer einmolaren Konzentration löslich sind (Csonka, 1989). Außerdem beeinflussen sie selbst in hohen zytoplasmatischen Konzentrationen den zellulären Stoffwechsel nicht. Für *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, daß SigB für die Akkumulation von Betain und Carnitin zuständig ist, um dem Kältestress entgegenzuwirken (Becker *et al.*, 2000). Nach Kältestressadaption kommt es zur Herabsetzung der Zellmembranfluidität. Dabei wirkt sich die Anwesenheit von Kyo-protectanten wie Betain und Carnitin positiv auf die Proteinfaltung aus und bewirkt dadurch eine Erhöhung des Verhältnisses der gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in der Zellmembran. Dies hat eine Herabsetzung der Membranfluidität zur Folge, die die Membran widerstandsfähiger gegenüber Kältestress macht (Annous *et al.*, 1997; Bayles & Wilkinson, 2000).

Für den zweiten Stress (Ethanol), der sich ebenfalls auf die *sigB*-Expression in *C. glutamicum* auswirkt, wurden aus anderen Bakterien zwei Effekte beschrieben, wie die Zelle auf diesen Stress reagiert. Zum einen bewirkt Ethanol eine Störung der Membranorganisation. Dieses wird sowohl durch Interkalierung des hydrophoben Endes als auch durch Hydratation der Membran verursacht (Ingram & Vreeland, 1980). Bei hohen Ethanol-Konzentrationen hat dieses die Lyse der Zelle zur Folge. Der zweite Effekt, der durch Ethanol innerhalb der Zelle ausgelöst werden kann, sind falschgefaltete oder denaturierte Proteine. Diese Art der Proteinschädigung löst in der Zelle dieselbe Stressantwort wie nach Hitzestress aus (Gross, 1996; Mogk *et al.*, 1998). Aus *M. tuberculosis* sind drei Klassen der Hitzestressantwort bekannt. Die Stressantwort, die zur Klasse I gehört, wird lediglich durch Hitzestress ausgelöst, und die Gene werden durch den essentiellen Sigmafaktor SigA exprimiert. Die Klasse II wird durch verschiedene Stresse wie Salz-, Ethanol-, Säurestress und Kohlenstoffmangel ausgelöst. Der für die Stressantwort notwendige Sigmafaktor ist der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB. Die Klasse III wird durch einen unbekanntem Mechanismus aktiviert. Die Expression der Stressantwort wird jedoch ebenfalls durch SigA vermittelt (Hecker *et al.*, 1996).

Auf Grund dieses Ergebnisses läßt sich darauf schließen, dass SigB von *C. glutamicum* unter anderem für die Expression von Hitzeschockproteinen der Klasse II verantwortlich ist, wie es für den Sigmafaktor B aus *Bacillus subtilis* beschrieben wurde (Hecker *et al.*, 1996).

Im allgemeinen sind die nicht-essentiellen Sigmafaktoren an der Stressantwort vieler unterschiedlicher Stresse beteiligt. Allerdings unterscheiden sich die Stresse innerhalb der einzelnen Organismen. So wurde bei *B. subtilis* beschrieben, dass die Expression von *sigB* nach Säure-, Salz-, Hitze- und Ethanol-Stress induziert wird (Hecker *et al.*, 1996), während bei *Listeria monocytogenes* eine verstärkte Expression von *sigB* nach osmotischem, Kälte- und Hitzestress bekannt ist (Becker *et al.*, 2000).

Aus *Brevibacterium flavum*, bei dem es sich um eine verwandte Spezies von *C. glutamicum* handelt, konnten Halgasova *et al.* zeigen, dass eine *sigB*-Mutante sensitiver gegenüber der Applikation von Säure-, Salz-, Ethanol-, Hitze- und Kältestress reagiert als der Wildtyp (Halgasova *et al.*, 2002). Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für *C. glutamicum* ermittelt worden sind, so fällt auf, dass der nicht-essentielle Sigmafaktor SigB an der Antwort auf Kälte- und Ethanolstress beteiligt ist. Eine mögliche Erklärung dieser Differenz liegt in den unterschiedlichen Versuchsdurchführungen. Für die Kultivierung von *B. flavum* wurde ein Voll-Medium verwendet, während *C. glutamicum* in einem Minimalmedium kultiviert worden ist. Weiterhin müssen gegebenenfalls stammspezifische Unterschiede zwischen den beiden Organismen berücksichtigt werden, die für diese unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein können.

Aus *E. coli* ist bekannt, dass das *sigB*-homologe, nicht-essentielle Sigmafaktor-Gen *rpoS* nicht nur an der Stressantwort beteiligt ist, sondern auch verstärkt während des Übergangs in die stationäre Phase exprimiert wird. Diese Verstärkung der Expression kann sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene gemessen werden (Takayanagi *et al.*, 1994). Dabei initiiert SigS die Expression vieler Stressproteine, die die Zelle in die stationäre Phase übergehen lassen (Hengge-Aronis, 1996). Ausgehend von den ermittelten Daten liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Sigmafaktor SigB aus *C. glutamicum* um den Sigmafaktor S aus *E. coli* handelt, der eine ähnliche Funktionalität aufweist wie der Sigmafaktor S aus *E. coli*.

SigB ist ein negativer Wachstumsregulator in *C. glutamicum*

Aus anderen Organismen, wie *E. coli*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* ist bekannt, dass der nicht-essentielle Sigmafaktor nicht nur an der Stressantwort, sondern ebenfalls an der Wachstumsphasenregulation beteiligt ist.

Um feststellen zu können, inwiefern SigB aus *C. glutamicum* ebenfalls in die Wachstumsphasenregulation involviert ist, wurde die *sigB*-Expression mittels *real-time* RT-PCR über den Wachstumsverlauf bestimmt. Dieser Versuch ergab, dass die Expression des *sigB*-Gens in einem engen Bereich beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase verstärkt erfolgt. Während der stationären Phase ließ sich eine Abnahme der Expression des *sigB*-Gens detektieren. Oguiza *et al.* konnte mittels Northern-Hybridisierung in dem ebenfalls eng mit *C. glutamicum* verwandten *B. lactofermentum* zeigen, dass die Expression des *sigB*-Gens lediglich während der exponentiellen und spät-exponentiellen Phase erfolgt (Oguiza *et al.*, 1997). Halgasova *et al.* (2001) beschrieben dagegen, dass die Expression von *sigB* aus *B.*

flavum während der exponentiellen Phase beginnt und bis in die stationäre Phase anhält. Diese Differenzen lassen sich wahrscheinlich durch die Unterschiede in der Kultivierung erklären. In den beiden zitierten Studien wurden Kultivierungen im Schüttelkolben verwendet, bei denen die Zellen aufgrund von Limitierungen und Stressen schon frühzeitig asynchron werden und ein Teil der Zellen frühzeitig die Stationärphase einleitet. Hierdurch werden Expressionsstudien über den Wachstumsverlauf so verfälscht, dass die Verstärkung der *sigB*-Expression über einen scheinbar längeren Zeitraum gemessen werden kann. Es kann also behauptet werden, dass die Expression des *sigB*-Gens beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase erfolgt und es sich bei SigB um einen Sigmafaktor handelt, der sowohl an der Stressantwort als auch an der Wachstumsphasenregulation in *C. glutamicum* beteiligt ist.

Für die Identifizierung des SigB-abhängigen Regulons, das während des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre Phase exprimiert wird, ist es notwendig, ein Kultivierungssystem zu nutzen, das nicht durch Milieu-spezifische Stresse negativ beeinflusst wird. Halgasova *et al.* konnte zeigen, dass die Expression des *sigB*-Gens in *B. flavum* durch unterschiedliche Stresse initiiert wird (Halgasova *et al.*, 2002). Diese Stresse (pH-Schwankungen durch Sauerstofflimitierung und Temperaturschwankungen bei der Probennahme) treten ebenfalls während der Kultivierung von *C. glutamicum* im Schüttelkolben auf. Damit davon ausgegangen werden kann, daß die Expression des *sigB*-Gens nicht durch diese Stresse initiiert wird, sondern durch den Übergang in die stationäre Phase, wurde daher eine stressfreie Kultivierungsmethode für *C. glutamicum* etabliert. Bei dieser Kultivierungsmethode handelt es sich um die Glukose-limitierte-*batch*-Fermentation. Durch diese Kultivierungsmethode erfolgt eine verstärkte Expression des *sigB*-Gens nachdem die Kohlenstoffquelle verbraucht und so die stationäre Phase initiiert wurde. Die im SigB-Regulon enthaltenen Gene bereiten die Zelle vermutlich auf die verminderte Anwesenheit von Kohlenstoffquellen vor und schützen sie vor unterschiedlichen Stressen, die während der stationären Phase auftreten.

Dieses erfolgt beispielsweise durch die verstärkte Expression von Genen, die am Zentralstoffwechsel beteiligt sind. Diese sorgen zum einen für die Mobilisierung von in Glycogen gespeichertem Kohlenstoff und der Proteolyse von Polypeptiden und zum anderen für die gleichmäßige Verteilung der verbleibenden Ressourcen, z. B. auf Aminosäuren und Vitamine. Die durch Inbalancen im Stoffwechsel entstehenden, reaktiven Intermediate, wie Glyoxylate, sulfoxydiertes Methionin in Proteinen und Stickoxid werden durch Glyoxylasen, Methionin-R-Sulfoxid-Reduktasen oder das Stickoxid-bindende Protein Hmp spezifisch

neutralisiert. Desweiteren werden Gene stärker exprimiert, die an Membran- und Transportprozessen beteiligt sind. Diese könnten zusammen mit Funktionen des Phospholipid-Stoffwechsels die Zellhülle so beeinflussen, sodaß es zu einer Verdickung der Zellwand und einer Umorganisation der Membranstruktur in der stationären Phase kommt. Außerdem werden bestimmte Transkriptionsregulatorgene stärker transkribiert, die mit ihren Regulons vermutlich den auftretenden Stressen entgegenwirken sollen. Inwieweit die der Regulation durch SigB zugeschriebenen Gene alternativ auch durch diese Regulatoren beeinflusst werden, konnte hier nicht aufgeklärt werden und bedarf weiterer Studien.

Weber *et al.* 2005 konnten für *E.coli* zeigen, dass eine Vielzahl von Genen während der Transitionsphase durch den nicht-essentiellen Sigmafaktor SigS exprimiert werden (Weber *et al.*, 2005). Diese Gene ließen sich in funktionelle Gruppen unterteilen. Bei diesen Gruppen handelt es sich um Gene, die an Protein-Bearbeitungsreaktionen, der Stressantwort, Regulationen und Membranprozessen beteiligt sind. Vergleichende Analysen der regulierten Gene aus *E. coli* und *C. glutamicum* verdeutlichen, dass beide Sigmafaktoren suboptimales Wachstum sondieren und versuchen diesem entgegen zu wirken. So werden Gene transkribiert, die der Speicherung von Nährstoffen dienen und der zellulären Vergiftung entgegen wirken.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des *housekeeping*-Sigmafaktors SigA während der Transitionsphase verringert exprimiert wird. Gegensätzlich verhält sich die Expression des *sigA*-Gens in der *C. glutamicum-sigB*-Deletionsmutante. Hier bleibt die *sigA* Expression während der Transitionsphase weiterhin konstant, vermutlich um die Transkription der essentiellen Gene weiterhin aufrechtzuerhalten. Die Gene, deren Expression in Anwesenheit von SigB reduziert wird, weisen auf eine Transkription durch SigA hin. Durch die Expression von SigB kommt es zu einer Konkurrenz beider Sigmafaktoren (SigA und SigB) um die Bindung an das RNA-Polymerase-*core*-Enzym. Da *sigA* ebenfalls einen SigA-Promoter aufweist, führt diese Konkurrenz zu einer Verringerung der *sigA*-Expression (Patek *et al.*, 2003).

