

# **Transkriptomanalyse von *Escherichia coli* unter Kohlenhydrat-Limitierung mittels DNA-Microarrays**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
**Karin Lemuth**  
aus Stuttgart

Hauptberichter:

Prof. Dr. R. D. Schmid

Nebenberichter:

Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. M. Reuss

Tag der mündlichen Prüfung:

12. Oktober 2006

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2006



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und selbständig verfasst habe.

Stuttgart im April 2006

**Karin Lemuth**

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten  
vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton (1643-1727), engl. Physiker, Mathematiker u. Astronom

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Bereitstellung des spannenden Themas und die mir gegebene Möglichkeit, am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart zu promovieren.

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss bedanke ich mich recht herzlich für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit und die damit verbundene Begutachtung.

Herrn Dr. Stefan Lange danke ich für die Betreuung sowie die hilfreiche, kritische Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. Martin Siemann-Herzberg seitens des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart für die angenehme Kooperation und zahlreiche hilfreiche Diskussionen. Speziell bedanke ich mich für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie deren hilfreiche intensive Durchsicht.

Stefan Winter danke ich für sein großes Interesse und die hilfreiche Unterstützung bezüglich der statistischen Auswertung der Daten sowie die Durchsicht des statistischen Parts der Arbeit. „Lieber Stefan, ich danke Dir für die Unterstützung ganz aus freien Stücken und ohne eine berufliche Notwendigkeit - was wäre die Arbeit ohne Dich geworden?“.

Der Arbeitsgruppe Siemann-Herzberg (IBVT)/Stringente Kontrolle und hier speziell Timo Hardiman danke ich für die Durchführung der Fermentationen und die mir gegebene Möglichkeit der Probe-Entnahme für die Microarray-Analyse. Ferner bedanke ich mich für die freundliche Atmosphäre während der Fermentationen sowie zahlreiche hilfreiche Diskussionen.

Danken möchte ich auch Frau Beate Rössle-Lorch für die Unterstützung beim Drucken der Microarrays sowie Frau Dr. Verena Grimm für die Einweisung in die Hybridisierungstechnik und die vielen hilfreichen Hinweise bezüglich der technischen Schwierigkeiten beim Drucken und Hybridisieren.

Bei der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie (ITB) bedanke ich mich für drei wirklich schöne Jahre. Ein großes Dankeschön an Dirk, an Lisa, an meinen „Pufferhasen“ und natürlich an Thomas. Danken möchte ich auch den vielen Diplomanden und

## Danksagung

---

Studienarbeitern, die im Lauf der drei Jahre kamen und gingen und mit zu der angenehmen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Freunden/Innen, die mich jede/r auf seine Weise beim Entstehen dieser Arbeit unterstützt haben. Speziell Barbara möchte ich danken für die liebevolle Begleitung meines Lebensweges sowie Jan für seine Kontinuität, Unterstützung und treue Freundschaft über viele Jahre hinweg.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, speziell meiner Mutter für ihr Interesse am Fortgang der Arbeit und im Besonderen meiner Tochter Valerie, die mir eine ganz neue Sichtweise auf die Welt ermöglicht hat.

*Meiner Oma in liebevoller Erinnerung gewidmet*

## Zusammenfassung

*Escherichia coli*, einer der best charakterisierten Mikroorganismen, weist unter Glukose-Limitierung zahlreiche physiologische Veränderungen auf. Eine Glukose-Limitierung setzt bei Glukose-Konzentrationen im millimolaren Konzentrationsbereich (Konzentrationen unter 0,05 g/L) ein. Ein Hauptcharakteristikum dieser physiologischen Veränderungen ist eine verminderte Wachstumsrate einhergehend mit einer verringerten Synthese stabiler RNAs (tRNAs und rRNAs) - ein Phänomen, das als „Stringente Kontrolle“ bezeichnet wird. Die Stringente Kontrolle wird durch das Effektor-Molekül ppGpp vermittelt. Dieses interagiert mit der RNA-Polymerase und bewirkt so eine veränderte Affinität derselben zu verschiedenen Promotoren und beeinflusst damit die Transkription. Erhöhte ppGpp-Konzentrationen haben hemmende Effekte auf die Ribosomen-Biosynthese, die Biosynthese von Lipiden und Fettsäuren sowie auf die DNA-Replikation. Ferner wird ppGpp ein positiver Einfluß auf Aminosäure-Biosynthese Enzyme und die Sigma S ( $\sigma^S$ )-vermittelte Stressantwort zugesprochen.

Weiterhin ist der Organismus im limitierten Glukose-Konzentrationsbereich bestrebt, die verbleibende Glukose über die Induktion hochaffiner Glukose-Transportsysteme aufzunehmen, sowie alternative Kohlenstoffquellen zu erschließen - eine Reaktion, die in der Übergangsphase vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase stattfindet. Man spricht hier auch von der Hungerantwort. Die Hungerantwort wird vorwiegend durch das cAMP/CRP-Modulon vermittelt. Dieses System erlaubt der Zelle die Expression zahlreicher Transportsysteme. Ferner führt eine Cra (FruR)-vermittelte Antwort zu einer Anpassung des Kohlenstoff-Flusses an die limitierten Glukose-Konzentrationen in der Umgebung.

Sinkt die Glukose-Konzentration in den submikromolaren Bereich ab, setzt als extremste Form des Hungerns die sogenannte „Starvation“ ein. Die Zelle erwirbt eine erhöhte Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren (Wasserstoffperoxid, Sauerstoffradikale, Dürre, saurer oder basischer pH-Wert, osmotischer Stress, Ethanol, Hitze sowie Kälte). Die „Starvation“ wird durch den alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^S$  vermittelt. Dieser assoziiert mit der RNA-Polymerase und führt so zur Expression verschiedener Proteine, welche der Zelle die erhöhte Stresstoleranz ermöglichen.

Viele Einzelaspekte der unter Glukose-Limitierung angeschalteten Stressantwort-Systeme sind in der Vergangenheit detailliert aufgeklärt worden. Neben klassischen molekularbiologischen Methoden kamen bereits ganzheitliche Ansätze wie die Expressions-Analyse mittels DNA-Microarrays oder die Proteomanalyse zur Aufklärung verschiedener Teilaspekte zum Einsatz. Eine eindeutige Differenzierung der verschiedenen Stressantworten in *E. coli* unter Glukose-Limitierung sowie deren zeitliche Zuordnung sind bisher jedoch aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht hinreichend möglich. In



diskontinuierlichen Batch-Kultivierungen werden die verschiedenen Phasen der durch Glukose-Mangel ausgelösten Stressantwort rasch durchlaufen. Speziell die Hungerantwort, begleitet durch das rasche Abfallen der Wachstumsrate, verläuft zeitlich eng begrenzt und ist somit experimentell schwer zu erfassen. Erste Ansätze zur Lösung dieses Problems bestanden in der Durchführung kontinuierlicher Fermentationen. Hierbei können mikromolare Glukose-Konzentrationen sowie Wachstumsraten über die Verdünnungsrate eingestellt und über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Die kontinuierliche Prozessführung erlaubt somit die Analyse eines genau definierten Zustandes. Nachfolgende Experimente haben jedoch gezeigt, dass eine Kultur in kontinuierlicher Fermentation unter Kohlenhydrat-Limitierung Änderungen auf der Transkriptom- und Proteomebene unterworfen ist. Eine längerfristige Kultivierung führt zu inhomogenen Kulturen z.B. durch Mutationen und damit auch zu einer Änderung auf Genom-Ebene.

Ziel der vorliegenden Dissertation war eine genauere Charakterisierung der physiologischen Antwort von *Escherichia coli* auf eine Glukose-Limitierung. Die Anpassung der Zelle sollte auf Transkriptom-Ebene mit Hilfe von eigens hergestellten gesamtgenomischen DNA-Microarrays analysiert werden. Die Zellproben wurden aus Fermentationen gewonnen, die im Rahmen einer Kooperation am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart durchgeführt wurden.

Die Glukose-Limitierung wurde durch eine gekoppelte Batch/Fed-Batch-Fermentations-Strategie mit konstanter Zulauftrate ausgelöst. Bis zur Glukose-Limitierung wurde die Batch-Fermentation durchgeführt. Die im darauffolgenden Fed-Batch verwendete limitierte Glukosezufütterung führte zu einer langsam abfallenden Wachstumsrate unter Limitierung und erlaubte eine Probenentnahme bei stetig sinkender Wachstumsrate über einen längeren Zeitraum hinweg. Die Kultivierung im Bioreaktor wurde ferner wegen der Möglichkeit der Kontrolle verschiedener Parameter wie der Glukose-Konzentration, des pH-Wertes sowie der O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Konzentration gewählt. Weiterhin sind bei Microarray-Experimenten höhere Reproduzierbarkeiten für die Analyse bakterieller Systeme im Bioreaktor im Vergleich zum Schüttelkolben beschrieben worden.

Über einen Zeitraum von sieben Stunden unter Glukose-Limitierung wurden acht verschiedene Proben für die DNA-Microarray-Analyse entnommen. Zusätzlich wurde eine Probe aus der unlimitierten Wachstumsphase (Batch) als Referenzprobe entnommen. Aus den Zellproben wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Während des Umschreibens wurden fluoreszenz-markierte dCTPs in die cDNA eingebaut. Die so gewonnene cDNA wurde über eine spezielle Strategie auf den Microarrays hybridisiert: Im vorliegenden Experiment interessierte der Vergleich verschiedener Zeitpunkte unter Glukose-Limitierung mit der unlimitierten Referenzprobe. Daher wurde das sogenannte

„Common Reference Design“ gewählt. Hier wird die Referenzprobe zusammen mit der jeweils interessierenden Probe auf dem Microarray hybridisiert. So kann der Unterschied jedes Zeitpunkts zur Referenz direkt angegeben werden. Insgesamt wurden drei Fermentationen analysiert.

Eine statistische Analyse der erzeugten Daten ergab signifikante Unterschiede zahlreicher Gene unter Glukose-limitierten Bedingungen im Vergleich zur Referenz. 22% des gesamten Genoms von *E. coli* waren betroffen.

Unter Glukose-Limitierung änderten sich die mRNA-Konzentrationen von insgesamt 962 Transkripten in mindestens einem Zeitpunkt signifikant im Vergleich zur Referenz. 367 der 962 Transkripte kodierten für hypothetische Proteine oder für Proteine mit noch unbekannter Funktion. Die Gene der übrigen 595 Transkripte konnten den physiologischen Funktionen Anabolismus (128 Transkripte), Katabolismus (51 Transkripte), Zentraler Kohlenstoffwechsel (Glykolyse, Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, Pentosephosphat-Weg, Tricarbonsäure-Zyklus, Glyoxylat-Zyklus und Atmung - 58 Transkripte), Transport (121 Transkripte), Proteinbiosynthese (79 Transkripte), Zellteilung (16 Transkripte), Stressantwort (33 Transkripte), Flagellen- und Chemotaxis System (17 Transkripte), Regulation (48 Gene) sowie weiteren Proteinen (44 Gene) zugeordnet werden.

Die koordinierte Zell-Antwort auf eine Limitierung bedarf einer komplexen Regulation. Da die Synthese regulatorischer Proteine über eine mRNA-Neusynthese oft zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde, um der Zelle eine ausreichend schnelle Antwort zu ermöglichen, werden Regulatoren zum Teil auf posttranslationaler Ebene modifiziert und können demnach über eine Transkript-Analyse nicht als „signifikant verändert“ identifiziert werden.

Um aber Aussagen über solch aktive Regulatoren unter Kohlenhydrat-Limitierung zu machen, wurde deren regulatorische Aktivität in der vorliegenden Arbeit indirekt bestimmt. Die im Vergleich zur Referenz in mindestens einem Zeitpunkt als „differentiell exprimiert identifizierten“ Gene wurden bezüglich ihrer Operone und der sie regulierenden Aktivatoren, Repressoren sowie deren Sigma-Faktoren untersucht. Waren Gene eines Operons zu 50% oder mehr signifikant differentiell exprimiert, wurden sie in die Analyse mit einbezogen. 353 Gene waren hiervon betroffen.