Für die Erkennung der -10- und -35-Region des Promotors sind die Protein-Regionen 2.4 und 4.2 des jeweiligen Sigmafaktors zuständig. Homologievergleiche dieser Regionen innerhalb des SigA- und SigB-Proteins aus *C. glutamicum* zeigten, dass diese Regionen hoch konserviert in beiden Sigmafaktoren vorliegen (Halgasova *et al.*, 2002; Oguiza *et al.*, 1996). Die Region 2.4 stimmt zwischen dem Sigmafaktor A und B mit 18 von 20 Aminosäuren überein. Die Aminosäuren Glutamin³¹⁹ und Threonin³²², die in *E. coli* für die Interaktion der 2.4-Region mit dem ersten Thymin der -10-Region verantwortlich sind (Barne *et al.*, 1997), sind ebenfalls innerhalb der Region 2.4 für den Sigmafaktor A und B aus *C. glutamicum* konserviert.

Dieses läßt die Vermutung zu, dass die RNA-Polymerase, nachdem der Sigmafaktor SigB an sie gebunden hat, denselben Promotor erkennt wie eine RNA-Polymerase, an die der Sigmafaktor SigA gebunden vorliegt. Die Region 2.5 ist in 15 von 22 Aminosäuren zwischen SigA und SigB konserviert. Allerdings sind die Aminosäuren Histidin³³⁷ und Glutamat³⁴⁰, die in *E. coli* für die Interaktion der 2.5-Region mit der *extended* -10-Region verantwortlich sind (Barne *et al.*, 1997), ebenfalls innerhalb der Region 2.5 für den Sigmafaktor A und B aus *C. glutamicum* konserviert. Inwiefern die benachbarten Aminosäuren Leucin³³⁸ und Glutamin³⁴¹, die sich innerhalb der 2.5 Region des Sigmafaktor A und B unterscheiden, ebenfalls an der Interaktion innerhalb der *extended* -10-Region beteiligt sind, konnte bisher nicht gezeigt werden.

Weiterhin konnte in anderen Organismen, wie zum Beispiel in *E. coli*, gezeigt werden, dass die Bindeaffinität des nicht-essentiellen Sigmafaktors SigS an dem *Core*-Enzyme der RNA-Polymerase geringer ist als die des *housekeeping*-Sigmafaktors SigA (Farewell *et al.*, 1998; Hicks & Grossman, 1996). Da die Menge an RNA-Polymerase limitiert ist, kommt es hinsichtlich der Bindung an die RNA-Polymerase zur Konkurrenz zwischen beiden Sigmafaktoren (Schweder *et al.*, 2002).

Da sich die -10-Konsensussequenzen beider Promotoren sehr ähneln, aber unterschiedliche Gene durch den jeweiligen Sigmafaktor reguliert werden, erfolgt die zweite Stufe der Regulation hinsichtlich der Bindeaffinität beider Sigmafaktoren an der RNA-Polymerase. Durch die verstärkte Expression des *sigB*-Gens während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase kommt es vermutlich zur Anreicherung des SigB-Proteins innerhalb der Zelle. Die Anreicherung des SigB-Proteins innerhalb der Zelle hat zur Folge, dass die Bindewahrscheinlichkeit trotz geringerer Bindeaffinität zum RNA-Polymerase-Enzym gesteigert wird. Aufgrund der Tatsache, dass *sigA* durch einen SigA-Promotor transkribiert wird (Patek *et al.*, 2003), wird die Expression des *sigA*-Gens

verringert. Dieses spiegelt sich in der verringerten Expressionsrate des SigA-Proteins während der frühen stationären Phase wieder. Durch diese Verschiebung der Verhältnisse beider Sigmafaktoren erfolgt die verstärkte Bindung des SigB-Proteins an die RNA-Polymerase und das SigB-abhängige Regulon wird verstärkt exprimiert.

Da SigA nicht mehr ausreichend an der RNA-Polymerase gebunden vorliegt, werden die *Housekeeping*-Gene nur noch bedingt transkribiert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Gene, die mittels des jeweiligen Sigmafaktor transkribiert werden, teilweise überlappen. So ist die Expression der essentiellen *Housekeeping*-Gene auch während des Übergangs in die stationäre Phase möglich (Tanaka *et al.*, 1993).

VI. Literaturverzeichnis:

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P. & Wilkinson, B. J. (1997). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3887-3894.
- Barksdale, L. (1970). *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Rev.* **4**, 378-422.
- Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J. & Minchin, S. D. (1997). Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *Embo. J.* **16**, 4034-4040.
- Barreiro, C., Gonzalez-Lavado, E., Patek, M. & Martin, J. F. (2004). Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *J. Bacteriol.* **186**, 4813-4817.
- Bayles, D. O. & Wilkinson, B. J. (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 23-27.
- Becker, L. A., Evans, S. N., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. (2000). Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* **182**, 7083-7087.
- Blanco, G., Sanchez, C., Rodicio, M. R., Mendez, C. & Salas, J. A. (2001). Identification of a growth phase-dependent promoter in the *rplJL* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 243-249.
- BPROM (2002). <http://www.softberry.com>.
- Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 57-65.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. & Bautz, E. K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**, 43-46.
- Constantinides, A. (1980). Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 119-136.
- Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1988). Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 3221-3229.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188-1190.

- Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121-147.
- Darst, S. A. (2001).** Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 155-162.
- Dombroski, A. J., Walter, W. A., Record, M. T., Jr., Siegele, D. A. & Gross, C. A. (1992).** Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**, 501-512.
- Dombroski, A. J., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1993).** The role of the sigma subunit in promoter recognition by RNA polymerase. *Cell. Mol. Biol. Res.* **39**, 311-317.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D. & other authors (2003).** EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.* **106**, 135-146.
- Doukhan, L., Predich, M., Nair, G., Dussurget, O., Mandic-Mulec, I., Cole, S. T., Smith, D. R. & Smith, I. (1995).** Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene* **165**, 67-70.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M. & Schaffer, S. (2004).** *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigma H. *Mol. Microbiol.* **52**, 285-302.
- Errington, J. (1993).** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 1-33.
- Farewell, A., Kvint, K. & Nyström, T. (1998).** Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol. Microbiol.* **29**, 1039-1051.
- Fassler, J. S. & Gussin, G. N. (1996).** Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies. *Methods Enzymol.* **273**, 3-29.
- Gardella, T., Moyle, H. & Susskind, M. M. (1989).** A mutant *Escherichia coli* sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* **206**, 579-590.
- Ghosh, P., Ishihama, A. & Chatterji, D. (2001).** *Escherichia coli* RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha2beta subassembly. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4621-4627.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4645-4649.
- Gross, C. A. (1996).** Function and regulation of the heat shock proteins. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. Edited by C. R. Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M. and Urnkarger H.E., Eds. Washington, DC.: American Society for Microbiology.

Gross, C. A., Lonetto, M. & Losick R. (1992). *Bacterial sigma factors*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory press.

Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 477-508.

Gruber, T. M. & Bryant, D. A. (1997). Molecular systematic studies of eubacteria, using sigma70-type sigma factors of group 1 and group 2. *J. Bacteriol.* **179**, 1734-1747.

Halgasova, N., Bukovska, G., Timko, J. & Kormanec, J. (2001). Cloning and transcriptional characterization of two sigma factor genes, *sigA* and *sigB*, from *Brevibacterium flavum*. *Curr. Microbiol.* **43**, 249-254.

Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J. & Kormanec, J. (2002). The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**, 77-84.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Harley, C. B. & Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2343-2361.

Hatakeyama, K., Kohama, K., Vertes, A. A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. & Yukawa, H. (1993). Analysis of the biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: cloning and sequencing of the *bioB* gene from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* **4**, 87-93.

Hecker, M., Schumann, W. & Volker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**, 417-428.

Helmann, J. D. & Chamberlin, M. J. (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 839-872.

Helmann, J. D. (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2351-2360.

Helmann, J. D., Wu, M. F., Kobel, P. A., Gamo, F. J., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M. & Paddon, C. (2001). Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J. Bacteriol.* **183**, 7318-7328.

Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. Edited by C. R. Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M. and Umberger H.E., Eds. Washington, DC.

Hengge-Aronis, R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*. In *Bacterial Stress Responses*, pp. 161-178. Edited by G. a. H.-A. Storz, R.: American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

- Hicks, K. A. & Grossman, A. D. (1996). Altering the level and regulation of the major sigma subunit of RNA polymerase affects gene expression and development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **20**, 201-212.
- Horsburgh, M. J. & Moir, A. (1999). Sigma M, an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.* **32**, 41-50.
- Hüser, A. T., Becker, A., Brune, I., Dondrup, M., Kalinowski, J., Plassmeier, J., Pühler, A., Wiegräbe, I. & Tauch, A. (2003). Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J. Biotechnol.* **106**, 269-286.
- Ikeda, M., Nakanishi, K., Kino, K. & Katsumata, R. (1994). Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 674-678.
- Ingram, L. O. & Vreeland, N. S. (1980). Differential effects of ethanol and hexanol on the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Bacteriol.* **144**, 481-488.
- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1986). Consequences of reduced intracellular coenzyme A content in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**, 866-871.
- Jishage, M. & Ishihama, A. (1995). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J. Bacteriol.* **177**, 6832-6835.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D. & other authors (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**, 5-25.
- Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T. & Furuya, A. (1984). Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**, 306-311.
- Keilty, S. & Rosenberg, M. (1987). Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 6389-6395.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono M. (1957). Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Appl. Microbiol.*, **3**, 193-205.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono M. (1985). Glutamic acid bacteria. In *Biology of industrial microorganisms.*, pp. 115-142. London: Benjamin/Cummings Publishing: Demain, A.L. & Solomon, N.A. (eds).
- Kircher, M., & Leuchtenberger, W. (1998). Aminosäuren - ein Beitrag zur Welternährung. In *Biologie in unserer Zeit*, pp. 281-293.
- Kocan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, V. F. & Bott, M. (2006). Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J. Bacteriol.* **188**, 724-732.

- Koch, D. J., Rückert, C., Albersmeier, A., Hüser, A. T., Tauch, A., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2005a).** The transcriptional regulator SsuR activates expression of the *Corynebacterium glutamicum* sulphonate utilization genes in the absence of sulphate. *Mol. Microbiol.* **58**, 480-494.
- Koch, D. J., Rückert, C., Rey, D. A., Mix, A., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2005b).** Role of the *ssu* and *seu* genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6104-6114.
- Kuldell, N. & Hochschild, A. (1994).** Amino acid substitutions in the -35 recognition motif of sigma 70 that result in defects in phage lambda repressor-stimulated transcription. *J. Bacteriol.* **176**, 2991-2998.
- Kumar, A., Malloch, R. A., Fujita, N., Smillie, D. A., Ishihama, A. & Hayward, R. S. (1993).** The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J. Mol. Biol.* **232**, 406-418.
- Li, M., Moyle, H. & Susskind, M. M. (1994).** Target of the transcriptional activation function of phage lambda cI protein. *Science* **263**, 75-77.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. & Schleifer, K. H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**, 299-303.
- Liebl, W. (1991).** *The genus Corynebacterium nonmedical*. VCH, Weinheim.
- Lonetto, M., Gribskov, M. & Gross, C. A. (1992).** The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**, 3843-3849.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E. & Buttner, M. J. (1994).** Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 7573-7577.
- Macnab, R. M. (1996).** Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*, pp. 123-145. Edited by R. Curtiss III, Inggraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H.E., Eds. Washington, DC.: American Society of Microbiology.
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Krämer, F. R. & Smith, I. (1999).** Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **31**, 715-724.
- Martin, D. W., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993a).** Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. *J. Bacteriol.* **175**, 1153-1164.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993b).** Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8377-8381.