Mit Hilfe der Regulator-Analyse konnte die potentielle regulatorische Aktivität verschiedener Sigma-Faktoren nachgewiesen werden. Eine Transkriptionsregulation konnte über die Sigma-Faktoren  $\sigma^{70}$  (*rpoD*),  $\sigma^{32}$  (*rpoH*),  $\sigma^{19}$  (*fecI*),  $\sigma^{24}$  (*rpoE*),  $\sigma^{54}$  (*rpoN*) sowie  $\sigma^{38}$  (*rpoS*) erfolgen. Neben den Sigma-Faktoren konnten für die 353 Gene weiterhin 28 Regulatoren als „aktiv“ identifiziert werden.

Folgendes Bild über die Anpassung von *E. coli* auf eine Glukose-Limitierung kann aus den Ergebnissen der Microarray-Analyse sowie der indirekten Regulator-Analyse abgeleitet

werden: Unter Glukose-Limitierung induzierten die Zellen innerhalb der ersten Stunden eine cAMP/CRP- sowie Cra-vermittelte Hungerantwort. Diese war durch die Bildung hochaffiner Glukose-Transportsysteme sowie anderer Transportsysteme für weitere Kohlenstoffquellen charakterisiert. Ferner wurden Gene zur Umsetzung von Acetyl-CoA - synthetisiert aus Acetat und über den Abbau von Fettsäuren - verstärkt transkribiert. Glykolytische Enzyme hingegen wurden größtenteils vermindert transkribiert. Die Zelle paßte ihren Stoffwechsel also den verminderten Glukose-Konzentrationen im umgebenden Medium an.

In der Hungerphase wurde interessanterweise trotz einer ausreichenden Ammoniumkonzentration im Medium ein physiologischer Zustand beobachtet, der einer Stickstoff-Limitierung ähnelt. Die drei, unter Stickstoff-Limitierung aktiven Systeme in *E. coli* (NtrC, Nac sowie  $\sigma^N$  vermittelte Reaktionen) wurden aktiviert. Die hier beobachtete Stickstoff-Stressantwort bewirkte die Transkription von Genen verschiedener Aminosäure-Transporter, bzw. versetzte die Zelle in die Lage, Transportproteine für Aminosäuren zu induzieren. Möglicherweise stellt diese Reaktion neben der cAMP/CRP-vermittelten Antwort eine weitere Möglichkeit für *E. coli* dar, Kohlenstoffquellen zu erschließen, da die Kohlenstoffgerüste zahlreicher Aminosäuren zur Energiegewinnung oxidiert werden können. Die ersten Stunden unter Glukose-Limitierung zeichneten sich also durch ein verstärktes Bestreben der Zelle aus, Kohlenhydrate zu akquirieren und eventuell weiterhin vorhandene Kohlenstoffquellen zu verwerten.

Unter Glukose-Limitierung konnte ferner über den gesamten betrachteten Zeitraum eine regulierte Transkription nachgewiesen werden, welche der Stringenten Kontrolle zuzuordnen ist. So wurden Gene des Ribosoms und demzufolge der stabilen RNAs vermindert transkribiert. Auch wurde die mRNA der Gene von einigen Enzymen der Replikation, der Biosynthese von Fettsäuren sowie Zellwandkomponenten vermindert gebildet. Auf der anderen Seite konnten Aspekte, die ebenfalls einer ppGpp-abhängigen Transkription zugesprochen werden, nicht beobachtet werden: Die erwartete verstärkte Transkription der Biosynthese-Gene von Aminosäuren konnte nur zum Teil beobachtet werden. Vielmehr wurde vorwiegend eine herabgesetzte Synthese der mRNA für Enzyme der Aminosäurebiosynthese nachgewiesen. Weiterhin war die Stringente Kontrolle nicht an eine Regulation der Physiologie durch  $\sigma^S$  (*rpoS*) gekoppelt. Wie die vorliegenden Ergebnisse vermuten lassen, spielte die  $\sigma^S$ -vermittelte Stressantwort lediglich eine untergeordnete Rolle.

Wie oben dargestellt, konnte etabliertes Fachwissen mit den hier beschriebenen Ergebnissen bestätigt werden. Ferner konnten über die Untersuchung mehrerer Zeitpunkte unter Limitierung interessante neue Effekte der Glukose-Limitierung aufgedeckt werden: Zu einem späteren Zeitpunkt unter Kohlenstoff-Limitierung synthetisierten die Zellen trotz ausreichender Sauerstoff-Konzentration im Bioreaktor mRNA, die für anaerobe Enzyme

kodiert. Dies spricht für eine Zell-Antwort, die normalerweise unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden kann. Vermittelt wurde diese Zell-Antwort möglicherweise durch das Fermentations/Atmungs-Umschaltprotein (FrsA). Dieses reagiert auf einen, wie in diesem Fall vorliegenden, veränderten Glukose-Transport und ermöglicht der Zelle ein Umschalten zwischen Fermentation und Atmung. Die Beobachtung der Anaerobiosis unter Glukose-Limitierung in *E. coli* wurde bereits beschrieben, und mit FrsA in Verbindung gebracht. Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf ein Umschalten des Proteins nicht nur zwischen aerober Atmung und gemischter Säurefermentation, sondern auch zwischen aerober Atmung und anaerober Atmung schließen. Weiterhin scheint das Protein transkriptional reguliert zu sein. Die Microarray-Analyse ergab weiterhin Hinweise auf die Regulation verschiedener Proteine unter Kohlenhydrat-Limitierung, die bisher als nicht reguliert galten bzw. entgegen der erwarteten Regulation reguliert wurden: (A) Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gapA*) wurde früh unter Limitierung herunterreguliert, sollte aber durch cAMP/CRP aktiviert werden. Hier kann eine Regulation durch Cra angenommen werden. Diese führt zu der hier beobachteten Herunterregulation. (B) Die Pyruvat Dehydrogenase Komponente LpdA wurde nicht differentiell exprimiert, obwohl eine verminderte Transkription, bedingt durch die Repression durch cAMP/CRP, zu erwarten gewesen wäre. Hier muss von einem weiteren Regulationsmechanismus ausgegangen werden. (C) Die Ribose-5-Phosphat Isomerase (*rpiA*) wurde signifikant hochreguliert, gilt aber als konstitutiv exprimiert. Die erhöhte Expression unter den gegebenen Bedingungen lässt auf eine Regulation des Enzyms unter Glukose-Limitierung schließen.

Zusammengefasst konnten über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkript-Analysen zahlreiche Ergebnisse wissenschaftlicher Arbeiten bestätigt und darüber hinaus Anhaltspunkte bezüglich neuer Regulationen aufgezeigt werden. Ferner konnten über die Betrachtung des gesamten Systems im Zeitverlauf bisher nicht dargestellte Zusammenhänge der durch einen Glukose-Mangel induzierten Stressantwort aufgedeckt werden.

Im Rahmen eines systembiologischen Ansatzes sollen die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten in ein mathematisches Modell integriert werden, um das physiologische Verhalten von *E. coli* unter Glukose-Limitierung zu simulieren und darüber neues biologisches Wissen zu generieren.

## Summary

*Escherichia coli*, one of the best characterized microorganisms, shows several physiological adaptations due to glucose limitation already at glucose concentrations in the millimolar range (concentrations below 0.05g/L). The adaptations are characterized through a reduced growth rate concomitant with a reduced synthesis of stable RNAs (tRNA and rRNA). This adaptation is called stringent response and is mediated through a small molecule, ppGpp. This nucleotide derivative interacts with the enzyme RNA polymerase affecting the affinity to different promoters and subsequently transcription. Raised ppGpp concentrations lead to a reduced synthesis of ribosomal proteins and biosynthesis enzymes of fatty acids, lipids, as well as DNA replication. Positive effects are described for amino acid promoters and the  $\sigma^S$  mediated stress response.

Furthermore, affected by glucose limitation, the organism tries to take up the remaining glucose by inducing high affinity glucose transport systems as well as to acquire alternative carbon sources - a response called hunger. The hunger response appears at the transition from exponential growth to stationary phase and is mediated through the cAMP/CRP modulon. This system allows the cell to express several transport systems. Furthermore, regulation by the Cra (FruR) regulon fits the glucose flow with limited glucose concentrations in the environment.

The strongest form of hunger appears at glucose concentrations within the submicromolar concentration range. This response is called starvation and gives the cell resistance to several stressors like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxygen radicals, drought, acidic or basic pH, osmotic stress, ethanol as well as heat and cold. The starvation is mainly mediated by the alternative sigma factor  $\sigma^S$ . This factor associates with the RNA polymerase and therefore leads to the expression of different proteins conferring the cell an elevated stress tolerance.

Many aspects dependent on glucose limitation were studied in detail in the past. Next to classical molecular biological methods, holistic methods like transcriptome and proteome analysis were used to study several aspects. Due to methodical problems, it was impossible to assign the above mentioned stress responses in *E. coli* affected by glucose limitation in a time scale and to differentiate them. In discontinuous batch fermentations the different stages of a glucose limitation induced stress response are run through quickly. In particular, due to the fast dropping growth rate in such fermentations, the hunger response is temporally restricted and therefore difficult to access for experimental evaluation. For this reason, continuous fermentations were performed. They allowed the adjustment of micromolar glucose concentrations and dilution rates and therefore were thought to generate an exactly defined state stable over a long period of time. Nevertheless, subsequent experiments revealed that cultures in continuous fermentations show changes on transcriptome and

proteome level. Furthermore, long time starvation during a continuous cultivation leads to mutations and changes on genome level.

The aim of this Ph.D. thesis was a more precise characterization of *E. coli*'s stress response induced by glucose limitation. A transcription profiling with custom made whole genome DNA microarrays was carried out. Culture samples were collected from fermentations which were carried out at the Institute of Biochemical Engineering (University of Stuttgart) within the scope of cooperation.

The glucose limitation in *E. coli* should be induced by a coupled batch/fed batch fermentation strategy with constant feed in the fed batch phase. This fermentation strategy was chosen because it led to a slow dropping growth rate and enables a sample collection over a longer period of time. Further, it gave the possibility to control several parameters like glucose concentration, pH value as well as CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. Last mentioned, higher reproducibilities for microarray experiments have been described for cultivation in bioreactors rather than cultivation in shaking flasks.

Over a period of seven hours of glucose limitation eight samples were taken for transcription profiling by DNA microarrays. As reference a sample of the unlimited growth phase was taken. Total RNA was isolated and reverse transcribed into cDNA. During this process fluorescent labelled dCTPs were incorporated into the cDNA. The comparison between the limited and the unlimited samples was of interest for all eight points of time. For this reason the labelled cDNA samples were hybridized on the microarrays by a common reference design. The reference sample was always hybridized with the interesting sample on the same array. So, the difference between reference and each sample could be indicated directly. Three fermentations were analyzed. A statistical analysis of the generated data showed significant differences between the glucose limited samples and the unlimited reference sample. 22% of the *E. coli* genome was affected.

The transcription profile of 962 genes changed for at least one point of time compared to the reference. 367 of these transcripts coded for hypothetical proteins or for proteins of unknown function. The other 595 transcripts could be assigned to the physiological functions anabolism (128 transcripts), catabolism (51 transcripts), central carbon metabolism (glycolysis, Entner-Doudoroff pathway, pentose phosphate pathway, tricarboxylic acid pathway, glyoxylate shunt and respiration (58 transcripts), transport (121 transcripts), protein biosynthesis (79 transcripts), cell division (16 transcripts), stress response (33 transcripts), flagellar and chemotaxis system (17 transcripts), regulation (48 transcripts) as well as other proteins (44 transcripts).

A coordinated cell reaction towards glucose limitation needs a complex regulation. An adequate cell response mediated by the *de novo* synthesis of mRNA for regulatory proteins

often takes too much time to allow the cell to react in that fast way which is needed for a stress response. Therefore, regulators are often subject to posttranslational modifications which can not be detected by transcription analysis. For this reason an indirect analysis of regulators was performed for the significant differentially transcribed genes in this thesis. Activators, repressors and sigma factors for genes belonging to operons, from whom more than 50% of the genes belonging to the examined operon were differentially transcribed were analyzed. This was the case for 353 genes. By using this regulator analysis the potential activity of the sigma factors  $\sigma^{70}$  (*rpoD*),  $\sigma^{32}$  (*rpoH*),  $\sigma^{19}$  (*fecI*),  $\sigma^{24}$  (*rpoE*),  $\sigma^{54}$  (*rpoN*), as well as  $\sigma^{38}$  (*rpoS*) could be shown. In addition 28 regulators were identified as active for these 353 significant differentially transcribed genes.