- Mc Hardy, A. C., Tauch, A., Rückert, C., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2003).** Genome-based analysis of biosynthetic aminotransferase genes of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 229-240.
- Mecenas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J. & Gross, C. A. (1993).** The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**, 2618-2628.
- Merrick, M., Gibbins, J. & Toukdarian, A. (1987).** The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 323-330.
- Merrick, M. J. (1993).** In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol. Microbiol.* **10**, 903-909.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A. C. & other authors (2003).** GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic. Acids. Res.* **31**, 2187-2195.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H. & Severinov, K. (2001).** Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 892-897.
- Mogk, A., Volker, A., Engelmann, S., Hecker, M., Schumann, W. & Volker, U. (1998).** Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J. Bacteriol.* **180**, 2895-2900.
- Moyle, H., Waldburger, C. & Susskind, M. M. (1991).** Hierarchies of base pair preferences in the P22 *ant* promoter. *J. Bacteriol.* **173**, 1944-1950.
- Mulvey, M. R. & Loewen, P. C. (1989).** Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel sigma transcription factor. *Nucleic. Acids Res.* **17**, 9979-9991.
- Nakahigashi, K., Yanagi, H. & Yura, T. (1995).** Isolation and sequence analysis of *rpoH* genes encoding sigma 32 homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. *Nucleic. Acids Res.* **23**, 4383-4390.
- Nakunst, D. (2003).** Charakterisierung der alternativen Sigmafaktoren aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. In *Diplomarbeit, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld*.
- Narberhaus, F., Krummenacher, P., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (1997).** Three disparately regulated genes for sigma 32-like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **24**, 93-104.
- NNPP (1999).** http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html.
- Ogata, K. (1975).** The microbial production of nucleic acid-related compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 209-247.

- Oguiza, J. A., Marcos, A. T., Malumbres, M. & Martin, J. F. (1996).** Multiple sigma factor genes in *Brevibacterium lactofermentum*: characterization of *sigA* and *sigB*. *J. Bacteriol.* **178**, 550-553.
- Oguiza, J. A., Marcos, A. T. & Martin, J. F. (1997).** Transcriptional analysis of the *sigA* and *sigB* genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**, 111-117.
- Park, H. D., Guinn, K. M., Harrell, M. I., Liao, R., Voskuil, M. I., Tompa, M., Schoolnik, G. K. & Sherman, D. R. (2003).** Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **48**, 833-843.
- Patek, M., Eikmanns, B. J., Patek, J. & Sahn, H. (1996).** Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology* **142**, 1297-1309.
- Patek, M., Nesvera, J., Guyonvarch, A., Reyes, O. & Leblon, G. (2003).** Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 311-323.
- Pearson, W. R. (2000).** Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol. Biol.* **132**, 185-219.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids Res.* **29**, e45.
- Polyakov, A., Severinova, E. & Darst, S. A. (1995).** Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell* **83**, 365-373.
- Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J. & Kustu, S. (1989).** Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**, 629-635.
- Priest, F. G. (1977).** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**, 711-753.
- Pühler, A., & Kalinowski, J. (1995).** Molekulargenetik am Beispiel Aminosäureproduzierender *Corynebakterien*. In *Biologie in unserer Zeit*, pp. 221-229.
- Record, M. D. R., W.S. Craig, M.L. McQuade, K. & Schlax, P.J. (1996).** *Escherichia coli* RNA polymerase, promoters, and the kinetics of the Steps of transcription initiation. In : *Escherichia coli* and *Samonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology (Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin" E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H.E., Eds.). Washington DC.: American Society for Microbiology.
- Rock, C. O., Park, H. W. & Jackowski, S. (2003).** Role of feedback regulation of pantothenate kinase (CoaA) in control of coenzyme A levels in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 3410-3415.

- Sahm, H. & Eggeling, L. (1999).** D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1973-1979.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, G. (1994).** Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* **223**, 7-24.
- Sasse-Dwight, S. & Gralla, J. D. (1990).** Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54. *Cell* **62**, 945-954.
- Schäfer, A., Tauch, A., Droste, N., Pühler, A. & Kalinowski, J. (1994).** Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **176**, 7306-7319.
- Schweder, T., Lin, H. Y., Jürgen, B., Breitenstein, A., Riemschneider, S., Khalameyzer, V., Gupta, A., Büttner, K. & Neubauer, P. (2002).** Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 330-337.
- Schwinde, J. W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1993).** Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **175**, 3905-3908.
- Serwold-Davis, T. M., Groman, N. B. & Kao, C. C. (1990).** Localization of an origin of replication in *Corynebacterium diphtheriae* broad host range plasmid pNG2 that also functions in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**, 119-123.
- Siegele, D. A., Hu, J. C., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1989).** Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **206**, 591-603.
- Silberbach, M., Schafer, M., Hüser, A. T., Kalinowski, J., Pühler, A., Kramer, R. & Burkovski, A. (2005).** Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2391-2402.
- Stackebrandt E., W. C. R. (1982).** The evolution of prokaryotes. In *Molecular and cellular aspects of microbial evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Staden, R. (1996).** Indexing and using sequence databases. *Methods Enzymol.* **266**, 105-114.
- Steed, P. M. & Wanner, B. L. (1993).** Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J. Bacteriol.* **175**, 6797-6809.
- Studholme, D. J. & Dixon, R. (2003).** Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **185**, 1757-1767.

- Takayanagi, Y., Tanaka, K. & Takahashi, H. (1994).** Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 525-531.
- Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. & Takahashi, H. (1993).** Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3511-3515.
- Tauch, A., Kirchner, O., Wehmeier, L., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1994).** *Corynebacterium glutamicum* DNA is subjected to methylation-restriction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**, 343-347.
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1995).** The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. *Plasmid* **34**, 119-131.
- Tauch, A., Homann, I., Mormann, S. & other authors (2002).** Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J. Biotechnol.* **95**, 25-38.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* **22**, 4673-4680.
- Thöny, B. & Hennecke, H. (1989).** "The -24/-12 promoter comes of age." *FEMS Microbiol. Rev.* **63**, 341-358.
- Travers, A. A. & Burgess, R. R. (1969).** Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature* **222**, 537-540.
- Vallari, D. S., Jackowski, S. & Rock, C. O. (1987).** Regulation of pantothenate kinase by coenzyme A and its thioesters. *J. Biol. Chem.* **262**, 2468-2471.
- Voskuil, M. I., Voepel, K. & Chambliss, G. H. (1995).** The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **17**, 271-279.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R. & Susskind, M. M. (1990).** Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* sigma 70 affecting promoter recognition. *J. Mol. Biol.* **215**, 267-276.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005).** Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* **187**, 1591-1603.

- Wilson, C. & Dombroski, A. J. (1997).** Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **267**, 60-74.
- Wösten, M. M. (1998).** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 127-150.
- Wu, C. (1995).** Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**, 441-469.
- Xie, Z. D., Hershberger, C. D., Shankar, S., Ye, R. W. & Chakrabarty, A. M. (1996).** Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* **178**, 4990-4996.
- Yamada, Y., Seo, C. W. & Okada, H. (1985).** Oxidation of acyclic terpenoids by *Corynebacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 960-963.
- Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993).** Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 321-350.
- Zhou, Y. N., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1992).** A mutant sigma 32 with a small deletion in conserved region 3 of sigma has reduced affinity for core RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **174**, 5005-5012.
- Zuber, P., Healy, J., Carter, H. L., 3rd, Cutting, S., Moran, C. P., Jr. & Losick, R. (1989).** Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor. *J. Mol. Biol.* **206**, 605-614.

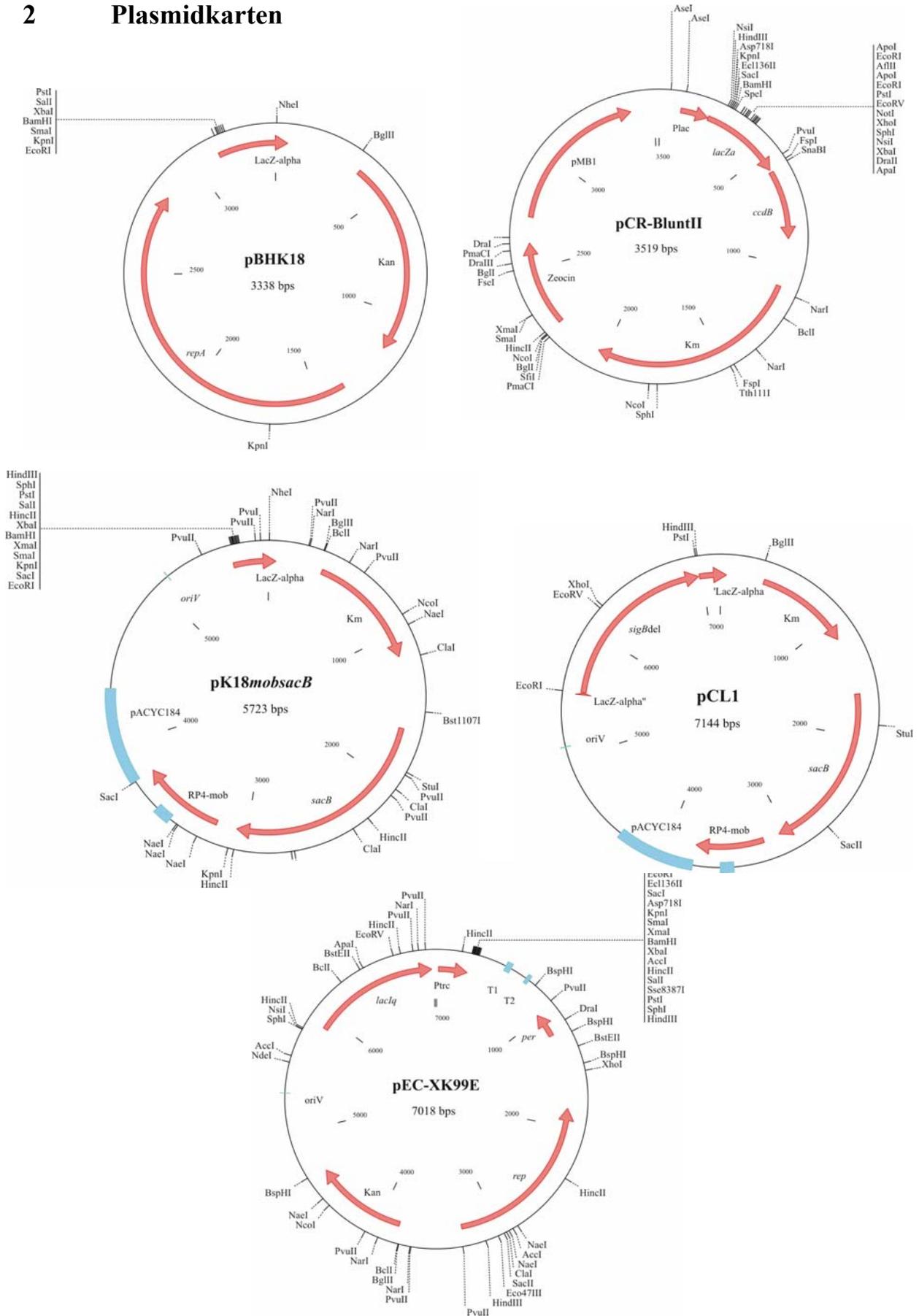
VII. Anhang

1 Häufig verwendete Abkürzungen

Ω	Ohm (elektrischer Widerstand)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BHIS	<i>Brain-Heart-Infusion</i> Sorbitol Medium
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
<i>C.g.</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
Eppi	1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
Km ^r	Kanamycinresistenz
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
Lsg.	Lösung
M	Molar
M ₋	Mega (10^6)
m ₋	milli (10^{-3})
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulare Masse
n ₋	Nano (10^{-9})
Nx ^r	Nalidixinsäureresistenz
o.D.	optische Dichte

ORF	offenes Leseraster
PA	Pennasay Broth
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Suc	Saccharose
T	Thymin
TA	Tris-Acetat
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
Tet ^r	Tetracyclinresistenz
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Enzymeinheit)
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

2 Plasmidkarten



3 Microarray-Experiment von *C. glutamicum* RES167 (Transitionsphase / exponentielle-Phase)

Gelb markiert sind die ORFs, die sowohl im Wildtyp als auch in der *sigB*-Deletionsmutante verstärkt exprimiert werden und somit dem SigB-Regulon vermutlich nicht angehören.

CDS	Genname	Ratio	Annotation
<i>cg2147</i>		12,97	membrane protein. BioY family
<i>cg2148</i>		8,64	ABC transporter. ATP-binding protein
<i>cg0096</i>		8,43	conserved hypothetical protein
<i>cg0097</i>		5,95	conserved hypothetical protein
<i>cg2885</i>	<i>bioA</i>	4,26	adenosylmethionine-8-Amino-7-oxononanoate aminotransferase
<i>cg0291</i>		3,73	3,4-dioxygenase beta subunit
<i>cg1129</i>	<i>aroF</i>	3,67	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
<i>cg1091</i>		3,61	hypothetical protein
<i>cg3330</i>		3,26	putative secreted protein
<i>cg2149</i>		3,10	predicted permease (cobalt permease subfamily)
<i>cg3141</i>	<i>hmp</i>	3,04	flavoheomprotein
<i>cg1131</i>		3,00	conserved hypothetical protein
<i>cg1227</i>		2,98	ABC-type cobalt transport system, ATPase component
<i>cg0998</i>		2,96	trypsin-like serine protease
<i>cg1286</i>		2,93	conserved hypothetical protein
<i>cg1130</i>	<i>uppS1</i>	2,83	putative undecaprenyl pyrophosphate synthetase
<i>cg2418</i>	<i>ilvE</i>	2,80	branched-chain amino acid aminotransferase
<i>cg1084</i>	<i>cgtR10</i>	2,77	putative two component response regulator
<i>cg2810</i>		2,70	Na ⁺ /H ⁺ -dicarboxylate symporter family
<i>cg1417</i>		2,66	acetyltransferase
<i>cg1082</i>		2,62	putative membrane protein
<i>cg1345</i>	<i>narK</i>	2,56	putative nitrate/nitrite transporter
<i>cg2057</i>		2,55	putative secreted protein
<i>cg2886</i>	<i>bioD</i>	2,49	dethiobiotin synthetase protein
<i>cg2842</i>	<i>phoU</i>	2,48	phosphate uptake regulator
<i>cg1930</i>		2,45	putative secreted hydrolase
<i>cg0935</i>		2,43	conserved hypothetical protein
<i>cg2215</i>		2,37	putative membrane protein
<i>cg1083</i>	<i>cgtS10</i>	2,35	probable two component sensor kinase
<i>cg2440</i>		2,35	permease of the major facilitator superfamily
<i>cg0467</i>		2,33	cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system, secreted component
<i>cg2884</i>		2,31	dipeptide/tripeptide permease
<i>cg0465</i>		2,31	conserved hypothetical membrane protein
<i>cg2797</i>		2,31	conserved hypothetical protein
<i>cg0806</i>		2,30	conserved hypothetical protein
<i>cg2796</i>		2,28	MMGE/PRPD family protein
<i>cg3337</i>		2,27	putative membrane protein
<i>cg1623</i>		2,27	predicted divalent heavy-metal cations transporter
<i>cg2614</i>		2,26	bacterial regulatory proteins. TetR family
<i>cg2676</i>		2,26	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems
<i>cg1479</i>	<i>glgP1</i>	2,25	putative glycogen phosphorylase
<i>cg1783</i>	<i>soxA</i>	2,23	sarcosine oxidase
<i>cg3022</i>		2,21	acetyl-CoA acetyltransferase
<i>cg0378</i>		2,21	putative phage-associated protein
<i>cg2850</i>		2,21	conserved hypothetical protein

<i>cg2105</i>		2,20	conserved hypothetical protein
<i>cg3230</i>		2,19	putative transcriptional regulator
<i>cg2999</i>		2,17	putative ferredoxin reductase
<i>cg1132</i>	<i>coaA</i>	2,16	pantothenate kinase
<i>cg2888</i>	<i>cgtR3</i>	2,16	putative two component response regulator
<i>cg3329</i>		2,13	conserved hypothetical protein
<i>cg2078</i>		2,13	peptide methionine sulfoxide reductase
<i>cg1073</i>		2,09	predicted lactoylglutathione lyase
<i>cg1622</i>		2,08	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system
<i>cg3194</i>		2,08	membrane-associated PA-phosphatase related phosphoesterase
<i>cg3338</i>		2,06	putative membrane protein
<i>cg1028</i>		2,06	putative restriction-modification system: methylase
<i>cg0753</i>		2,05	secreted protein
<i>cg2377</i>	<i>mraW</i>	2,05	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
<i>cg0999</i>		2,03	putative molybdenum cofactor biosynthesis protein
<i>cg1718</i>		2,03	phospholipid-binding protein
<i>cg0866</i>		2,02	purine/pyrimidine phosphoribosyl transferase
<i>cg1344</i>	<i>narG</i>	2,02	nitrate reductase 2 alpha subunit
<i>cg2425</i>		2,01	predicted permease
<i>cg1304</i>		2,99	putative secreted protein
<i>cg0878</i>	<i>whiB1</i>	1,99	transcription factor WhiB
<i>cg3169</i>	<i>pck</i>	1,98	probable phosphoenolpyruvate carboxikinase
<i>cg1291</i>		1,98	putative membrane protein
<i>cg1081</i>		1,97	ABC-type multidrug transport system
<i>cg0230</i>	<i>gltD</i>	1,96	glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase
<i>cg2405</i>	<i>qcrC</i>	1,96	cytochrome C1
<i>cg0195</i>		1,96	membrane protein
<i>cg2102</i>	<i>sigB</i>	1,95	RNA Polymerase sigma factor
<i>cg1271</i>	<i>sigE</i>	1,95	RNA Polymerase sigma factor, ECF family
<i>cg0277</i>		1,92	sodium:sulfate symporter transmembrane component
<i>cg0748</i>		1,92	cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems
<i>cg2106</i>		1,89	conserved hypothetical protein
<i>cg1000</i>		1,89	conserved hypothetical protein
<i>cg0466</i>		1,89	conserved secreted protein
<i>cg2152</i>		1,87	predicted transcriptional regulator
<i>cg2402</i>		1,87	NPL/P60 family secreted protein
<i>cg1606</i>	<i>pyrG</i>	1,87	CTP synthetase
<i>cg2053</i>		1,86	putative membrane protein
<i>cg1158</i>		1,86	putative secreted protein
<i>cg1855</i>	<i>hisS</i>	1,86	histidyl-tRNA synthetase
<i>cg1434</i>	<i>yggB</i>	1,86	small-conductance mechanosensitive channel
<i>cg2419</i>	<i>pepB</i>	1,85	leucine aminopeptidase
<i>cg2830</i>	<i>pduO</i>	1,84	adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase
<i>cg2066</i>		1,84	uncharacterized low-complexity protein
<i>cg2613</i>	<i>mdh</i>	1,84	malate dehydrogenase oxidoreductase protein
<i>cg1110</i>		1,84	conserved hypothetical protein
<i>cg0263</i>	<i>modA</i>	1,83	molybdate-binding secreted protein
<i>cg2409</i>	<i>ctaC</i>	1,83	cytochrome C oxidase chain II
<i>cg1086</i>		1,83	putative membrane protein
<i>cg2238</i>	<i>thiS</i>	1,83	sulfur transfer protein involved in thiamine biosynthesis
<i>cg3091</i>		1,83	conserved hypothetical protein
<i>cg0431</i>		1,82	conserved membrane protein
<i>cg0867</i>		1,82	ribosome-associated protein Y (PSrp-1)

<i>cg2946</i>		1,81	CarD-like transcriptional regulator
<i>cg1095</i>		1,80	hypothetical protein
<i>cg3292</i>		1,80	copper chaperone
<i>cg2675</i>		1,80	ATPase component of ABC-type transport system
<i>cg3277</i>		1,80	uncharacterized ACR. double-stranded beta-helix domain
<i>cg1096</i>		1,78	hypothetical protein
<i>cg1730</i>		1,78	secreted protease subunit. stomatin/prohibitin homolog
<i>cg2151</i>		1,76	similar to phage shock protein A
<i>cg2239</i>	<i>thiG</i>	1,76	thiamine biosynthesis protein
<i>cg3344</i>		1,76	nitroreductase
<i>cg1852</i>	<i>sdaA</i>	1,76	probable L-serine dehydrogenase
<i>cg2883</i>		1,75	SAM-dependent methyltransferase
<i>cg4000</i>		1,75	hypothetical protein
<i>cg2311</i>		1,75	SAM-dependent methyltransferase
<i>cg0825</i>		1,75	short chain dehydrogenase
<i>cg0752</i>		1,75	putative secreted or membrane protein
<i>cg1670</i>		1,75	conserved hypothetical protein
<i>cg0289</i>	<i>gltX</i>	1,74	glutamyl-tRNA synthetase
<i>cg1684</i>	<i>tatC</i>	1,74	Sec-independent protein secretion pathway component
<i>cg2809</i>		1,73	putative membrane protein
<i>cg0303</i>	<i>leuA</i>	1,73	2-Isopropylmalate synthase
<i>cg1897</i>		1,72	putative secreted protein
<i>cg0004</i>	<i>dnaN</i>	1,72	DNA polymerase III, beta subunit
<i>cg3213</i>		1,71	putative secreted protein
<i>cg2678</i>		1,71	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems
<i>cg1874</i>		1,70	putative membrane protein
<i>cg0944</i>		1,70	xanthine/uracil permeases family
<i>cg1274</i>	<i>mrp</i>	1,70	ATPases involved in chromosome partitioning
<i>cg0380</i>		1,70	hypothetical protein
<i>cg1717</i>		1,70	putative membrane protein
<i>cg1203</i>		1,69	Mg-chelatase subunit ChII
<i>cg3063</i>	<i>purA</i>	1,69	adenylosuccinate synthetase
<i>cg1784</i>	<i>ocd</i>	1,69	probable ornithine cyclodeaminase protein
<i>cg3164</i>		1,69	putative secreted or membrane protein
<i>cg0781</i>		1,69	membrane protein
<i>cg0432</i>		1,68	probable lipopolysaccharide modification acyltransferase
<i>cg2113</i>		1,68	hypothetical protein
<i>cg1594</i>	<i>tyrS</i>	1,68	tyrosyl-tRNA synthetase
<i>cg0269</i>		1,67	conserved hypothetical protein
<i>cg3067</i>		1,66	putative membrane protein
<i>cg0527</i>		1,66	putative ArsR-family transcriptional regulator
<i>cg1281</i>		1,66	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system
<i>cg2553</i>		1,65	2'-5' RNA ligase
<i>cg2579</i>		1,65	protein DegV family
<i>cg0411</i>		1,65	putative membrane protein
<i>cg1209</i>	<i>phnA</i>	1,65	Zn-ribbon-containing protein involved in phosphonate metabolism
<i>cg2459</i>	<i>ptpA</i>	1,65	protein-tyrosine-phosphatase
<i>cg0048</i>	<i>ppiA</i>	1,64	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
<i>cg0683</i>		1,64	permease
<i>cg2056</i>		1,64	putative membrane protein
<i>cg2252</i>		1,63	double-stranded beta-helix domain
<i>cg2214</i>		1,63	predicted Fe-S-cluster redox enzyme
<i>cg3193</i>		1,63	membrane-associated phospholipid phosphatase