The following picture can be derived from the results obtained by transcription profiling and indirect regulator analysis: Glucose limited cells induced a cAMP/CRP as well as a Cra mediated hunger response. This response was characterized by the synthesis of high affinity glucose uptake systems and other transport systems for several carbon sources. Genes for the metabolism of acetyl-CoA, synthesized from acetate (excreted during non-limited growth phase due to overflow metabolism) or the degradation of fatty acids were regulated up. Glycolytic enzymes were regulated down. The cell adjusted its metabolism according to the decreased glucose concentration in the surrounding medium.

Within the hunger phase an interesting physiological state was observed. Although there was enough ammonium in the medium the cell behaved as being limited for nitrogen. Three systems active during nitrogen limitation were activated. These systems are coordinated by the regulatory proteins NtrC, Nac as well as  $\sigma^N$ . The observed nitrogen stress response led to the transcription of genes for several amino acid transport systems meaning it enabled the cell to induce transport proteins for amino acids. Perhaps, this reaction is another possibility for *E. coli* to acquire carbon sources during limitation besides the cAMP/CRP mediated hunger response. The carbon scaffolding of many amino acids can be oxidized for energy generation.

According to that, glucose limited *E. coli* was endeavouring to acquire and utilize available carbon sources within the first hours.

During glucose limitation, a stringent controlled transcription could be proven for the whole period of time. Genes encoding ribosomal proteins and accordingly stable RNAs were regulated down. Furthermore, mRNA encoding replication enzymes and biosynthesis enzymes of fatty acids and cell wall components were regulated down. On the other hand, some aspects which are awarded to the stringent response could not be observed:

The expected increased transcription of amino acid biosynthesis genes could be observed only in parts. Moreover, a decreased mRNA synthesis of amino acid biosynthesis enzymes

could be shown. Furthermore, the stringent response was not coupled to a regulation by  $\sigma^S$  (*rpoS*). As the results in hand suggest, the  $\sigma^S$  mediated stress response is only of minor relevance during the glucose limitation induced within the scope of this work.

As mentioned above, many results of former studies could be confirmed within observations from this thesis. Beyond this, the study of several points of time during limitation could reveal interesting new aspects of glucose limitation:

Although there was enough oxygen available during the fermentation process, an anaerobic state was registered by the cell after four hours of limitation. This was answered on transcriptome level by the transcription of anaerobic enzymes. As the results indicate, this reaction was mediated by the fermentation respiration switch protein (FrsA) which reacts to the decreased glucose transport. FrsA enables the cell to switch between fermentation and respiration. The observation of anaerobiosis during carbohydrate limitation was described earlier and was associated with FrsA. The obtained results suggest that FrsA is not only responsible for switching between aerobic respiration and mixed acid fermentation, but also between aerobic respiration and anaerobic respiration. Furthermore, a transcriptional regulation of FrsA can be assumed.

Additionally, the microarray analysis gave hints on the regulation of proteins due to glucose limitation which were expected to be regulated in another way: (A) Glycerine-3-phosphate dehydrogenase (*gapA*) was regulated down early during limitation although it was expected to be activated through cAMP/CRP. A regulation by Cra can be assumed. This leads to the observed down regulation. (B) One component of the pyruvate dehydrogenase complex (encoded by *lpdA*) was not differentially expressed although an decreased transcription due to the repression by cAMP/CRP was expected. The results indicate another regulatory mechanism for this enzyme. (C) Ribose-5-phosphate isomerase (*rpiA*) was regulated up significantly. This enzyme is supposed to be constitutively expressed. The enhanced expression during limitation leads to the conclusion of regulation for this enzyme during glucose limitation.

To summarize, the microarray analysis performed in the scope of this thesis could confirm many results of former scientific experiments, and additionally, gave indications for so far not described regulations. The use of time course experiments and the view on the whole system allowed to uncover non described connections induced during glucose limitation.

The results of this study will be used for a mathematic model within the framework of a systems biology project to generate biological knowledge about the carbohydrate limitation in *E. coli*.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VIII</b>
<b>Summary</b>	<b>XIII</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>XXI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die gesamtgenomische Expressionsanalyse - ein systembiologischer Ansatz</b>	<b>1</b>
<b>1.2 <i>E. coli</i> - einer der meist untersuchten Mikroorganismen</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Kohlenhydrat-Limitierung in <i>Escherichia coli</i></b>	<b>6</b>
1.3.1 Regulation der Genexpression	7
1.3.2 Der Hungerzustand in <i>E. coli</i>	8
1.3.3 Das cAMP/CRP-Modulon	9
1.3.4 Das Cra-Regulon	12
1.3.5 Die Stringente Kontrolle	13
1.3.5.1 Effekte und Mechanismen des ppGpp	16
1.3.6 Die generelle Stressantwort	20
<b>1.4 Die Microarray-Technologie</b>	<b>22</b>
1.4.1 Grundlagen der Microarray-Technologie	22
1.4.2 Design des Experiments	24
<b>1.5 Datenprozessierung und statistische Auswertung von Microarray-Experimenten</b>	<b>26</b>
<b>1.6 Die Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>30</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>31</b>
2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	31
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3 Software	34
2.1.4 Verwendete Gleichungen	34
2.1.5 Mikroorganismen	35
2.1.6 Medien, Lösungen und Puffer	35

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
2.2.1	Herstellung gesamtgenomischer <i>E. coli</i> K12 Microarrays	36
2.2.2	Fermentation	37
2.2.3	Zellernte	41
2.2.4	RNA-Isolierung und Qualitätskontrolle	41
2.2.5	RNA-Fällung	43
2.2.6	Reverse Transkription	44
2.2.7	Hybridisierung	45
2.2.8	Scannen der Arrays	46
2.2.9	Datenextraktion und Bildanalyse	47
2.2.10	Statistische Auswertung	47
2.2.11	Regulator-Analyse	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Herstellung gesamtgenomischer <i>E. coli</i> K12 Microarrays	50
3.2	Experimentelles Design	52
3.2.1	Probengenerierung für die Microarray-Analyse	52
3.2.1.1	Fermentationen	52
3.2.1.2	RNA Isolierung	54
3.2.1.3	cDNA Synthese	55
3.2.2	Hybridisierung der Proben auf dem Microarray - Experimentelles Design	55
3.3	Bestimmung differentiell exprimierter Gene	61
3.3.1	Transporter	68
3.3.1.1	Uni-, Sym- und Antiporter	69
3.3.1.2	ABC-Transporter	70
3.3.1.3	PEP-PTS Transporter	72
3.3.1.4	Beta-Fass Porine der äußeren Membran	73
3.3.1.5	Sonstige Transporter	73
3.3.2	Zentraler Kohlenstoffwechsel (Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, Tricarbonsäure-Zyklus, Glyoxylat-Zyklus und Atmung)	74
3.3.2.1	Glykolyse (Fruktose-bisphosphat-Weg/Embden-Meyerhof-Parnas-Weg)	74
3.3.2.2	Pentosephosphat-Weg und Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg	76
3.3.2.3	Tricarbonsäure-Zyklus und Glyoxylat-Zyklus	77
3.3.2.4	Atmungskette und ATP-Synthase	78
3.3.3	Anabolismus	80
3.3.3.1	Aminosäure- und Polyamin-Biosynthese	80
3.3.3.2	Fettsäuren	81
3.3.3.3	Zellwand und Membran	82

3.3.3.4	Nukleotid-Biosynthese _____	83
3.3.3.5	Purine und Pyrimidine ( <i>de novo</i> ) _____	84
3.3.3.6	Purine und Pyrimidine ("Salvage Pathway") _____	85
3.3.3.7	Glykogen- und Trehalose-Biosynthese _____	85
3.3.3.8	Coenzyme, Prosthetische Gruppen und Elektronenüberträger _____	86
3.3.4	Katabolismus _____	87
3.3.4.1	Kohlenhydrat-Abbau _____	87
3.3.4.2	Protein-, Peptid- und Aminosäureabbau _____	88
3.3.4.3	Fettsäureabbau _____	89
3.3.4.4	Nukleinsäure- und Nukleotid-abbauende Enzyme _____	90
3.3.5	Proteinbiosynthese _____	91
3.3.5.1	Ribosom _____	91
3.3.5.2	Ribosomen-Aufbau _____	93
3.3.5.3	Translation und Proteinreifung _____	93
3.3.5.4	RNA-Polymerase _____	94
3.3.5.5	RNA-Modifikation _____	95
3.3.5.6	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen _____	96
3.3.6	Stressantwort _____	96
3.3.7	Zellteilung _____	98
3.3.8	Flagellen- und Chemotaxis System _____	98
3.3.9	Regulatoren _____	100
<b>3.4</b>	<b>Regulator-Analyse _____</b>	<b>102</b>
3.4.1	Über die Microarray-Analyse sowie die Regulator-Analyse identifizierte Regulatoren _____	107
<b>4</b>	<b>Diskussion _____</b>	<b>112</b>
<b>4.1</b>	<b>Gesamtgenomische Microarrays und experimentelles Design _____</b>	<b>112</b>
<b>4.2</b>	<b>Differentiell exprimierte Gene und Regulatoranalyse _____</b>	<b>114</b>
4.2.1	Überblick der physiologischen Antwort unter Kohlenhydrat-Limitierung _____	114
4.2.2	Der Glukose-Transport _____	118
4.2.3	Zentraler Kohlenstoffwechsel _____	124
4.2.3.1	Glykolyse _____	129
4.2.3.2	Tricarbonsäure-Zyklus und Glyoxylat-Zyklus _____	132
4.2.3.3	Pentosephosphat-Weg _____	133
4.2.3.4	Atmung _____	134
4.2.4	Die Stringente Kontrolle _____	140
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis _____</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>Glossar _____</b>	<b>163</b>

<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>170</b>
7.1	Signifikant differentiell exprimierte Gene (geordnet nach T1 - T8)	170
7.2	Standardabweichung (doppelt)	218
7.3	„Sonstige Proteine“ sowie Hypothetische Proteine	236
7.4	Beschreibung der Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse	238
7.5	Aktivitätsprofile der Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse	242
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>245</b>

## Abkürzungen

-	Minus
%	Prozent
+	Plus
<	kleiner als
>	größer als
$\Delta$	Deletion
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
a	Penalty-Wert
A	Adenin
A	logarithmische Gesamtintensität eines Spots
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bit	binary digit
bp	Basenpaar
BR	biologisches Replikat
C	Cytosin
c	Konstante
$c_{\text{Ac}}(t)$	Acetat-Konzentration
$c_{\text{Glc}}(t)$	Glukose-Konzentration
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
$c_{\text{S}}^0$	Glukosekonzentration bei Start des Batch
$c_{\text{S}}^{\text{Ende}}$	Glukosekonzentration im Fermenter am Ende des Fed-Batch
$c_{\text{S}}^{\text{Start}}$	Glukosekonzentration im Fermenter beim Start des Fed-Batch
$c_{\text{S}}^{\text{Zulauf}}$	Glukosekonzentration im Zulauf
$c_{\text{X}}^0$	Biomassekonzentration bei Start des Batch
$c_{\text{X}}^{\text{Ende}}$	Biomassekonzentration am Ende des Fed-Batch
$c_{\text{X}}^{\text{Start}}$	Biomassekonzentration beim Start des Fed-Batch
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHPC	4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
engl.	englisch, aus dem Englischen
et al.	et alii (lat. und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FAD	Flavinadenindinukleotid
fdr	False Discovery Rate
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
<i>G</i>	Hintergrundkorrigierte Intensität eines Spots für den grünen Kanal
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glukose
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBVT	Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart
incl.	inklusive, einschließlich
k	10 <sup>3</sup> (kilo)
K	Kohlenstoff

---

kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
$K_M$	Michaelis-Menten Konstante
L	Liter
LB	Luria Bertani
loess	Local Weighted Regression
$\mu$	$10^{-6}$ (mikro)
$\mu$	spezifische Wachstumsrate
$\mu\text{M}$	mikromolar
m	$10^{-3}$ (milli)
m	Meter
$M$	logarithmischer Expressionsverhältniswert
min	Minute
mM	millimolar
MM	Mineralmedium
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
$N$	Purin oder Pyrimidin
$N$	Gesamtzahl der untersuchten Gene
n	$10^{-9}$ (nano)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
$\text{NAD}^+$	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
$\text{NADP}^+$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
nm	Nanometer
$\text{O}_2$	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PP	Polypropylen
$\text{PPi}$	anorganisches Pyrophosphat
PPP	Pentose-Phosphat Weg
pppGpp	Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat
ppGpp	Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

PTS	Phosphoenolpyruvat-Zucker Phosphotransferase System
r	Pearsonscher Korrelationskoeffizient
R	Hintergrundkorrigierte Intensität eines Spots für den roten Kanal
R	Referenz
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s	Standardabweichung
S	Svedberg-Konstante
sec.	Sekunde
s <sup>2</sup>	Probenvarianz
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Nukleotidaustausch)
T	Thymidin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBE	Trisborat, EDTA
TCA	Tricarbonsäure Zyklus (Zitronensäurezyklus)
Tiff	Tagged Image File Format
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymaktivität
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
V.	Version
V <sub>Max</sub>	Maximalgeschwindigkeit
V <sub>R</sub> <sup>0</sup>	Reaktionsvolumen beim Start des Batch
V <sub>R</sub> <sup>Start</sup>	Reaktionsvolumen beim Start des Fed-Batch
vs.	versus (lateinisch für: gegen, gegenüber gestellt)
w/v	Gewicht pro Volumen (Weight per Volume)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel



$\Sigma$	Summe
$\sigma$	Sigma
$\sigma_x$	empirische Standardabweichung der Datenserie X
$\sigma_y$	empirische Standardabweichung der Datenserie Y



Gängige, in der vorliegenden Arbeit verwendete englische Fachbegriffe wurden nicht ins Deutsche übersetzt. Zur Begriffserklärung verfügt die vorliegende Arbeit weiterhin über ein Glossar (siehe auch Kapitel 6 "Glossar")



# 1 Einleitung

## 1.1 *Die gesamtgenomische Expressionsanalyse - ein systembiologischer Ansatz*

Die Biowissenschaften stellen eine naturwissenschaftliche Disziplin dar, die sich die Erfassung und Erklärung biologischer Systeme zur Aufgabe gemacht hat. In der Vergangenheit hat sich die Biologie vornehmlich damit befaßt, biologische Systeme in ihre Komponenten zu zerlegen. Dabei waren qualitative und beschreibende, auf die molekularen Details ausgerichtete Vorgehensweisen charakteristisch. Es handelt sich hierbei um reduktionistische Ansätze. Um das System als Ganzes verstehen zu können, müssten die Einzelbausteine über eine „bottom-up“ Rekonstruktion zusammengesetzt werden. Das Gesamtverhalten des Systems müsste über die Verschaltung von Informationen über das dynamische Verhalten sämtlicher Einzelbausteine erfolgen. Bei der großen Zahl an Einzelkomponenten ist solch eine Vorgehensweise jedoch nicht realistisch. Weiterhin können Systeme Eigenschaften aufweisen, die nicht Bestandteil der Einzelkomponenten sind (Reuss 2005).

Um ein Verständnis komplexer Systemeigenschaften wie Regulation, Kontrolle oder Steuerung zu erhalten, reicht ein reduktionistischer Ansatz somit nicht mehr aus. An seine Stelle muss eine ganzheitliche Sichtweise treten, der eine integrative Vorgehensweise zu Grunde liegt. Diese soll Systemstrukturen biologischer Systeme, deren Dynamik, Kontrolle und Konstruktionsprinzipien beschreiben. Die Systembiologie als neues interdisziplinäres Feld der Biologie hat sich diese ganzheitliche Sichtweise zum Ziel gesetzt. Sie hat die vornehmliche Aufgabe, biologische Systeme auf der System-Ebene zu charakterisieren (Kitano 2002). Ermöglicht wird diese Herangehensweise durch enorme Fortschritte, zum einen in der Biologie und zum anderen in der Systemtheorie. Hierbei wären folgende herausragenden Meilensteine zu erwähnen:

Biologische Forschung: Im Rahmen zweier parallel verlaufender Großprojekte, dem Projekt des amerikanischen Unternehmens Celera Genomics und eines öffentlichen, internationalen Humangenom Sequenzierungs-Konsortiums (unter Beteiligung von 20 Zentren aus sechs Ländern) gelang die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahre 2001 (Venter et al. 2001). Dieser Fortschritt stellt jedoch erst eine Zwischenstation zum Verständnis der Biologie dar. An die Analyse des Genoms schließt sich als nächster Schritt die Analyse der Ribonukleinsäuren, insbesondere der „Messenger RNA“ (mRNA), die Analyse der Proteine und deren biochemische Funktionen sowie die Analyse der Metabolite

## 1. Einleitung

---

an. Für diese Arbeitsgebiete hat sich der Begriff ‚Functional Genomics‘ international etabliert. Mehrere Bereiche werden unterschieden:

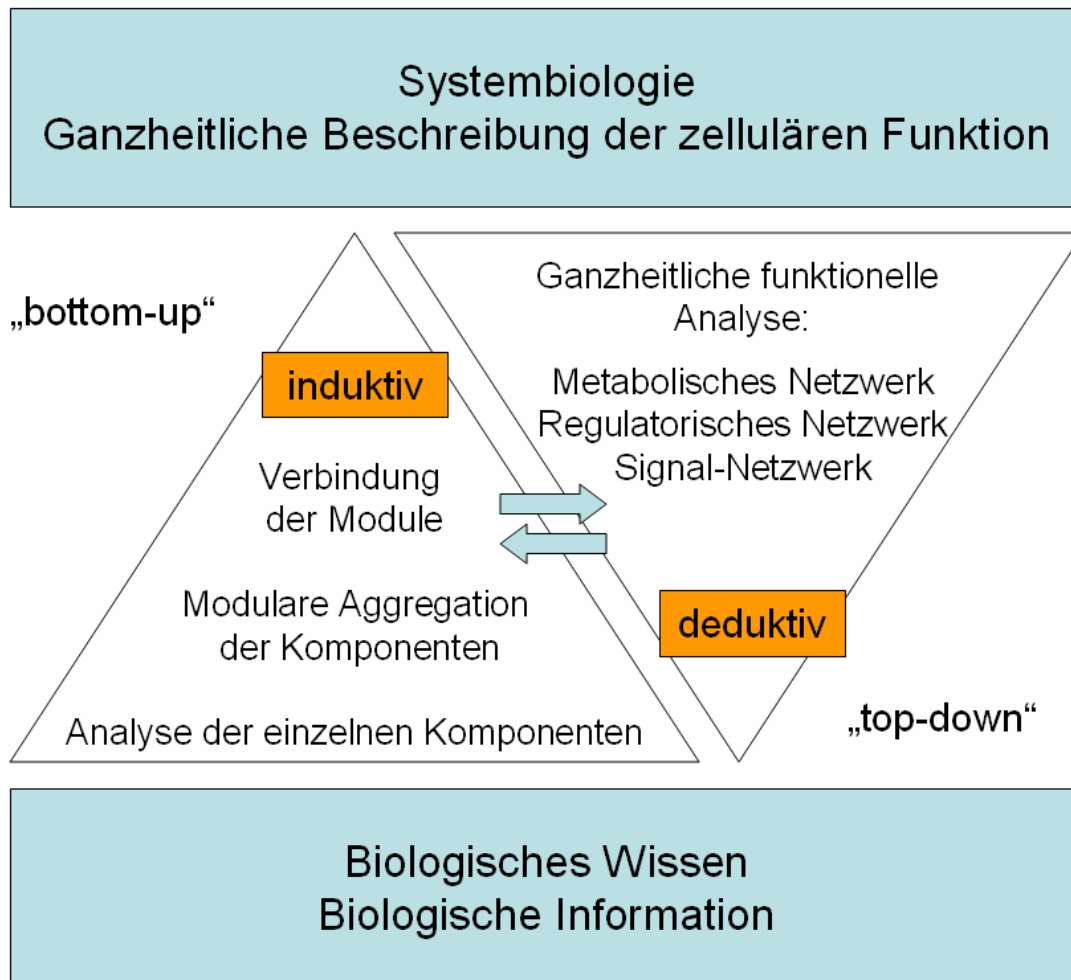
- „Genomics“ - die Analyse des Genoms
- „Transcriptomics“ - die Analyse der Gene, die unter gegebenen Bedingungen in einem biologischen System transkribiert werden
- „Proteomics“ - die Analyse der Proteine und deren Wechselwirkungen unter gegebenen experimentellen Bedingungen
- „Metabolomics“ - die Analyse der Stoffwechselintermediate (Metabolite) unter gegebenen experimentellen Bedingungen
- „Structural Genomics“ - die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der vom Genom kodierten Proteine

Verschiedene biologische Methoden kommen für die Analyse zum Einsatz. Diese stellen große Datenmengen über einzelne Komponenten bzw. Funktionen von Zellen (Gene, Proteine, Stoffwechselprozesse) zur Verfügung. Die Daten werden in riesigen Genkarten, Proteindatenbanken und komplexen Stoffwechselnetzwerken zusammengefasst.

Systemtheorie: Von der Kybernetik aufgegriffen, wurde die allgemeine Systemtheorie zur mathematischen Systemtheorie weiterentwickelt. Mathematisch fundierte Methoden liefern der heutigen Systembiologie vor allem in den Bereichen mathematische Modellierung und Simulation entscheidende Beiträge (Reuss 2005).

Das mathematische Modell wird aus dem Wissen um die Funktion und die Zusammenhänge des untersuchten biologischen Systems entwickelt. Aus ihm werden Hypothesen zu Systemeigenschaften sowie dem Systemverhalten abgeleitet, die daraufhin sowohl *in silico* als auch experimentell *in vitro/vivo* überprüft werden können. *In silico* wird mit Hilfe des mathematischen Modells eine Simulation durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Daten erlauben wiederum die experimentelle Analyse der Hypothese. *In vivo/vitro* liefern neue biologische Experimente aktuelle Daten, anhand derer wiederum die neu entwickelte Hypothese validiert werden kann. Durch diesen iterativen Prozess entsteht neues biologisches Wissen. Insbesondere das experimentelle Design nachfolgender Experimente kann auf die erhaltenen Ergebnisse abgestimmt werden und erlaubt somit die gezielte Auswahl tatsächlich notwendiger Experimente. Dies kann insbesondere bei sehr kostspieligen Experimenten, aber auch bei der Limitierung von biologischem Material eine entscheidende Rolle spielen.

Die Systembiologie kann demnach als ein Prozeß verstanden werden, der beobachtend Ergebnisse aus der Grundlagenforschung über einen „bottom-up“ Ansatz und beschreibend Ergebnisse aus der biologischen Forschung und Systemtheorie über einen „top-down“ Ansatz integriert. Nur ein Austausch zwischen den verschiedenen Disziplinen ermöglicht den Erkenntnisgewinn (siehe auch Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Systembiologie.** Die Systembiologie versucht induktiv biologisches Wissen in einer „bottom-up“ Rekonstruktion zur ganzheitlichen Beschreibung biologischer Systeme zu verbinden und weiterhin deduktiv über eine „top-down“ Vorgehensweise über ganzheitliche funktionelle Analysen wie metabolische, regulatorische und Signal-Netzwerke biologisches Wissen zu generieren. Nur der Austausch beider Vorgehensweisen ermöglicht den Erfolg. In der Systembiologie arbeiten die Wissenschaften Biologie, Mathematik, Informatik und Systemtheorie eng zusammen. Abbildung modifiziert nach Mauch (Mauch et al. 2005).