<i>cg0243</i>		1,63	membrane protein
<i>cg2400</i>		1,63	putative glycosyl transferase
<i>cg0194</i>		1,62	hypothetical secreted protein
<i>cg0300</i>		1,62	hypothetical tripeptide synthase involved in murein formation
<i>cg2666</i>		1,61	hypothetical protein
<i>cg1903</i>		1,61	ABC-type multidrug transport system
<i>cg3066</i>		1,61	putative membrane protein
<i>cg0526</i>		1,61	translation initiation inhibitor, YjgF family
<i>cg3304</i>	<i>dnaB</i>	1,61	putative replicative DNA helicase
<i>cg1172</i>		1,60	conserved hypothetical protein
<i>cg3075</i>	<i>cmr</i>	1,60	multidrug resistance protein
<i>cg0749</i>	<i>spoU</i>	1,60	putative tRNA/rRNA methyltransferase protein
<i>cg2372</i>	<i>mraY</i>	1,60	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
<i>cg0592</i>		1,60	butyryl-CoA: acetate coenzyme A transferase
<i>cg1451</i>	<i>serA</i>	1,59	phosphoglycerate Dehydrogenase
<i>cg1001</i>	<i>mscL</i>	1,59	large conductance mechanosensitive channel
<i>cg3088</i>	<i>arr</i>	1,59	rifampin ADP-ribosyl transferase
<i>cg3004</i>	<i>gabDI</i>	1,59	probable succinate-semialdehyde dehydrogenase oxidoreductase
<i>cg2175</i>	<i>rbfA</i>	1,59	ribosome-binding factor A
<i>cg0648</i>	<i>adk</i>	1,59	adenylate kinase
<i>cg2441</i>		1,58	permease
<i>cg0083</i>		1,58	mononucleotide transporter
<i>cg0218</i>		1,58	O-methyl transferase (N-terminal fragment)
<i>cg0766</i>	<i>icd</i>	1,57	isocitrate dehydrogenase
<i>cg3432</i>	<i>rpmH</i>	1,57	50S Ribosomale protein L34
<i>cg1980</i>		1,57	MoxR-like ATPase
<i>cg2293</i>		1,57	putative indole-3-glycerol phosphate synthase
<i>cg1386</i>	<i>fixA</i>	1,57	putative electron transfer flavoprotein
<i>cg1624</i>		1,57	NhaP-type Na ⁺ /H ⁺ and K ⁺ /H ⁺ antiporter
<i>cg2611</i>	<i>hscA</i>	1,56	molecular chaperone, Hsp70 family
<i>cg0161</i>		1,56	putative secreted or membrane protein
<i>cg2535</i>		1,56	putative secreted protein
<i>cg1120</i>		1,56	AraC-type DNA-binding domain-containing protein
<i>cg0696</i>	<i>sigD</i>	1,56	RNA Polymerase sigma factor, ECF family
<i>cg2103</i>	<i>dtxR</i>	1,55	iron dependent regulatory protein
<i>cg3254</i>		1,55	putative membrane protein
<i>cg3020</i>		1,55	putative membrane protein
<i>cg2375</i>	<i>ftsI</i>	1,55	penicillin-binding protein
<i>cg2958</i>	<i>butA</i>	1,55	L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase
<i>cg2178</i>	<i>nusA</i>	1,54	putative transcriptional termination/antitermination factor
<i>cg3340</i>	<i>dadA</i>	1,54	putative D-amino acid dehydrogenase
<i>cg3211</i>		1,54	putative secreted protein
<i>cg2964</i>	<i>guaBI</i>	1,54	inositole-monophosphate dehydrogenase
<i>cg2355</i>	<i>dinP</i>	1,54	nucleotidyltransferase/DNA polymerase involved in DNA repair
<i>cg0647</i>	<i>secY</i>	1,54	preprotein translocase subunit SecY
<i>cg1739</i>		1,53	glutamine amidotransferase domain
<i>cg3092</i>		1,53	2-polyprenylphenol hydroxylase or related flavodoxin oxidoreductase
<i>cg2615</i>		1,53	putative transcriptional regulator PadR-like family
<i>cg2374</i>	<i>murE</i>	1,53	probable UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2
<i>cg2089</i>		1,53	conserved hypothetical protein
<i>cg2042</i>		1,53	putative secreted protein
<i>cg2502</i>	<i>fur</i>	1,53	ferric uptake regulation protein

<i>cg0428</i>		1,52	transposase
<i>cg2174</i>		1,52	exopolyphosphatase-related protein
<i>cg0923</i>		1,52	membrane protein
<i>cg0850</i>	<i>whiB2</i>	1,52	transcription factor WhiB
<i>cg2857</i>	<i>purF</i>	1,52	amidophosphoribosyltransferase
<i>cg0600</i>	<i>rplV</i>	0,66	ribosomal protein L22
<i>cg0602</i>	<i>rplP</i>	0,66	50S Ribosomal protein L16
<i>cg3009</i>		0,66	hypothetical protein
<i>cg3012</i>		0,66	putative membrane protein
<i>cg2249</i>	<i>trmD</i>	0,66	tRNA (Guanine-N1)-methyltransferase
<i>cg0593</i>	<i>rpsJ</i>	0,66	ribosomal protein S10
<i>cg3046</i>	<i>pknG</i>	0,66	Serine/threonine protein kinase
<i>cg0335</i>		0,66	conserved hypothetical protein
<i>cg0556</i>	<i>ubiE</i>	0,66	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase
<i>cg1996</i>	<i>cglIM</i>	0,66	modification methylase
<i>cg2867</i>	<i>gpx</i>	0,66	glutathione peroxidase
<i>cg0477</i>		0,65	hypothetical protein
<i>cg1071</i>	<i>pth1</i>	0,65	probable peptidyl-tRNA hydrolase protein
<i>cg1069</i>	<i>gapX</i>	0,65	glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase
<i>cg1690</i>		0,65	putative proteasome component
<i>cg0402</i>	<i>rmlCD</i>	0,65	DTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase
<i>cg2889</i>		0,65	bacterial regulatory proteins, MerR family
<i>cg3207</i>	<i>pheA</i>	0,65	prephenate dehydratase
<i>cg1382</i>	<i>glgE</i>	0,65	putative alpha-amylase
<i>cg1332</i>		0,65	putative secreted hydrolase
<i>cg2636</i>	<i>catA1</i>	0,65	catechol 1,2-dioxygenase
<i>cg2155</i>		0,65	conserved hypothetical protein
<i>cg0231</i>		0,65	membrane protein
<i>cg0693</i>	<i>groEL</i>	0,65	chaperonin
<i>cg3318</i>		0,65	uncharacterized enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides
<i>cg1904</i>		0,65	putative membrane protein
<i>cg2138</i>	<i>gluC</i>	0,64	glutamate permease
<i>cg2181</i>		0,64	ABC-type peptide transport system
<i>cg3021</i>		0,64	peptidase M20/M25/M40 family
<i>cg4003</i>		0,64	hypothetical protein
<i>cg1214</i>		0,64	cysteine sulfinatase desulfinase/cysteine desulfurase or related enzyme
<i>cg0933</i>		0,64	DNA or RNA helicase of superfamily II
<i>cg2257</i>	<i>srp</i>	0,64	signal recognition particle GTPase
<i>cg2563</i>	<i>lcoP</i>	0,63	ectoine betaine transporter
<i>cg2900</i>	<i>ddh</i>	0,63	meso-diaminopimelate dehydrogenase
<i>cg2514</i>		0,63	conserved hypothetical protein
<i>cg0632</i>	<i>rpmD</i>	0,63	50S Ribosomal protein L30
<i>cg1292</i>		0,63	flavin-containing monooxygenase 3
<i>cg0419</i>		0,63	glycosyltransferase
<i>cg1438</i>		0,63	ABC-type nitrate/sulfonate/taurine/bicarbonate transport system
<i>cg2539</i>	<i>ectP</i>	0,63	ectoine/proline/glycine betaine carrier EctP
<i>cg2979</i>	<i>folK</i>	0,63	7, 8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase
<i>cg2981</i>	<i>folX</i>	0,63	dihydroneopterin aldolase
<i>cg1564</i>	<i>rpmI</i>	0,63	50S Ribosomal protein L35
<i>cg2263</i>		0,63	conserved hypothetical protein
<i>cg1735</i>		0,62	secreted cell wall-associated hydrolase
<i>cg1169</i>		0,62	Na ⁺ -dependent transporters of the SNF family

<i>cg2222</i>	<i>rpsB</i>	0,62	30S ribosomal protein S2
<i>cg1467</i>		0,62	putative TetR-family transcriptional regulator
<i>cg1488</i>	<i>leuD</i>	0,62	3-isopropylmalate dehydratase
<i>cg1531</i>	<i>rpsA</i>	0,61	30S ribosomal protein S1
<i>cg0374</i>		0,61	conserved hypothetical protein
<i>cg2462</i>		0,61	bacterial regulatory proteins, TetR family
<i>cg1795</i>	<i>uvrC</i>	0,61	nuclease subunit of the excinuclease ABC complex
<i>cg2028</i>		0,61	hypothetical protein
<i>cg2647</i>	<i>tig</i>	0,61	trigger factor, ppiase involved into cell division, chaperone
<i>cg0957</i>	<i>fas-IB</i>	0,61	fatty acid synthase
<i>cg2031</i>		0,61	conserved hypothetical protein
<i>cg0318</i>	<i>arsC1</i>	0,61	putative heavy metal resistance membrane protein
<i>cg0837</i>		0,61	hypothetical protein
<i>cg1338</i>	<i>thrB</i>	0,61	homoserine kinase
<i>cg0297</i>		0,61	uncharacterized BCR, YbaB family COG0718
<i>cg1277</i>		0,61	conserved hypothetical membrane protein
<i>cg2560</i>	<i>aceA</i>	0,60	isocitrate lyase
<i>cg2840</i>	<i>actA</i>	0,60	butyryl-CoA:acetate coenzyme A transferase
<i>cg1381</i>	<i>glgB</i>	0,60	1,4-alpha-glucan branching enzyme
<i>cg1483</i>		0,60	putative membrane protein
<i>cg1448</i>		0,60	conserved hypothetical protein
<i>cg1537</i>	<i>ptsG</i>	0,60	glucose-specific enzyme II BC component of Pts
<i>cg0203</i>	<i>iolE</i>	0,60	phosphate isomerases/epimerase
<i>cg1688</i>		0,59	putative proteasome component
<i>cg1765</i>		0,59	predicted transcriptional regulator
<i>cg1819</i>		0,59	nucleoside-diphosphate sugar epimerase (SulA family)
<i>cg1789</i>	<i>tpi</i>	0,59	trisphosphate isomerase
<i>cg0259</i>	<i>moaB</i>	0,59	molybdenum cofactor biosynthesis protein
<i>cg1787</i>	<i>ppc</i>	0,59	phosphoenolpyruvate carboxylase
<i>cg3017</i>		0,59	putative membrane protein
<i>cg2707</i>		0,59	conserved hypothetical protein
<i>cg2324</i>		0,58	conserved hypothetical protein
<i>cg2385</i>		0,58	putative membrane protein
<i>cg1380</i>	<i>ssuA</i>	0,58	aliphatic sulfonate binding protein
<i>cg0728</i>	<i>phr</i>	0,58	deoxyribodipyrimidine photolyase
<i>cg0041</i>		0,58	putative solute-binding lipoprotein, signal peptid
<i>cg0474</i>		0,58	conserved hypothetical protein
<i>cg0791</i>	<i>pyc</i>	0,58	pyruvate carboxylase
<i>cg2310</i>	<i>glgX</i>	0,58	glycogen debranching enzyme
<i>cg2529</i>	<i>treS</i>	0,57	trehalose synthase (Maltose alpha-D-glucosyltransferase)
<i>cg1487</i>	<i>leuC</i>	0,57	3-isopropylmalate dehydratase
<i>cg0401</i>	<i>rmlA1</i>	0,57	TDP-Glucose pyrophosphorylase
<i>cg0393</i>		0,57	conserved hypothetical membrane protein
<i>cg0830</i>		0,56	membrane protein
<i>cg2928</i>	<i>nagB</i>	0,56	N-Acetylglucosamine-6-phosphate isomerase
<i>cg2969</i>		0,56	acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases
<i>cg0148</i>	<i>panC</i>	0,56	pantoate-beta-alanine ligase protein
<i>cg3048</i>	<i>pta</i>	0,55	phosphate acetyltransferase
<i>cg2835</i>		0,55	predicted acetyltransferase
<i>cg3015</i>		0,55	hypothetical protein
<i>cg2241</i>		0,55	putative transcriptional accessory protein, RNA binding
<i>cg2574</i>		0,55	LysE type translocator
<i>cg0898</i>		0,55	pyridoxine biosynthesis enzyme

<i>cg0690</i>	<i>groES</i>	0,54	chaperonin 10 KD subunit
<i>cg2005</i>		0,54	conserved hypothetical protein
<i>cg2359</i>	<i>ileS</i>	0,54	isoleucine-tRNA ligase protein
<i>cg2080</i>		0,54	conserved hypothetical protein
<i>cg3068</i>	<i>fda</i>	0,54	fructose-bisphosphate aldolase
<i>cg2953</i>	<i>xylC</i>	0,54	benzaldehyde dehydrogenase
<i>cg2183</i>		0,54	ABC-type peptide transport system
<i>cg3011</i>	<i>groEL</i>	0,54	chaperonin 60KD subunit
<i>cg0233</i>		0,54	conserved hypothetical protein
<i>cg2703</i>		0,53	sugar permease
<i>cg2645</i>	<i>clpP1</i>	0,53	ATP-dependent clp protease, proteolytic subunit
<i>cg2789</i>	<i>nrdH</i>	0,53	putative glutaredoxin NrdH
<i>cg2004</i>		0,52	hypothetical protein
<i>cg2575</i>		0,52	ankyrin repeat protein
<i>cg0181</i>		0,52	putative DNA repair protein
<i>cg2470</i>		0,52	secreted ABC-transporter substrate-binding protein
<i>cg2136</i>	<i>gluA</i>	0,52	glutamate uptake system ATP-binding protein
<i>cg0823</i>	<i>ntaA</i>	0,52	nitrilotriacetate monooxygenase component A
<i>cg0274</i>		0,52	putative oxidoreductase protein
<i>cg1744</i>	<i>pacL</i>	0,52	cation-transporting ATPase
<i>cg0834</i>		0,52	bacterial extracellular solute-binding protein
<i>cg0298</i>	<i>recR</i>	0,51	DNA repair protein (RecF pathway)
<i>cg1860</i>		0,51	putative membrane protein
<i>cg2925</i>	<i>ptsS</i>	0,51	Enzyme II sucrose protein
<i>cg1565</i>	<i>rplT</i>	0,51	50S Ribosomal protein L20
<i>cg2708</i>	<i>msiK1</i>	0,51	ABC-type sugar transport system
<i>cg1153</i>	<i>ssiG</i>	0,50	putative monooxygenase
<i>cg1999</i>		0,50	hypothetical protein
<i>cg2378</i>	<i>mraZ</i>	0,49	MRAZ
<i>cg0892</i>		0,49	conserved hypothetical protein
<i>cg2092</i>	<i>sigA</i>	0,49	RNA polymerase sigma 70 factor
<i>cg1453</i>	<i>leuB</i>	0,49	3-Isopropylmalate dehydrogenase
<i>cg0838</i>		0,48	helicase
<i>cg3380</i>		0,48	putative oxidoreductase protein
<i>cg1790</i>	<i>pgk</i>	0,48	phosphoglycerate kinase
<i>cg0699</i>	<i>guaB2</i>	0,48	inositole-monophosphate dehydrogenase
<i>cg1911</i>		0,48	putative secreted protein
<i>cg3219</i>	<i>ldh</i>	0,47	L-lactate dehydrogenase
<i>cg1595</i>	<i>uspA2</i>	0,46	universal stress protein UspA
<i>cg1167</i>		0,45	putative secreted protein
<i>cg3195</i>		0,45	flavin-containing monooxygenase (FMO)
<i>cg3096</i>		0,45	aldehyde dehydrogenase
<i>cg0757</i>		0,43	conserved hypothetical protein
<i>cg0177</i>		0,43	hypothetical protein
<i>cg2513</i>	<i>phoH2</i>	0,43	phosphate starvation-inducible protein
<i>cg1639</i>		0,43	membrane protein containing CBS domain
<i>cg0812</i>	<i>dtsR1</i>	0,42	acetyl/propionyl-CoA carboxylase beta chain
<i>cg1147</i>		0,42	conserved protein
<i>cg1108</i>	<i>porC</i>	0,42	putative secreted protein
<i>cg2468</i>		0,42	branched-chain amino acid ABC-type transport system
<i>cg0899</i>		0,41	glutamine amidotransferase involved in pyridoxine biosynthesis
<i>cg1013</i>		0,41	hypothetical protein
<i>cg2464</i>		0,40	conserved hypothetical protein

<i>cg2467</i>		0,40	ABC-transporter ATP-binding protein
<i>cg1152</i>	<i>ssiF</i>	0,39	putative monooxygenase
<i>cg3175</i>		0,39	putative membrane protein
<i>cg0573</i>	<i>rplL</i>	0,39	probable 50S ribosomal subunit L7/L12
<i>cg2704</i>		0,38	ABC-type sugar transport system. permease component
<i>cg2705</i>	<i>amyE</i>	0,37	maltose-binding protein precursor
<i>cg2588</i>	<i>proB</i>	0,37	glutamate 5-kinase protein
<i>cg0572</i>	<i>rplJ</i>	0,37	50S ribosomal protein L10
<i>cg1640</i>		0,35	membrane protein
<i>cg3100</i>	<i>dnaK</i>	0,33	heat shock protein Hsp70
<i>cg0756</i>	<i>cstA</i>	0,33	putative carbon starvation protein A
<i>cg1379</i>	<i>ssuB</i>	0,30	aliphatic sulfonates ATP-binding ABC-transporter
<i>cg1349</i>		0,29	membrane protein
<i>cg2511</i>		0,29	putative membrane protein
<i>cg1109</i>	<i>porB</i>	0,28	anion-specific porin precursor
<i>cg2875</i>		0,28	hypothetical protein
<i>cg1791</i>	<i>gap</i>	0,25	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>cg1376</i>	<i>ssuD1</i>	0,23	alkanesulfonate monooxygenase
<i>cg1377</i>	<i>ssuC</i>	0,22	aliphatic sulfonates transmembrane ABC-transporter
<i>cg1156</i>	<i>ssuD2</i>	0,21	alkanesulfonate monooxygenase

4 Microarray-Experiment von *C. glutamicum* CL1 (Transitionsphase / exponentielle-Phase)

CDS	Genname	Ratio	Annotation
<i>cg0378</i>		2,59	putative phage-associated protein
<i>cg0095</i>	<i>bioB</i>	2,41	biotin synthase
<i>cg2147</i>		2,28	membrane protein, BioY family
<i>cg2148</i>		2,28	ABC-transporter
<i>cg2485</i>	<i>phoD</i>	2,20	secreted alkaline phosphatase precursor
<i>cg1227</i>		2,20	putative membrane protein
<i>cg0160</i>		2,09	hypothetical protein
<i>cg1718</i>		1,99	phospholipid-binding protein
<i>cg3230</i>		1,99	putative transcriptional regulator
<i>cg3254</i>		1,95	putative membrane protein
<i>cg2614</i>		1,93	bacterial regulatory proteins, TetR family
<i>cg3419</i>		1,91	membrane protein, virulence factor homolog
<i>cg2303</i>	<i>hisB</i>	1,89	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
<i>cg2885</i>	<i>bioA</i>	1,88	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase
<i>cg1737</i>	<i>acn</i>	1,88	aconitase
<i>cg0161</i>		1,85	putative secreted or membrane protein
<i>cg4000</i>		1,84	hypothetical protein
<i>cg0795</i>		1,84	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
<i>cg1341</i>	<i>narI</i>	1,83	respiratory nitrate reductase 2 gamma chain
<i>cg1967</i>		1,81	hypothetical protein
<i>cg2424</i>		1,81	putative membrane protein
<i>cg2937</i>		1,80	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system
<i>cg2675</i>		1,79	ATPase component of ABC-type transport system
<i>cg1438</i>		1,79	ABC-type nitrate/sulfonate/taurine/bicarbonate transport system

<i>cg2227</i>		1,78	predicted ATPase with chaperone activity
<i>cg3292</i>		1,78	copper chaperone
<i>cg2405</i>	<i>qcrC</i>	1,78	cytochrome C1
<i>cg0253</i>		1,78	flavodoxin reductase
<i>cg3179</i>	<i>fadD2</i>	1,76	putative acyl-CoA synthetase
<i>cg1295</i>		1,76	predicted hydrolase or acyltransferase
<i>cg0184</i>		1,75	conserved hypothetical protein
<i>cg1670</i>		1,75	conserved hypothetical protein
<i>cg1479</i>	<i>glgP1</i>	1,75	putative glycogen phosphorylase
<i>cg2311</i>		1,75	SAM-dependent methyltransferase
<i>cg2089</i>		1,74	conserved hypothetical protein
<i>cg0752</i>		1,74	putative secreted or membrane protein
<i>cg1861</i>	<i>rel</i>	1,74	ppGpp synthetase
<i>cg2920</i>		1,74	permease of the major facilitator superfamily
<i>cg3289</i>		1,73	thiol-disulfide isomerase or thioredoxin
<i>cg0291</i>		1,73	3,4-dioxygenase beta subunit
<i>cg0289</i>	<i>gltX</i>	1,73	glutmyl-tRNA synthetase
<i>cg1855</i>	<i>hisS</i>	1,73	histigyl-tRNA synthetase
<i>cg0598</i>	<i>rplB</i>	1,72	50S Ribosomales protein L2
<i>cg1073</i>		1,72	predicted lactoylglutathione lyase
<i>cg1344</i>	<i>narG</i>	1,72	nitrate reductase 2
<i>cg2979</i>	<i>folK</i>	1,71	7, 8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase
<i>cg1653</i>	<i>pgp1</i>	1,70	putative phosphoglycolate phosphatase
<i>cg0230</i>	<i>gltD</i>	1,70	glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase
<i>cg0866</i>		1,70	purine/pyrimidine phosphoribosyl transferase
<i>cg0820</i>	<i>purE</i>	1,70	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
<i>cg3156</i>		1,70	putative secreted protein
<i>cg0138</i>		1,69	ATP/GTP-binding protein
<i>cg1157</i>	<i>glpX</i>	1,69	Fructose-1,6-bisphosphatase II
<i>cg1449</i>		1,69	conserved hypothetical protein
<i>cg2886</i>	<i>bioD</i>	1,69	dethiobiotin synthetase protein
<i>cg1432</i>	<i>ilvD</i>	1,69	dihydroxy-acid dehydratase
<i>cg2149</i>		1,69	permease (cobalt permease subfamily)
<i>cg1343</i>	<i>narH</i>	1,69	probable respiratory nitrate reductase oxidoreductase
<i>cg3227</i>	<i>lldA</i>	1,69	putative L-lactate dehydrogenase
<i>cg1895</i>		1,68	putative secreted protein
<i>cg0211</i>		1,68	putative oxidoreductase
<i>cg0597</i>	<i>rplW</i>	1,68	50S ribosomal protein L23
<i>cg2239</i>	<i>thiG</i>	1,68	thiamin biosynthesis protein
<i>cg2263</i>		1,68	conserved hypothetical protein
<i>cg2113</i>		1,68	hypothetical protein
<i>cg1434</i>	<i>yggB</i>	1,67	small-conductance mechanosensitive channel
<i>cg2524</i>		1,67	putative glucan export composite transmembrane protein
<i>cg0957</i>	<i>fas-IB</i>	1,66	fatty acid synthase
<i>cg2701</i>		1,66	putative membrane protein
<i>cg0843</i>		1,66	helicase
<i>cg0450</i>		1,66	conserved hypothetical protein
<i>cg0766</i>	<i>icd</i>	1,66	isocitrate dehydrogenase
<i>cg1136</i>		1,66	conserved hypothetical protein
<i>cg1730</i>		1,65	secreted protease subunit, stomatin/prohibitin homolog
<i>cg0115</i>	<i>ureC</i>	1,65	urease alpha subunit
<i>cg2884</i>		1,65	dipeptide/tripeptide permease
<i>cg0935</i>		1,65	conserved hypothetical protein