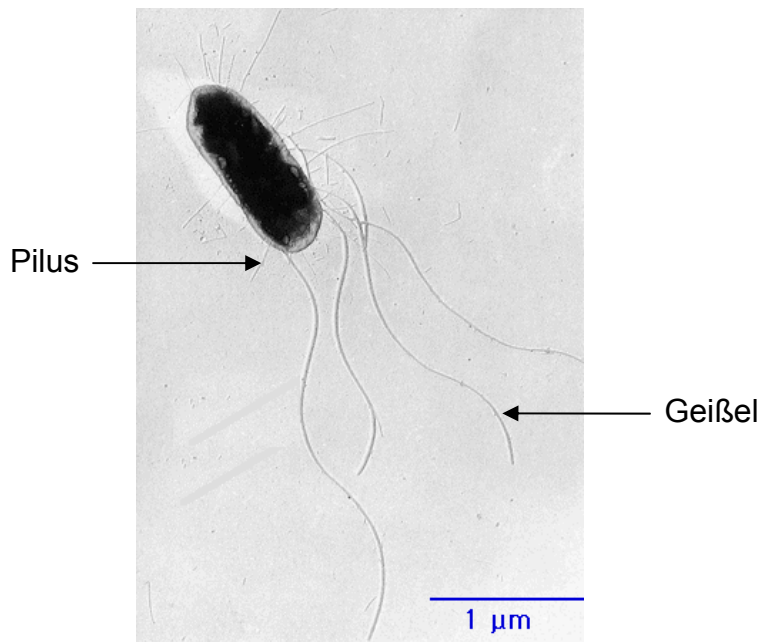
## 1.2 *E. coli* - einer der meist untersuchten Mikroorganismen

*Escherichia coli*, ein fakultativ anaerobes, Gram-negatives, peritrich begeißeltes Stäbchen, welches keine Sporen bildet, gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Es verfügt, wie die Familie der *Enterobacteriaceae* selbst, über Hämine (Cytochrome und Katalase) und vermag sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung (anaerob) Energie zu gewinnen. Das natürliche Habitat dieses Bakteriums ist der menschliche und tierische Darm, es kann aber auch außerhalb des Darmes eine kurze Zeit überleben. Hinsichtlich der Ernährung ist *E. coli* durchweg anspruchslos. Es wächst auf einfachen synthetischen

## 1. Einleitung

---

Nährlösungen, die Mineralsalze, Kohlenhydrate und Ammonium-Salze enthalten (Schlegel 1992).



**Abb. 1.2: *Escherichia coli*.** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums *Escherichia coli*. Zu sehen ist ein Bakterium mit Pili sowie Geißeln. Quelle: (Mandell et al. 2004)

Zuerst beschrieben im Jahre 1886 in der Arbeit „Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung“ (Escherich 1886) wurde *E. coli* zunächst als *Bakterium coli* bezeichnet (Migula 1895) um dann 1919 nach seinem Entdecker und Erstbeschreiber Theodor Escherich benannt zu werden (Castellani und Chalmers 1919). Aus *E. coli* gelang Jonathan Beckwith 1969 als erstem die Isolierung eines einzelnen Gens (Shapiro et al. 1969). Das relativ kleine Genom dieses Prokaryoten (*E. coli* K12: 4639675 Basenpaare, 4237 Offene Leserahmen) wurde als eines der ersten vollständig sequenziert (Blattner et al. 1997).

Die letzten Jahrzehnte erlaubten eine profunde Studie des Organismus *E. coli*. Mit der Etablierung gesamtgenomischer Analysetechniken wie der DNA-Microarray-Analyse sowie Proteom-Analyse-Techniken rückt ein Überblick über den gesamten Organismus in greifbare Nähe.

Die vorliegende Arbeit untersucht mit Hilfe der Microarray-Technologie die Reaktion von *E. coli* auf Kohlenhydrat-Limitierung im Medium (siehe auch 1.4, „Die Microarray-Technologie“). Viele Teilaspekte von *E. coli* sind bereits über die Microarray-Technologie bzw. über die Macroarray-Technologie analysiert worden. Einen Überblick gibt Tab. 1.1. Bei der Macroarray-Technologie wird cDNA auf Nylon- oder Nitrocellulosemembranen gedruckt und die Reverse Transkription mit radioaktiv markierten Nukleotiden durchgeführt.



**Tab. 1.1: Übersicht über mit Hilfe der Microarray- bzw. Macroarray-Analyse untersuchte Phänomene bei *Escherichia coli* K12.** Die Publikationen sind alphabetisch nach dem Autor geordnet. (WT: Wildtyp, MM: Mineralmedium, LB: Luria Bertani Medium,  $\Delta$ : Deletionsmutante, IPTG: Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid, Na: Natrium, DHPC: 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on, K: Kohlenstoff, N: Stickstoff)

Autor und Jahr der Publikation	Untersuchter Vergleich/Einfluss von
(Arfin et al. 2000)	$\Delta ihf$ - WT <i>ihf</i> (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators „Integration Host Factor“, IHF)
(Bernstein et al. 2002)	RNA-Halbwertszeiten in <i>E. coli</i>
(Chang et al. 2002)	Diauxie, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Stress, stationäre Phase
(Dittmar et al. 2005)	tRNA-Beladung
(Gill et al. 2001)	Rekombinante Expression, Hochzell- und Niedrigzelldichte, Subarray
(Hommais et al. 2001)	$\Delta hns$ - WT <i>hns</i> (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators H-NS)
(Hua et al. 2004)	Chemostatkultur, K- oder N-limitiert, hohe und niedrige Wachstumsrate
(Hung et al. 2002)	$\Delta lrp$ - WT <i>lrp</i> (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators Lrp)
(Kabir et al. 2004)	$\Delta rpoS$ - WT <i>rpoS</i> - Stickstoff - Limitierung ; <i>rpoS</i> kodiert für den Sigma-Faktor $\sigma^S$ (entspricht $\sigma^{38}$ )
(Kao et al. 2005)	Glukose-Acetat Übergang
(Khodursky et al. 2000)	Analyse des Tryptophan-Operons
(Liu und De Wulf 2004)	$\Delta arcA$ - WT <i>arcA</i> (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators ArcA)
(Oh und Liao 2000a)	Rekombinante Überexpression, Subarray
(Oh und Liao 2000b)	Glukose vs. Glycerol/Acetat - Subarray
(Oh et al. 2002)	Unterschied Glukose vs. Acetat als Substrat
(Phadtare et al. 2002)	Antibiotika-Wirkung (DHCP)
(Polen et al. 2003)	Einfluss von Na-Propionat bzw. Na-Acetat
(Richmond et al. 1999)	Hitzeschock, Behandlung mit IPTG
(Rozen et al. 2002)	Einfluss von Meerwasser
(Sabina et al. 2003)	Einfluss von vier Translationsinhibitoren
(Selinger et al. 2003)	RNA-Halbwertszeiten in <i>E. coli</i>
(Tani et al. 2002)	$\Delta lrp$ - WT <i>lrp</i> (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators Lrp)
(Tao et al. 1999)	MM Glukose - MM Glukonat - LB Glukose
(Tucker et al. 2002)	Einfluss von pH Änderungen

**Tab. 1.1: Übersicht über mit Hilfe der Microarray- bzw. Macroarray-Analyse untersuchte Phänomene bei *Escherichia coli* K12. Fortsetzung**

Autor und Jahr der Publikation	Untersuchter Vergleich/Einfluss von
(Wang et al. 2005)	$\Delta luxS$ - WT <i>luxS</i> (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators LuxS)
(Wei et al. 2001)	Einfluss von IPTG, stationäre Phase, MM - LB
(Zheng et al. 2001)	$\Delta oxyR$ - WT <i>oxyR</i> , (Untersucht wurde der Einfluss des Regulators OxyR), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Stress

### 1.3 Kohlenhydrat-Limitierung in *Escherichia coli*

Das Bakterium *Escherichia coli* ist in seinem Habitat verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt. Es ist nur eingeschränkt beweglich und deshalb auf vielfältige Mechanismen angewiesen, sein physiologisches Gleichgewicht zu erhalten. Hierfür stehen ihm zahlreiche Sensoren und Effektoren zur Verfügung, die es ihm ermöglichen, auf Veränderungen von pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffkonzentration, Nährstoffverfügbarkeit oder Osmolarität zu reagieren (Neidhardt et al. 1990).

Ein gut untersuchtes System stellt die Kohlenhydrat-Limitierung, speziell die Glukose-Limitierung in *E. coli* dar (Ferenci 1999b; Ferenci 2001; Saier, Jr. 1996a). Bei Glukosemangel stellt die Zelle ihren Stoffwechsel um. Durch die Bildung von Alarmonen (ppGpp, cAMP) werden Stress-Systeme induziert, die es der Zelle ermöglichen, optimal auf die veränderten Umweltbedingungen zu reagieren. Ein spezifischer Regulator, das Katabolit Repressor/Aktivator Protein Cra (früher auch als FruR, der Repressor des Fruktose-Regulons bekannt) reguliert die Richtung des Kohlenhydrat-Flusses und spielt bei Kohlenhydrat-Mangelzuständen eine entscheidene Rolle. Des Weiteren werden „alternative  $\sigma$ -Faktoren“ verwendet, welche die Umprogrammierung der RNA-Polymerase bewirken und ein verändertes Expressionsmuster mit erhöhter Anpassung an die Umweltbedingungen erlauben (Stryer 1996). Da die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung mehreren Stressoren gleichzeitig ausgesetzt sind, ist die Interaktion der verschiedenen Stressantworten unabdingbar.

Ein komplexes Netzwerk regulatorischer Systeme mit einer Vielzahl molekularer Komponenten ermöglicht eine koordinierte und effektive Zell-Antwort. Solche regulatorischen Komponenten sind DNA, mRNAs, siRNAs, Proteine (DNA- und RNA-Bindeproteine, „alternative Sigma-Faktoren“, Zwei-Komponenten Systeme) sowie die kleinen niedermolekulare Effektormoleküle wie z.B. (p)ppGpp und cAMP. Die genannten regulatorischen Komponenten bewirken die Expression anderer Proteine, die das zelluläre Gleichgewicht unter den verschiedenen Bedingungen stabilisieren. Nachfolgend wird zunächst ein Überblick über die Genregulationshierarchie in *E. coli* gegeben (1.3.1

Regulation der Genexpression), gefolgt von der Beschreibung der wichtigsten physiologischen Veränderungen, die durch Glukosemangel in *E. coli* hervorgerufen werden. Anschließend werden die einzelnen Aspekte detailliert besprochen (1.3.2, „Der Hungerzustand in *E. coli*“; 1.3.3, „Das cAMP/CRP-Modulon“, 1.3.4, „Das Cra-Regulon“, 1.3.5, „Die Stringente Kontrolle“, 1.3.6, „Die generelle Stressantwort“).

### 1.3.1 Regulation der Genexpression

Gene eines Stoffwechselweges werden in Prokaryoten gewöhnlich als eine einzige Transkriptionseinheit, das Operon, transkribiert. Dies erlaubt die koordinierte Bildung der benötigten Enzyme des Stoffwechselweges in adäquaten Mengen. Manche bakteriellen Prozesse benötigen die Aktivität zu vieler Interaktionspartner, als dass diese über eine einzige mRNA abgeschrieben werden könnten. Ein Beispiel hierfür ist die Translationsmaschinerie selbst, welche die ribosomalen Proteine, rRNA, tRNA, Polymerase sowie regulatorische Enzyme und Proteine umfasst. Des Weiteren bedürfen einige bakterielle Prozesse der Aktivität von Genprodukten, die sowohl unabhängig voneinander als auch koordiniert reguliert werden müssen. Dies macht multigene regulatorische Netzwerke nötig. *E. coli* besitzt mehrere hundert multigene Systeme. Diese umfassen unter anderem Netzwerke, die auf Nährstoff-Limitierungen antworten, Netzwerke, die Oxidations-Reduktions-Reaktionen sowie den Elektronen-Transport regulieren oder Netzwerke, die den Schaden durch Oxidation, Temperaturstress oder osmotischen Druck regulieren (Neidhardt et al. 1990). Generell wird die Expression aller Gene durch „DNA Supercoiling“ abhängige Mechanismen reguliert, die die Topologie des Chromosoms beeinflussen (Hatfield und Benham 2002). Der Begriff „Supercoiling“ bezeichnet einen Zustand doppelsträngiger DNA (dsDNA), in dem die Helixachse selbst (und nicht nur der DNA Strang) einen helikalen Verlauf nimmt. „Supercoiling“ ist eine Eigenschaft aller dsDNA Moleküle und eine Voraussetzung für deren biologische Aktivität. In der Regel ist dsDNA negativ verwunden, d.h. leicht „entwunden“. Solche dsDNA kann besser geschmolzen werden, und ist somit für Polymerasen zur Replikation und Transkription besser zugänglich. Vollständig relaxierte dsDNA ist nicht oder nur reduziert aktiv (Travers und Muskhelishvili 2005). Die Veränderung der DNA Topologie wird direkt durch physikalisch chemische Bedingungen oder indirekt durch bestimmte Proteine verursacht. Hierzu zählen die DNA-Topoisomerasen (Gyrase und Topoisomerase) (Drlica 1992) sowie Histon ähnliche DNA Bindeproteine (HU, IHF, Fis und H-NS). DNA-Topoisomerasen verändern den Verwindungsgrad der DNA. H-NS, ein DNA-Bindeprotein und ein genereller Repressor bei der Stressantwort (Atlung und Ingmer 1997), ist beispielsweise während der Kälteschockantwort essentiell für die effektive Adaptation (Dersch et al. 1994).