<i>cg0510</i>	<i>hemD</i>	1,64	uroporphyrinogen III synthase/methyltransferase
<i>cg3340</i>	<i>dadA</i>	1,64	putative D-amino acid dehydrogenase
<i>cg1411</i>		1,64	ABC-type sugar (aldose) transport system
<i>cg0844</i>		1,64	type II restriction enzyme, methylase subunit
<i>cg3215</i>	<i>glpQ1</i>	1,64	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
<i>cg1203</i>		1,63	Mg-chelatase subunit ChII
<i>cg2372</i>	<i>mraY</i>	1,63	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
<i>cg1184</i>		1,63	transposase
<i>cg2215</i>		1,62	putative membrane protein
<i>cg3157</i>		1,62	putative secreted protein
<i>cg2057</i>		1,61	putative secreted protein
<i>cg1345</i>	<i>narK</i>	1,61	putative nitrate/nitrite transporter
<i>cg2078</i>		1,61	peptide methionine sulfoxide reductase-related protein
<i>cg0303</i>	<i>leuA</i>	1,61	2-isopropylmalate synthase
<i>cg2499</i>	<i>glyS</i>	1,60	glycyl-tRNA synthetase
<i>cg1853</i>	<i>glpD</i>	1,60	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
<i>cg2170</i>	<i>truB</i>	1,60	tRNA pseudouridine synthase B
<i>cg0186</i>		1,60	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
<i>cg1120</i>		1,60	AraC-type DNA-binding domain-containing protein
<i>cg3313</i>	<i>mrcB</i>	1,59	membrane carboxypeptidase
<i>cg2317</i>		1,59	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system
<i>cg0825</i>		1,59	short chain dehydrogenase, N-terminal fragment
<i>cg0672</i>		1,58	conserved hypothetical protein
<i>cg2535</i>		1,58	putative secreted protein
<i>cg1555</i>		1,58	superfamily I DNA or RNA helicase
<i>cg1609</i>		1,58	ATPase component of ABC transporter
<i>cg1773</i>	<i>ctaB</i>	1,57	polyprenyltransferase
<i>cg1129</i>	<i>aroF</i>	1,57	probable phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
<i>cg0973</i>	<i>pgi</i>	1,57	glucose-6-phosphate isomerase
<i>cg3079</i>	<i>clpB</i>	1,56	probable ATP-dependent protease (heat shock protein)
<i>cg0052</i>		1,56	putative iron-siderophore uptake system
<i>cg0251</i>		1,56	quinone oxidoreductase
<i>cg1570</i>	<i>ugpB</i>	1,56	secreted sn-glycerol-3-phosphate-binding protein
<i>cg1825</i>	<i>efp</i>	1,56	translation elongation factor P
<i>cg0344</i>	<i>fabG1</i>	1,56	3-oxoacyl reductase
<i>cg3011</i>	<i>groEL</i>	1,56	chaperonin 60KD subunit
<i>cg2374</i>	<i>murE</i>	1,56	probable UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2
<i>cg3351</i>	<i>nagI</i>	1,56	probable gentisate 1,2-dioxygenase oxidoreductase
<i>cg2194</i>	<i>gor</i>	1,56	putative glutathione reductase
<i>cg1100</i>		1,55	ABC-transporter transmembrane component
<i>cg3009</i>		1,55	hypothetical protein
<i>cg2700</i>	<i>phoB</i>	1,55	alkaline phosphatase precursor
<i>cg2844</i>	<i>pstA</i>	1,55	ABC-type phosphate transport system
<i>cg1784</i>	<i>ocd</i>	1,55	probable ornithine cyclodeaminase protein
<i>cg0647</i>	<i>secY</i>	1,55	preprotein translocase subunit SecY
<i>cg0238</i>		1,55	L-gulonolactone oxidase
<i>cg0198</i>		1,55	conserved hypothetical protein
<i>cg1594</i>	<i>tyrS</i>	1,55	tyrosyl-tRNA synthetase
<i>cg3424</i>	<i>cwlM</i>	1,55	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase
<i>cg0897</i>	<i>pdxR</i>	1,54	pyridoxine biosynthesis transcriptional regulator. aminotransferase
<i>cg0229</i>	<i>gltB</i>	1,54	glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase
<i>cg2434</i>		1,54	luciferase-like monooxygenase
<i>cg1630</i>		1,54	putative signal transduction protein

<i>cg1884</i>		1,54	putative membrane protein
<i>cg1695</i>		1,53	putative plasmid maintenance system antidote protein
<i>cg1318</i>		1,53	DNA repair exonuclease
<i>cg2615</i>		1,53	putative transcriptional regulator PadR-like family
<i>cg2099</i>		1,52	putative membrane protein
<i>cg2106</i>		1,52	conserved hypothetical protein
<i>cg2791</i>	<i>rpmJ</i>	1,52	ribosomal protein L36
<i>cg2875</i>		1,52	hypothetical protein
<i>cg1013</i>		0,66	hypothetical protein
<i>cg0443</i>		0,66	putative transcriptional regulatory protein
<i>cg0848</i>	<i>wbbL</i>	0,66	DTDP-RHA:A-D-glcnae-diphosphoryl polypren
<i>cg3035</i>		0,66	acetyltransferase
<i>cg2152</i>		0,66	predicted transcriptional regulator
<i>cg0046</i>		0,66	probable ABC-transporter protein
<i>cg1671</i>		0,66	putative membrane-associated GTPase
<i>cg2443</i>		0,66	permease of the major facilitator superfamily
<i>cg1066</i>		0,66	ABC-type branched-chain amino acid transport systems
<i>cg0346</i>	<i>fadE</i>	0,66	glutaryl-CoA dehydrogenase
<i>cg2807</i>	<i>tmp11a</i>	0,65	transposase
<i>cg0961</i>		0,65	alpha/beta hydrolase fold
<i>cg0412</i>		0,65	membrane protein
<i>cg0424</i>		0,65	putative glycosyltransferase
<i>cg3245</i>		0,65	permease of the major facilitator superfamily
<i>cg0435</i>	<i>udgA1</i>	0,65	UDP-glucose 6-dehydrogenase
<i>cg0870</i>		0,65	haloacid dehalogenase/epoxide hydrolase family
<i>cg4003</i>		0,65	hypothetical protein
<i>cg1346</i>	<i>mog</i>	0,65	putative molybdopterin biosynthesis mog protein
<i>cg3219</i>	<i>ldh</i>	0,65	L-lactate dehydrogenase
<i>cg3034</i>	<i>def1</i>	0,64	polypeptide deformylase
<i>cg2254</i>		0,64	ankyrin repeat protein
<i>cg2023</i>		0,64	putative membrane protein
<i>cg3256</i>		0,64	alkanal monooxygenase alpha chain
<i>cg2265</i>	<i>smc</i>	0,64	chromosome segregation ATPase
<i>cg0281</i>		0,64	putative cytosine deaminase
<i>cg1710</i>	<i>bacA</i>	0,64	bacitracin resistance undecaprenol kinase
<i>cg0675</i>	<i>mrsA</i>	0,64	phosphoglucosamine mutase
<i>cg3113</i>		0,64	conserved hypothetical protein
<i>cg0551</i>	<i>menC</i>	0,64	similar to o-succinylbenzoate-CoA synthase
<i>cg3427</i>	<i>parA1</i>	0,64	ATPases involved in chromosome partitioning
<i>cg2153</i>		0,64	similar to competence- and mitomycin-induced protein
<i>cg3380</i>		0,64	putative oxidoreductase protein
<i>cg0938</i>		0,63	cold shock protein
<i>cg2101</i>		0,63	putative D-Tyr-tRNA ^{Tyr} deacylase
<i>cg0723</i>	<i>crtE</i>	0,63	geranylgeranyl-pyrophosphate sythase
<i>cg1742</i>		0,63	ACT domain-containing protein
<i>cg1307</i>		0,63	superfamily II DNA and RNA helicase
<i>cg2588</i>	<i>proB</i>	0,63	glutamate 5-kinase protein
<i>cg1010</i>		0,63	putative membrane protein
<i>cg1265</i>		0,63	conserved hypothetical protein
<i>cg3102</i>		0,63	secreted nucleoside phosphorylase
<i>cg2162</i>		0,63	similar to thymidylate synthase complementing protein
<i>cg2307</i>		0,63	putative membrane protein
<i>cg2958</i>	<i>butA</i>	0,63	L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase

<i>cg1089</i>		0,63	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system
<i>cg3354</i>		0,63	aromatic-ring hydroxylase (flavoprotein monooxygenase)
<i>cg1951</i>	<i>tnp14a</i>	0,63	transposase
<i>cg3321</i>		0,63	ABC-type transport system. involved in lipoprotein release
<i>cg2151</i>		0,63	similar to phage shock protein A
<i>cg2206</i>	<i>ispG</i>	0,63	involved in the nonmevalonate pathway of terpenoid biosynthesis
<i>cg1471</i>		0,63	hypothetical protein
<i>cg2336</i>		0,63	putative secreted protein
<i>cg0066</i>		0,63	hypothetical protein
<i>cg2984</i>	<i>ftsH</i>	0,62	cell-division protein (ATP-dependent Zn metallopeptidase)
<i>cg2705</i>	<i>amyE</i>	0,62	maltose-binding protein precursor
<i>cg1577</i>		0,62	putative secreted hydrolase
<i>cg0826</i>		0,62	putative membrane protein
<i>cg2805</i>	<i>psp4</i>	0,62	putative secreted protein
<i>cg1734</i>	<i>hemH</i>	0,62	ferrochelatae precursor
<i>cg0602</i>	<i>rplP</i>	0,62	50S Ribosomal protein L16
<i>cg1995</i>		0,62	hypothetical protein
<i>cg2195</i>		0,61	putative secreted or membrane protein
<i>cg0884</i>		0,61	conserved hypothetical protein
<i>cg1045</i>		0,61	conserved hypothetical protein
<i>cg0221</i>		0,61	probable LacI-family transcriptional regulator
<i>cg3210</i>		0,61	cell envelope-related transcriptional regulator
<i>cg1278</i>		0,61	conserved hypothetical secreted protein
<i>cg0511</i>		0,60	hypothetical protein
<i>cg2235</i>	<i>rplS</i>	0,60	50S ribosomal protein L19
<i>cg0181</i>		0,60	putative DNA repair protein
<i>cg2691</i>		0,60	conserved hypothetical protein
<i>cg1379</i>	<i>ssuB</i>	0,60	aliphatic sulfonates ATP-binding ABC-transporter
<i>cg2124</i>		0,60	hypothetical protein
<i>cg1349</i>		0,59	membrane protein
<i>cg2867</i>	<i>gpx</i>	0,59	glutathione peroxidase
<i>cg1348</i>		0,59	membrane protein
<i>cg1942</i>		0,59	putative secreted protein
<i>cg1389</i>		0,59	putative secreted protein
<i>cg0989</i>	<i>rpsN</i>	0,59	30S ribosomal protein S14
<i>cg1735</i>		0,59	secreted cell wall-associated hydrolase
<i>cg1614</i>		0,59	conserved hypothetical protein
<i>cg1108</i>	<i>porC</i>	0,59	putative secreted protein
<i>cg0899</i>		0,58	glutamine amidotransferase involved in pyridoxine biosynthesis
<i>cg0955</i>		0,58	secreted protein
<i>cg2464</i>		0,58	conserved hypothetical protein
<i>cg2647</i>	<i>tig</i>	0,58	trigger factor, ppiase involved into cell division
<i>cg3135</i>		0,58	putative membrane protein
<i>cg2574</i>		0,58	LysE type translocator
<i>cg2575</i>		0,57	ankyrin repeat protein
<i>cg0236</i>		0,57	membrane protein
<i>cg1642</i>		0,57	siderophore-interacting protein
<i>cg1662</i>		0,57	putative secreted protein
<i>cg1517</i>		0,57	putative secreted protein
<i>cg3175</i>		0,57	putative membrane protein
<i>cg0556</i>	<i>ubiE</i>	0,56	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase
<i>cg0394</i>		0,56	glycosyl transferase
<i>cg1640</i>		0,56	membrane protein