## 1. Einleitung

---

Die nächste Ebene der Regulation nach der DNA-Struktur bilden häufig vorhandene regulatorische Proteine mit eher degenerierter Bindestellenspezifität in Koordination mit operonspezifischen Regulatoren für die Regulation oft überlappender Gruppen metabolisch koordinierter Operone, den so genannten Regulons bzw. Stimulons als Antwort auf Umwelteinflüsse und metabolische Signale (z.B. cAMP/CRP). Die letzte Ebene bilden seltenere Regulatoren, die lediglich einzelne Operone oder gar Gene hochspezifisch regulieren. Weil viele regulatorische Netzwerke zunächst als zelluläre Antworten auf Umweltveränderungen entdeckt wurden, kann das Regulationsnetzwerk in *E. coli* auch als ein Stimulus-Antwort System veranschaulicht werden (Neidhardt et al. 1990):

Ein Stimulus aus der Umgebung wird durch einen Sensor wahrgenommen, der ein Signal generiert. Dieses Signal, übermittelt durch sogenannte „Transducer“ (Umwandler), bewirkt die Regulation über Aktivatoren oder Repressoren, welche die Zellantwort koordinieren. Das Stimulus-Antwort System beinhaltet oft noch eine Rückkopplung zur Korrektur der Zellantwort.

### 1.3.2 Der Hungerzustand in *E. coli*

Die Kohlenhydrat-Limitierung in *E. coli* äußert sich zunächst in der vermehrten Aktivität der Zelle, Nährstoffe zu beschaffen, hauptsächlich gesteuert durch das cAMP/CRP vermittelte System (siehe 1.3.3 Das cAMP/CRP-Modulon). Dieses wird schon bei Glukosekonzentrationen von  $\sim 0,3$  mM (0,05 g/L) angeschaltet (Ferenci 1999b). Im Zuge dessen wird ein hochspezifisches Glukoseaufnahme-system induziert. Das Membranporin LamB in der äußeren Bakterienmembran, das eine höhere Permeabilität als OmpC für Glukose aufweist, wird vermehrt exprimiert. OmpC ist das Porin, das unter normalen Wachstumsbedingungen mit Glukosekonzentrationen über 0,2 mM (0,04 g/L) den Transport des Zuckers in den periplasmatischen Raum erlaubt. Dort wird Glukose über das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase System (PTS) unter Phosphorylierung ins Periplasma transportiert (siehe 1.3.3 Das cAMP/CRP-Modulon). Der  $K_m$ -Wert dieses Transporters für Glukose liegt im Bereich von 3-10  $\mu$ M,  $V_{max}$  bei 126  $\mu$ mol/min\*g.

Bei Glukosemangel wird der Galaktose ABC-Transporter, kodiert durch die Gene *mgIABC* verstärkt exprimiert. Ferner wird ein Galaktose-H<sup>+</sup> Symporter (*galP*) (bei Glukosekonzentrationen unter 1  $\mu$ M durch endogene Induktorsynthese maximal induziert (Death und Ferenci 1994; Liu und Ferenci 1998)) verstärkt exprimiert. Diese Transporter weisen eine erhöhte Affinität für Glukose auf und transportieren den Zucker ohne Phosphorylierung in die Zelle. Dort wird der Zucker über das Enzym Glukokinase, die einzige Hexokinase in *E. coli* (Kawai et al. 2005), phosphoryliert (Lunin et al. 2004; Meyer et al. 1997) und der Glykolyse zugeführt. Expressionsanalysen von Batch-Kultivierungen mit

Microarrays zeigen eine erhöhte Expression vieler weiterer Transporter unter Glukose-Limitierung (Chang et al. 2002).

Bleiben die Versuche zur Nährstoffaufnahme durch die Bakterienzelle erfolglos, setzt die generelle Stressantwort in *E. coli* ein (Ferenci 1999b). Diese wird durch den „alternativen Sigma-Faktor“  $\sigma^S$  (siehe 1.3.6, „Die generelle Stressantwort“) vermittelt (Loewen und Hengge-Aronis 1994) und bereitet die Zellen auf ungünstige Bedingungen vor. Die Komponenten des oben beschriebenen hochaffinen Glukose-Aufnahmesystems werden wieder reprimiert (Ferenci 1999b).

Die physiologische Antwort von *E. coli* auf Glukose-Limitierung deutet also auf eine Trennung zwischen einer Hunger- und einer Hungertod-Antwort (im Folgenden als „Starvation“ bezeichnet) hin. Der Hungerzustand wird als der Zustand definiert, in dem die Zelle in einem oder mehreren Nährstoffen limitiert ist, das Wachstum aber noch nicht vollständig eingestellt ist ( $\mu_{\text{Max}} > \mu \neq 0$ ) (Ferenci 2001). Eine Differenzierung der Hunger- bzw. „Starvation-Phase“ ist bisher noch nicht befriedigend dargestellt worden, da die experimentelle Erfassung der beiden Phasen schwer durchführbar ist. Während einer Batch-Fermentation befindet sich die Kultur nur in einem sehr kleinen Zeitfenster in der Situation der Übergangsphase, die von Ferenci als Hungerphase bezeichnet wird (Ferenci 1999b). Diese ist charakterisiert durch einen rapiden Abfall der Wachstumsrate, und somit schwer zu untersuchen. Experimente zur Analyse der Hungerphase wurden daher über Chemostat-Fermentationen durchgeführt, die als Garant der Möglichkeit angesehen worden waren, einen spezifischen Wachstumszustand „einfrieren“ zu können. Die Gleichgewichts-Annahme in Chemostat-Kulturen ist jedoch fraglich, denn die Bakterien sind in der Lage, ihre Glukoseaufnahme-Systeme verringerten Glukosekonzentrationen anzupassen. Die Rest-Glukosekonzentration sinkt für hunderte von Generationen weiter durch solch eine verbesserte Glukoseaufnahme (Kovarova-Kovar und Egli 1998). Hungerpopulationen in Chemostat-Kulturen werden hoch heterogen und verändern sich durch Mutationen. Solche Populationen sind physiologisch unterschiedlich von der Ausgangspopulation (Notley-McRobb und Ferenci 1999).

### 1.3.3 Das cAMP/CRP-Modulon

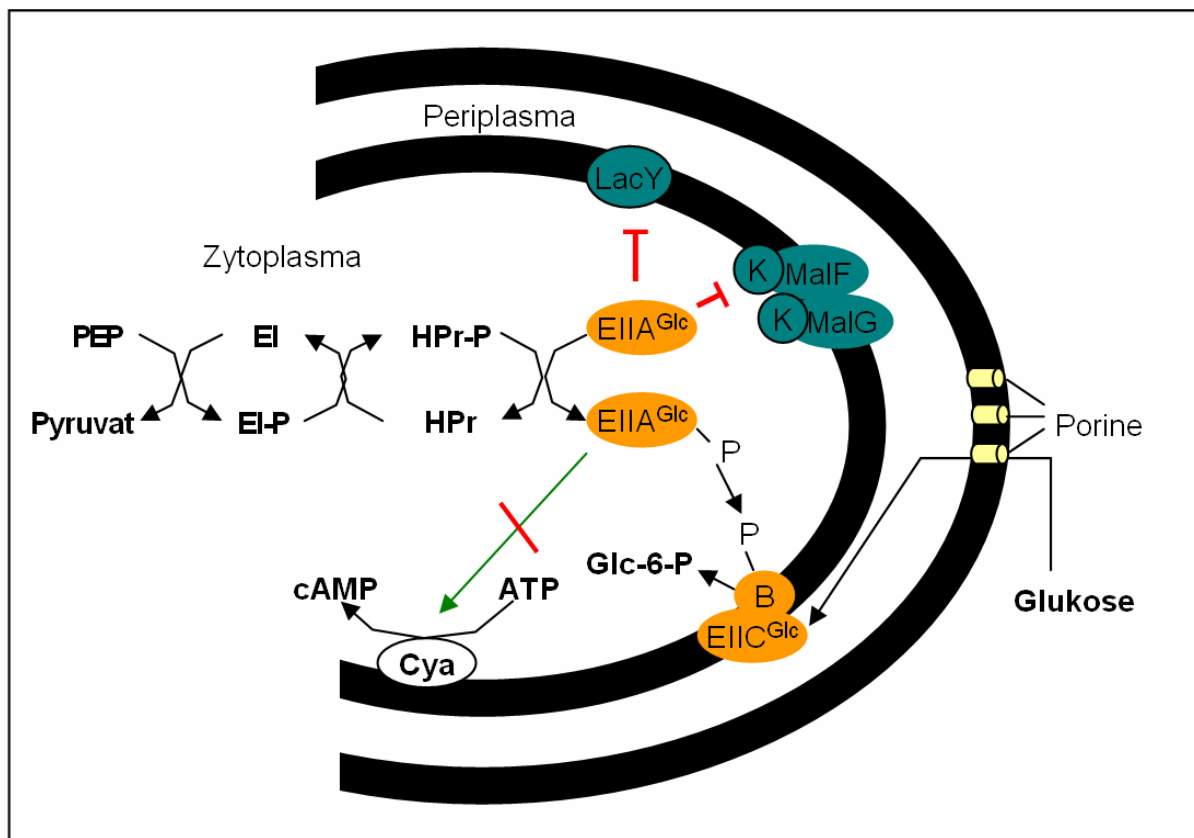
Die Verfügbarkeit schnell metabolisierbarer Kohlenhydrate wie Glukose, Mannose oder Fruktose, die in den Organismus aufgenommen und sofort verstoffwechselt werden können, verhindert in *E. coli* die Synthese von Enzymen, die andere Kohlenhydrate abbauen. Verschiedene Mechanismen gewährleisten diesen so genannten Glukose-Effekt in der Familie der *Enterobacteriaceae* (Saier, Jr. 1996b): Glukose verhindert den Eintritt induzierender Substrate für katabole Stoffwechsellzyme durch die Inaktivierung spezifischer Permeasen. So können Substrate wie Glukose, Mannose oder Fruktose die

## 1. Einleitung

---

Aufnahme der Substrate Galaktose, Maltose, Xylose oder Glycerin verhindern, indem sie die Aktivität der Transporter oder den ersten Stoffwechselschritt hemmen (Cohn und Horibata 1959; McGinnis und Paigen 1969). Man spricht auch von Induktorausschluss. Des Weiteren kommt es auch unter Anwesenheit eines speziellen Induktors zur vorübergehenden starken Hemmung (etwa eine halbe Generationszeit) der Synthese induzierbarer kataboler Enzyme nach Zugabe von Glukose. Zuletzt verursacht der Metabolismus von Glukose eine kontinuierliche aber weniger starke Hemmung der Synthese induzierter Enzyme auch unter Anwesenheit des spezifischen Induktors. Diese Hemmung wird auch als Katabolit-Repression bezeichnet. Die Katabolit-Repression ist hochkomplex und vielfach untersucht worden. Dennoch ist sie bis heute nicht vollständig aufgeklärt. 1965 identifizierten Markman und Sutherland zyklisches AMP (cAMP) in *E. coli* und zeigten, dass dessen zytoplasmatische Konzentration invers mit der Wachstumsrate variierte, wenn die Kohlenhydratquelle wechselte. Die nachfolgende Identifizierung des „cAMP Rezeptor Proteins“ CRP (Emmer et al. 1970; Zubay et al. 1970) und die Beschreibung des Phänotyps von Mutanten für das cAMP-Biosynthese Enzym Adenylatzyklase oder CRP ließen den allgemein anerkannten Schluss zu, dass die Katabolit-repression durch cAMP/CRP vermittelt wird (Pastan und Perlman 1970). cAMP/CRP reguliert ein Netzwerk überwiegend kataboler Operone, die alle eine charakteristische Nukleotidsequenz „upstream“ der Transkriptionsstartstelle des betreffenden Operons aufweisen (AANTGTGANNTNNNCA, N: beliebiges Nukleotid) (Berg und von Hippel 1988). An diese Sequenz kann das dimere CRP Protein, assoziiert mit einem oder zwei cAMP Molekülen binden und die Expression durch Biegen der DNA und Interaktion mit der RNA-Polymerase ermöglichen (Harman 2001). Während die Zellen auf Glukose wachsen, liegen nur geringe cAMP Konzentrationen vor. Des Weiteren weist das Protein CRP eine hohe Bindekonstante für cAMP auf. Daher können katabole Enzyme, die cAMP/CRP zur Transkriptionsaktivierung benötigen, bei Anwesenheit von Glukose nicht transkribiert werden. Erst wenn die Glukose verbraucht ist, kommt es zu einem rapiden Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle. Damit geht die Induktion anderer kataboler Enzyme einher, abhängig vom Vorhandensein weiterer Kohlenstoffquellen im Medium, die als Induktoren wirken. Die Ursache hierfür ist in der Aktivierung der membrangebundenen Adenylatzyklase zu finden. Dieses Enzym setzt ATP zu cAMP um, jedoch nur nach Interaktion mit einem weiteren Membranprotein, welches eine Komponente des Phosphoenolpyruvat-Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) ist. Das PTS ist ein Transportsystem für bestimmte Kohlenhydrate in *E. coli* und anderen strikten oder fakultativ anaeroben Organismen. Während des Transports durch die zytoplasmatische Membran werden die Kohlenhydrate phosphoryliert und dadurch impermeabel. Man spricht von Gruppentranslokalisierung, da hier Substrate über die Membran transportiert werden und im gleichen Zuge modifiziert und so impermeabel gemacht werden. Verschiedene Proteine

werden für den Transport eines PTS-Zuckers in die Zelle benötigt: Dies sind die zuckerspezifischen Komponenten EIIA und EIIB sowie eine zuckerspezifische integrale Membrankomponente EIIC (manchmal auch noch EIID). Für die Phosphorylgruppen-Translokation sind das lösliche und nicht-zuckerspezifische Enzym EI, kodiert durch das Gen *ptsH* und ein kleines hitzestabiles Protein Hpr, kodiert durch das Gen *ptsI* zuständig. Der Glukosetransport in *E. coli* wird durch die Enzyme EI und Hpr sowie den Glukosespezifischen EII<sup>Glc</sup>-Komplex bestehend aus EIIA<sup>Glc</sup> (*crr*, löslich) und EIICB<sup>Glc</sup> (*ptsG*, membrangebunden) vermittelt (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Einfluss des PTS auf die Adenylatzyklase sowie den Induktorausschluss.** Schematische Darstellung einer Zelle. Dargestellt ist das Phosphoenolpyruvat-Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) mit den Komponenten EI, HPr, EIIA<sup>Glc</sup>, EIIB<sup>Glc</sup> (B) sowie EIIC<sup>Glc</sup>. Zucker wird über die innere Membran durch Phosphorylierung in die Zelle aufgenommen, EIIA<sup>Glc</sup> kann die Adenylatzyklase (Cya) nicht aktivieren. Die Zuckerpermeasen LacY und MalFGK werden in der Aktivität gehemmt (Induktorausschluss).

Ist keine Glukose für die Aufnahme aus dem Medium mehr vorhanden, kann der Phosphatrest nicht mehr auf Glukose übertragen werden. EIIA<sup>Glc</sup> verbleibt im phosphorylierten Zustand und bindet so an den C-terminalen Bereich der Adenylatzyklase, welcher möglicherweise einen inhibitorischen Effekt auf den katalytischen N-terminalen

## 1. Einleitung

---

Bereich ausübt (Holland et al. 1988; Roy et al. 1983). Dieses Enzym kann nun aktiv cAMP synthetisieren. Die cAMP Konzentration in der Zelle steigt an, es kommt zur Wechselwirkung mit CRP und der Aktivierung kataboler Stoffwechsellzyme abhängig von vorhandenen Induktoren, sowie zur Repression weiterer Enzyme. Die Expression von CRP wird durch cAMP/CRP reguliert. Abhängig von spezifischen Bedingungen aktiviert bzw. reprimiert cAMP/CRP die CRP Expression. cAMP Konzentrationen für die positive Autoregulation sind höher als die für die negative Autoregulation *in vivo* wie *in vitro* (Hanamura und Aiba 1992; Saier, Jr. 1996b). Bei Anwesenheit von Glukose (niedrige cAMP Konzentrationen) werden die CRP Konzentrationen also erniedrigt, bei Abwesenheit (hohe cAMP Konzentrationen) erhöht. Da die Adenylatzyklase negativ durch cAMP/CRP reguliert ist, wird die Menge an cAMP in der Zelle reduziert, wenn die cAMP/CRP Spiegel ansteigen. cAMP-sensitive Operone werden also unter Anwesenheit von Glukose als Konsequenz der Reduktion der cAMP-Konzentration (ein schneller Prozess bedingt durch die posttranslationale Inhibition der Adenylatzyklase durch  $EII^{Glc}$ ) sowie der CRP-Konzentration (ein langsamer Prozess bedingt durch die Autoregulation der CRP-Gen-Transkription) reprimiert. In der unphosphorylierten Form besitzt  $EIIA^{Glc}$  die Eigenschaft, an bestimmte Zielproteine wie Permeasen (z.B. die Laktose-Permease LacY (Osumi und Saier, Jr. 1982a; Osumi und Saier, Jr. 1982b) oder Untereinheiten von Transportsystemen (z.B. die Maltose-ABC Transporter Untereinheit MalK (Dean et al. 1990)) zu binden und vermittelt so den oben beschriebenen Induktorausschluss (Abb. 1.3).

### 1.3.4 Das Cra-Regulon

Schlüsselenzyme der meisten zentralen Stoffwechselwege sind Regulationsziele einer „cAMP/CRP-unabhängigen“ Katabolitrepression in *E. coli* (Saier, Jr. 1996a). Diese wird durch den Regulator Cra vermittelt. Cra steht für „Catabolite activator/repressor“ Enzym und wurde ehemals als FruR, der Repressor des Fruktose-PTS, identifiziert. Mutationen, die zum Funktionsverlust von Cra führen, verhindern das Wachstum von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* auf Glukoneogenese-Substraten wie Acetat, Pyruvat oder Succinat. Schlüsselenzyme der Glukoneogenese werden cAMP-unabhängig nicht mehr gebildet, da die betroffenen Enzyme, genauso wie Enzyme für den Tricarbonsäure-Zyklus sowie den Glyoxylat-Zyklus durch Cra aktiviert werden müssen. Auf der anderen Seite reprimiert Cra Enzyme der Glykolyse, des Entner-Doudoroff-Weges sowie Initialenzyme des Zuckerkatabolismus (Geerse et al. 1989; Ramseier et al. 1993). Cra kontrolliert also die Richtung des Kohlenstoff-Flusses in der Zelle (Ramseier et al. 1995). Es ist monocistronisch fernab der kontrollierten Gene auf dem Genom kodiert und weist ein N-terminales Helix-Turn-Helix Motiv für die Interaktion mit der DNA sowie C-terminale Ligandenbindedomänen auf (homolog zu periplasmatischen Bindeproteinen für Arabinose, Ribose und Galaktose)

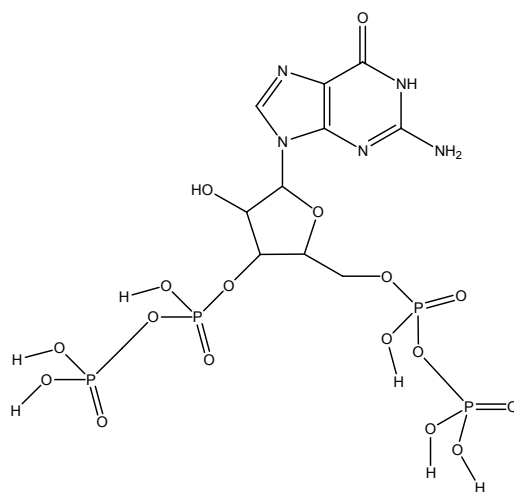


(Nguyen und Saier, Jr. 1995; Weickert und Adhya 1992). Dies lässt eine Zuckerbindung vermuten. Mikromolare Konzentrationen von Fruktose-1-Phosphat oder millimolare Konzentrationen von Fruktose-1,6-Bisphosphat führen zur Lösung des Proteins von der DNA. Durch Cra reprimierte Gene werden unter Abwesenheit exogener Zucker (Glukoneogenesebedingungen) stärker reprimiert als unter Anwesenheit exogener Zucker (Glykolysebedingungen). Durch Cra aktivierte Gene werden unter Abwesenheit exogener Zucker stärker aktiviert als unter Anwesenheit exogener Zucker. Diese Effekte treten bei Cra-Nullmutanten nicht auf (Saier, Jr. 1996a). Cra vermittelt also eine cAMP-unabhängige Katabolit-Aktivierung und Repression.

### 1.3.5 Die Stringente Kontrolle

Die Stringente Kontrolle ist eine komplexe Reaktion auf unterschiedliche Stressoren wie z.B. Aminosäuremangel, Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphatlimitierung, einen Anstieg der Osmolarität im Medium, oxidativen Stress sowie Ethanol (Neidhardt et al. 1990). Sie koordiniert den Anabolismus mit den zur Verfügung stehenden Ressourcen und wurde ursprünglich als Reaktion auf Aminosäuremangel und eine damit verbundene Hemmung der rRNA- und Ribosomen-Synthese entdeckt (Borek et al. 1956; Sands und Roberts 1952). Eine Mutante konnte isoliert werden, welche weiterhin stabile RNA (rRNA und tRNA) synthetisierte. Diese Mutante wurde als entspannt (relaxed) bezeichnet (Stent und Brenner 1961) und das Gen, welches für diese Erscheinung verantwortlich war, wurde als *relA* bezeichnet (Alfoldi et al. 1962).

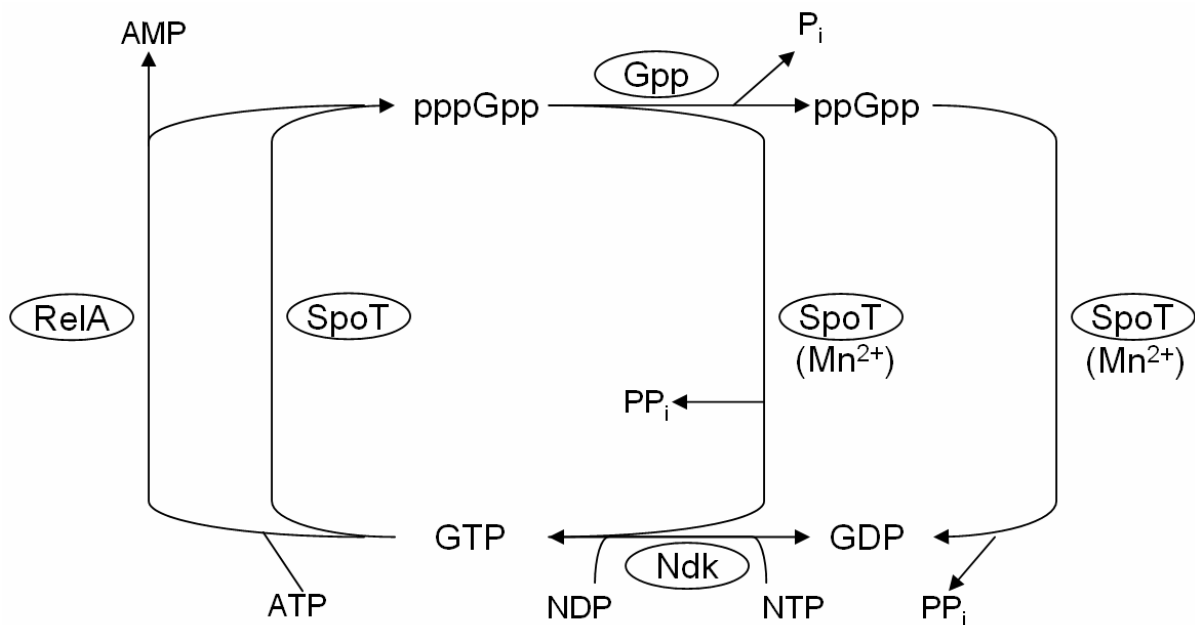
Die Hauptmediatoren der Stringenten Kontrolle sind die Alarmone pppGpp sowie ppGpp, welche mit dem Einsetzen der Stringenten Kontrolle in der Zelle angehäuft werden (Cashel 1969). Abb. 1.4 zeigt die Strukturformel des Alarmons ppGpp.