<i>cg2232</i>	<i>lepB</i>	0,56	probable signal peptidase I
<i>cg0499</i>		0,56	hypothetical protein
<i>cg1369</i>	<i>atpC</i>	0,55	probable ATP synthase epsilon chain protein
<i>cg0280</i>		0,55	conserved hypothetical protein
<i>cg2919</i>		0,55	putative oxidoreductase
<i>cg0652</i>	<i>rpsM</i>	0,55	ribosomal protein S13
<i>cg1011</i>		0,55	putative membrane protein
<i>cg1444</i>		0,55	putative flavoprotein oxygenase
<i>cg2216</i>	<i>cdsA</i>	0,54	phosphate cytidyl transferase
<i>cg2080</i>		0,54	conserved hypothetical protein
<i>cg0898</i>		0,54	pyridoxine biosynthesis enzyme
<i>cg0064</i>		0,54	conserved hypothetical protein
<i>cg2957</i>		0,53	conserved hypothetical protein
<i>cg2946</i>		0,53	CarD-like transcriptional regulator
<i>cg0436</i>		0,53	hypothetical protein
<i>cg0010</i>		0,53	conserved hypothetical protein
<i>cg2047</i>		0,52	putative secreted protein
<i>cg2812</i>		0,52	ABC-type transport system
<i>cg1909</i>		0,52	hypothetical protein
<i>cg1565</i>	<i>rplT</i>	0,52	50S Ribosomal protein L20
<i>cg0345</i>		0,52	metal-dependent hydrolase
<i>cg1516</i>		0,52	hypothetical protein
<i>cg3197</i>	<i>psp5</i>	0,51	putative secreted protein
<i>cg2043</i>		0,51	conserved hypothetical protein
<i>cg1380</i>	<i>ssuA</i>	0,51	aliphatic sulfonate binding protein
<i>cg2196</i>		0,51	putative secreted or membrane protein
<i>cg0223</i>		0,50	metabolite transport protein
<i>cg1156</i>	<i>ssuD2</i>	0,50	alkanesulfonate monooxygenase
<i>cg0437</i>		0,50	membrane protein
<i>cg0651</i>	<i>infA</i>	0,49	translation initiation factor IF-1
<i>cg0141</i>		0,48	glyoxalase/bleomycin resistance protein
<i>cg0142</i>	<i>sixA</i>	0,48	phosphohistidin phosphatase
<i>cg1153</i>	<i>ssiG</i>	0,48	putative monooxygenase
<i>cg1765</i>		0,47	predicted transcriptional regulator
<i>cg0215</i>	<i>cspA</i>	0,47	cold-shock protein
<i>cg0562</i>	<i>nusG</i>	0,47	transcription antitermination protein NusG
<i>cg2378</i>	<i>mraZ</i>	0,47	MraZ
<i>cg1152</i>	<i>ssiF</i>	0,42	putative monooxygenase
<i>cg1377</i>	<i>ssuC</i>	0,40	aliphatic sulfonates transmembrane ABC-transporter
<i>cg1376</i>	<i>ssuD1</i>	0,33	alkanesulfonate monooxygenase
<i>cg1147</i>		0,31	conserved protein

5 SigB Regulon in *C. glutamicum*

Gene die in Anwesenheit von SigB (im Wildtyp) während der Transitionsphase unterschiedlich exprimiert werden. Die Promotoren, deren Gene mittels * markiert wurden, wurden ebenfalls *in vitro* mittels RACE-PCR bestimmt.

CDS	Genname	Funktion	m-Wert
AMINOSÄUREMETABOLISMUS UND PROTEOLYSE			
<i>cg0998</i>		trypsin-like serine protease	1,57
<i>cg1129</i>	<i>aroF</i>	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptanoate-aldolase	1,87
<i>cg1783</i>	<i>soxA'</i>	glycine/D-amino acid oxidase-fragment	1,16
<i>cg1930</i>		secreted trypsin-like serine protease	1,29
<i>cg2418*</i>	<i>ilvE</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase	1,48*
<i>cg2884</i>		dipeptide/tripeptide permease	1,21
<i>cg1453</i>	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	-1,04
<i>cg2588</i>	<i>proB</i>	glutamate 5-kinase protein	-1,43
KOHLNSTOFFMETABOLISMUS UND TRANSPORT			
<i>cg1479</i>	<i>glgP1</i>	glycogen phosphorylase	1,17
<i>cg2796</i>		MmgE/PrpD family protein	1,19
<i>cg0699</i>	<i>guaB2</i>	inositol-monophosphate dehydrogenase, CBS domain	-1,07
<i>cg0756</i>	<i>cstA</i>	putative carbon starvation protein A	-1,61
<i>cg0812</i>	<i>dtsR1</i>	acetyl/propionyl-CoA carboxylase	-1,24
<i>cg1790</i>	<i>pgk</i>	phosphoglycerate-kinase	-1,06
<i>cg1791</i>	<i>gap</i>	glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	-2,01
<i>cg2704</i>		sugar ABC-transporter, permease	-1,38
<i>cg2705</i>	<i>amyE</i>	sugar ABC-transporter, binding protein	-1,42
<i>cg3096</i>		aldehyde dehydrogenase	-1,17
<i>cg3219</i>	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	-1,10
<i>cg3380</i>		short-chain dehydrogenase	-1,06
STRESSABWEHR-MECHANISMUS			
<i>cg1028</i>		restriction-modifikation system, methylase	1,04
<i>cg0291</i>		intradiol ring-cleavage dioxygenase	1,90
<i>cg1073</i>		glyoxylase	1,06
<i>cg2078</i>		methionine-R-sulfoxide reductase	1,09
<i>cg2999</i>		FAD-dependent oxidoreductase	1,12
<i>cg3141*</i>	<i>hmp</i>	flavoheмоprotein involved in NO detoxifikation	1,61*
<i>cg1595</i>	<i>uspA2</i>	universal stress protein UspA	-1,11
<i>cg3100</i>	<i>dnaK</i>	heat shock protein hsp70	-1,58
MEMBRANPROZESSE			
<i>cg0465</i>		conserved hypothetical membrane protein	1,21
<i>cg0467</i>		cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system	1,22
<i>cg1082</i>		putative membrane protein	1,39
<i>cg1130</i>	<i>uppS1</i>	undecaprenyl pyrophosphate synthetase	1,50
<i>cg1344</i>	<i>narG</i>	nitrate reductase 2, alpha subunit	1,01
<i>cg1345</i>	<i>narK</i>	nitrate/nitrite transporter	1,36
<i>cg1622</i>		ABC-type multidrug/protein/lipid transport system	1,06
<i>cg1623</i>		divalent heavy-metal cations transporter	1,18
<i>cg2215</i>		membrane protein	1,25
<i>cg2377</i>	<i>mraW</i>	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	1,03
<i>cg2425</i>		permease	1,01
<i>cg2440</i>		permease	1,23
<i>cg2676</i>		ABC-type peptide/nickel transport system	1,18
<i>cg2810</i>		Na ⁺ /H ⁺ -dicarboxylate symporter family	1,43
<i>cg3337</i>		putative membrane protein	1,18

<i>cg3338</i>		putative membrane protein	1,04
<i>cg1108</i>	<i>porC</i>	putative porin precursor	-1,25
<i>cg1109</i>	<i>porB</i>	anion-specific porin precursor	-1,84
<i>cg1349</i>		membrane protein, CBS domain	-1,79
<i>cg1639</i>		membrane protein, CBS domain	-1,23
<i>cg1640</i>		membrane protein, CBS domain	-1,52
<i>cg2467</i>		ABC-transporter ATP-binding protein	-1,33
<i>cg2468</i>		ABC-transporter permease component	-1,26
<i>cg2511</i>		putative membrane protein	-1,80
<i>cg3175</i>		membrane protein	-1,36
<i>cg3195</i>		flavin-containing monooxygenase involved in K ⁺ transport	-1,16
PHOSPHAT-METABOLISMUS UND REGULATION			
<i>cg0866</i>		phosphoribosyl transferase	1,02
<i>cg1718</i>		phospholipid-binding protein	1,02
<i>cg2842</i>	<i>phoU</i>	phosphat uptake regulator	1,31
<i>cg2888</i>	<i>phoR</i>	Phosphat starvation two component response regulator	1,11
<i>cg3194</i>		membrane-associated phosphoesterase	1,06
<i>cg2513</i>	<i>phoH2</i>	phosphate starvation-inducible protein	-1,22
REGULATORISCHE PROZESSE			
<i>cg1083*</i>	<i>cgtS10</i>	probable two-component sensor kinase	1,23
<i>cg1084</i>	<i>cgtR10</i>	two-component response regulator	1,47
<i>cg2614</i>		bacterial regulatory proteins, TetR-family	1,18
<i>cg3230</i>		transcriptional regulator, λ repressor-like	1,13
TRANSKRIPTION UND TRANSLATION			
<i>cg0572</i>	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	-1,43
<i>cg0573</i>	<i>rplL</i>	50S ribosomal-subunit protein L7/L12	-1,37
<i>cg2092</i>	<i>sigA</i>	RNA polymerase sigma 70 factor	-1,03
VITAMINE/COFAKTOREN BIOSYNTHESE UND TRANSPORT			
<i>cg0999</i>		molybdenum cofaktor-biosynthesis protein	1,02
<i>cg1132</i>	<i>coaA</i>	pantothenat kinase	1,11
<i>cg0899</i>		glutamin amidotransferase/pyridoxine biosynthesis	-1,29
FUNKTION UNBEKANNT			
<i>cg0096*</i>		conserved hypothetical protein	3,08*
<i>cg0097</i>		conserved hypothetical protein	2,57
<i>cg0753</i>		secreted protein	1,04
<i>cg0806</i>		conserved hypothetical protein	1,20
<i>cg0935</i>		conserved hypothetical protein	1,28
<i>cg1091</i>		hypothetical protein	1,85
<i>cg1131</i>		conserved hypothetical protein	1,59
<i>cg1286</i>		conserved hypothetical protein	1,55
<i>cg1304</i>		secreted protein	1,58
<i>cg1417*</i>		GCN5-related N-acetyltransferase	1,41*
<i>cg2057</i>		secreted protein	1,35
<i>cg2105</i>		conserved hypothetical protein	1,14
<i>cg2797</i>		conserved hypothetical protein	1,21
<i>cg2850</i>		conserved hypothetical protein	1,14
<i>cg3022</i>		conserved hypothetical protein	1,15
<i>cg3329</i>		conserved hypothetical protein	1,09
<i>cg3330*</i>		putative secreted protein	1,71*
<i>cg0177</i>		hypothetical protein	-1,21
<i>cg0757</i>		conserved hypothetical protein	-1,20
<i>cg0838</i>		DEAD-box helicase	-1,05
<i>cg0892</i>		conserved hypothetical protein	-1,03
<i>cg1013</i>		hypothetical protein	-1,30

<i>cg1167</i>		putative secreted protein	-1,14
<i>cg1911</i>		putative secreted protein	-1,07
<i>cg2464</i>		conserved hypothetical protein	-1,32

Danksagung

Herrn Professor Dr. Alfred Pühler danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die wissenschaftliche Betreuung. Herrn Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und dafür, dass er mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Des weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Corynebakterien-Gruppe für das äußerst angenehme Arbeitsklima und den witzigen Freizeitaktivitäten. Hervorzuheben ist Robert Heinen, der mir immer für die Beantwortung von Fragen zur Verfügung stand.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich sowohl moralisch als auch finanziell unterstützt und mir so ein sorgenfreies Studium ermöglicht hat.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir mit viel Geduld und Verständnis, gerade in schweren Zeiten, zur Seite standen.

Erklärung

Mit der hier vorliegenden Dissertation beantrage ich beim Promotionsausschuß der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld die Eröffnung des Promotionsverfahrens nach § 5 der Promotionsordnung in der Fassung vom 03. Juni 2002.

Die Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung des Sigmafaktors SigB aus *Corynebacterium glutamicum* und seiner Rolle bei der Genexpression in der Transitionsphase des Wachstums“ erfolgte unter der Betreuung von Prof. Dr. Alfred Pühler am Lehrstuhl für Genetik der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld. Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Ich erkläre weiterhin, daß die vorliegende Dissertation weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

(Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ∞ ISO 9706)

Bielefeld, den 12.12.2006

Christof Josef Larisch