**Abb. 1.4: Strukturformel des Alarmons ppGpp.**

## 1. Einleitung

Zunächst wird pppGpp synthetisiert, welches jedoch direkt nach der Synthese in ppGpp umgewandelt wird (Cashel et al. 1996). Die zellulären Konzentrationen werden durch die Enzyme RelA (Alfoldi et al. 1962), SpoT (Laffler und Gallant 1974; Xiao et al. 1991), Gpp (Somerville und Ahmed 1979) und Ndk (Cashel et al. 1996) kontrolliert. Sowohl RelA (pppGpp Synthetase I) als auch SpoT (pppGpp Synthetase II) können pppGpp synthetisieren, indem ein Pyrophosphatrest von ATP auf GTP bzw. GDP übertragen wird. Gpp, eine pppGpp- $\gamma$ -Phosphohydrolase hydrolysiert pppGpp zu ppGpp (Somerville und Ahmed 1979) und Ndk, eine Nukleotiddiphosphat-Kinase stellt den GTP Pool wieder her, indem es GDP zu GTP phosphoryliert (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung des zellulären (p)ppGpp Metabolismus modifiziert nach Cashel (Cashel et al. 1996).** Beteiligte Enzyme sind umrandet: RelA, SpoT, Gpp und Ndk. pppGpp wird durch SpoT und RelA synthetisiert, durch Gpp zu ppGpp konvertiert und SpoT und  $Mn^{2+}$ -abhängig zu GDP degradiert. Die Nukleotiddiphosphat-Kinase Ndk setzt GDP zu GTP um und schließt den Kreis.  $PP_i$ : Pyrophosphat,  $P_i$ : Phosphat

RelA wird in Zellextrakten an die Ribosomen assoziiert gefunden und ist ausschliesslich zur Synthese von pppGpp befähigt. Es synthetisiert den Hauptanteil des pppGpp und liegt assoziiert an das Protein L11 (kodiert durch *rpIK* (= *relC*)) der 50S ribosomalen Untereinheit vor. Es besteht aus zwei Domänen, einer katalytischen N-terminalen und einer regulatorischen C-terminalen Domäne (Yang und Ishiguro 2001). Es scheint, dass der RelA-RelA Interaktion, vermittelt durch die C-terminale Domäne, eine wichtige Funktion bei der Regulation der RelA-Aktivität zukommt (Gropp et al. 2001). Lediglich 0,5-1% der Ribosomen haben RelA gebunden. Ein Aminosäuremangel führt zu einem Mangel an aminoacylierten t-

RNAs für die Proteinbiosynthese. Binden ungeladene tRNAs an die ribosomale A-Seite, dient dies als Signal zur pppGpp Synthese (Neidhardt et al. 1990). Eine Überexpression von RelA bewirkt ebenfalls einen Anstieg der pppGpp Konzentrationen durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass ein mit RelA assoziiertes Ribosom auf eine ungeladene tRNA trifft (Schreiber et al. 1991). Neben Mutationen des Proteins RelA können auch Mutationen des Proteins L11 zu einem entspannten Phänotyp führen (Friesen et al. 1974). Der  $K_m$  Wert von RelA für GDP und GTP ist ähnlich (0,5 mmol/L) und diese Affinität liegt im Rahmen der zellulären GTP Konzentrationen. Während der frühen Phase der Stringenten Kontrolle ist die Konzentration von GDP in der Zelle gewöhnlich eine Zehnerpotenz geringer als die von GTP, daher ist pppGpp das Hauptsyntheseprodukt während der Stringenten Kontrolle. Dieses wird dann durch Gpp zu ppGpp konvertiert (Neidhardt et al. 1990).

Das zu RelA homologe Protein SpoT galt zunächst als eine (p)ppGpp 3'-Pyrophosphohydrolase, die an der Degradation des (p)ppGpp zu GDP oder GTP beteiligt ist (Laffler und Gallant 1974; Stamminger und Lazzarini 1974). Später konnte SpoT ebenfalls eine pppGpp-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden. Gründe für die Suche nach einem weiteren Enzym, das zur ppGpp Synthese befähigt war, war die Tatsache, dass *relA* Mutanten bei Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphat-Mangel sowie einem Anstieg der Osmolarität in der Lage waren, pppGpp zu bilden, nicht aber bei Aminosäuremangel (weniger als zehn Aminosäuren in Limitierung) oder bei nicht-limitiertem Wachstum. In *relA/spoT*-Doppelmutanten konnte keine ppGpp-Produktion mehr nachgewiesen werden (Xiao et al. 1991).

Die katalytisch aktiven Regionen des Proteins SpoT für die ppGpp-Degradation bzw. Synthese konnten in verschiedenen, aber überlappenden Bereichen des Proteins gefunden werden (Cashel et al. 1996). SpoT liegt nicht assoziiert an die Ribosomen, sondern frei im Cytosol vor, und wird durch andere Signale als RelA aktiviert (Kohlenstoff- bzw. Phosphat-Mangel, Osmolaritätsanstieg, Ethanol, CdCl<sub>2</sub>, verringerte Wachstumsrate (Neidhardt et al. 1990)). Eine große Homologie der Proteine RelA und SpoT mit Ausnahme von 50 aminoterminalen Resten und die Tatsache, dass *spoT/relA*-Doppelmutanten keine ppGpp-Synthese mehr aufweisen, deuten auf eine Bifunktionalität des Enzyms hin. Die Kontrolle der (p)ppGpp-Synthese bzw. Degradation durch SpoT ist ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Fest steht, dass die ppGpp-Synthese in *relA*-Mutanten durch den Mangel an Kohlenstoff im Medium geringer inhibiert wird als die Degradation. Die Synthese und Degradationsraten werden insgesamt herabgesetzt bei Kohlenstoffmangel in *relA*-Mutanten, was zu einem Netto-ppGpp-Anstieg führt. SpoT wird abhängig von der Aminosäureverfügbarkeit gebildet und weist nur eine kurze Aktivität nach seiner Synthese auf (durchschnittliche Lebenszeit von 40 s). Also ist eine kontinuierliche Proteinsynthese für die ppGpp-Synthese durch SpoT unabdingbar. Stressfaktoren wie z.B. multipler

## 1. Einleitung

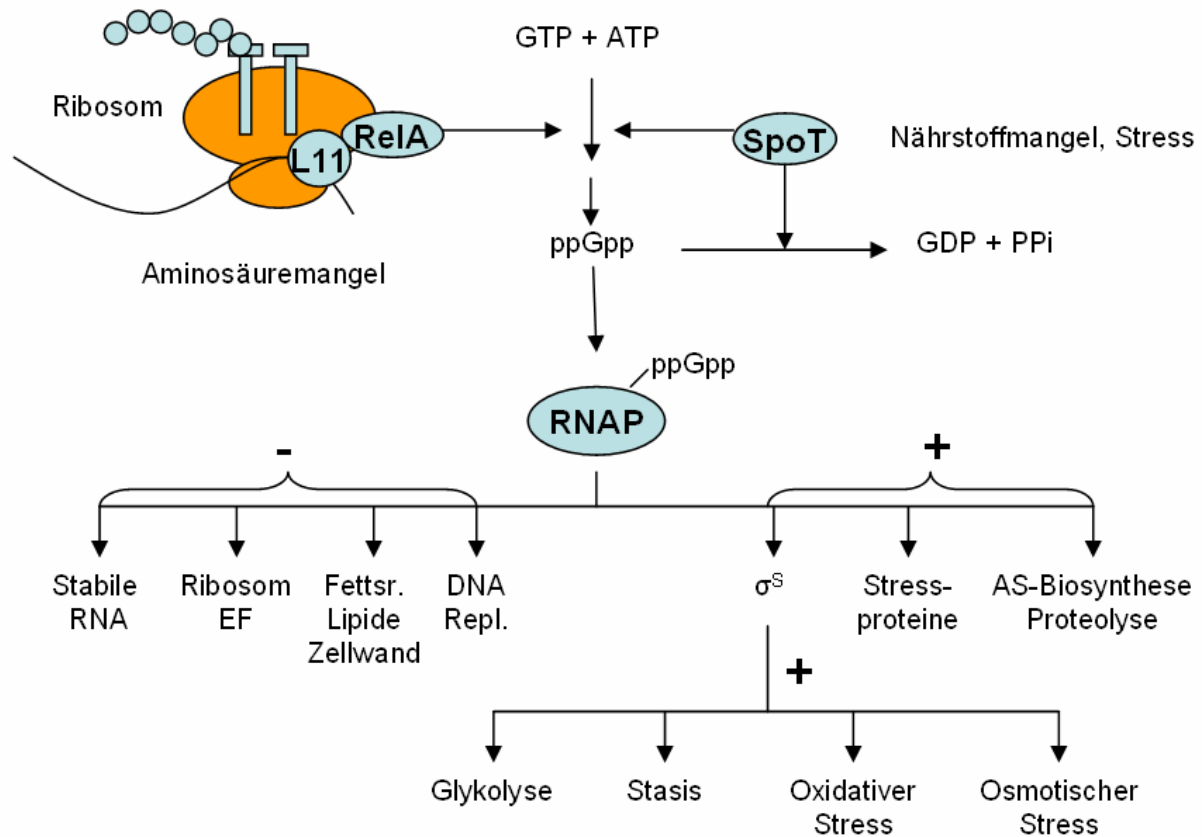
---

Aminosäuremangel oder Kohlenstofflimitierung kontrollieren somit die SpoT-Hydrolyseaktivität. *In vitro* konnte die Hydrolyseaktivität durch ungeladene tRNA gehemmt werden. Also könnte die Anhäufung ungeladener tRNA *in vivo* als Signal für die SpoT-Hydrolyseaktivität dienen.

### 1.3.5.1 Effekte und Mechanismen des ppGpp

Der Anstieg der (p)ppGpp Konzentrationen in *E. coli* bewirkt zahlreiche Veränderungen. Hauptsächlich ist die Transkription durch die Repression der rRNA-Synthese und die damit verbundene Repression der ribosomalen Proteine beeinflusst. Neben der Reduktion der Ribosomen-Konzentration moduliert ppGpp die Verfügbarkeit von Ribosomen weiterhin durch den „Ribosome modulation factor“ (Rmf), ein Protein, welches zur Expression ppGpp benötigt (Izutsu et al. 2001a). Das Protein Rmf kontrolliert die zelluläre Proteinsynthesekapazität, indem es die Dimerisierung von aktiven 70S Ribosomen zu inaktiven 100S Ribosomen vermittelt (Wada et al. 1995). Weiterhin beeinflusst ppGpp die Aminosäurebiosynthese. ppGpp<sup>0</sup> Mutanten sind auxotroph für einige Aminosäuren.

Als positiver Effektor kontrolliert ppGpp eine grosse Anzahl  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren während der „Starvation“ sowie weitere Gene, die durch „alternative  $\sigma$ -Faktoren“ kontrolliert werden (s.u.), um eine optimale Anpassung an den äußeren Stress zu erreichen. Zahlreiche globale Effekte werden ppGpp zugesprochen und sind in Abb. 1.6 nach Magnusson (Magnusson et al. 2005) zusammenfassend dargestellt:



**Abb. 1.6: Globale Effekte des ppGpp.** ppGpp wird aus GTP und ATP über zwei parallele Wege als Antwort auf Aminosäuremangel (durch RelA), Stress oder andere Nährstoffmangel (durch SpoT) am Ribosom gebildet und interagiert mit der RNA-Polymerase. Zahlreiche Effekte sind aufgezeigt. SpoT hydrolysiert ppGpp zu GDP und PP<sub>i</sub>. Modifiziert nach (Magnusson et al. 2005). RNAP: RNA-Polymerase, EF: Elongationsfaktoren; Repl.: Replikation, AS: Aminosäure

Die Wirkungsweise des ppGpp ist bisher noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Verschiedene Studien haben eine direkte Interaktion mit Untereinheiten der RNA-Polymerase ( $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\sigma$  Untereinheiten) ergeben (Chatterji et al. 1998; Touloukhonov et al. 2001). Die DNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert die Transkription, die in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination eingeteilt wird. Sie besteht in Prokaryoten aus vier Untereinheiten:  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ . Die RNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus*, assoziiert mit ppGpp wurde kristallisiert (Artsimovitch et al. 2004). Es konnte eine Bindung des ppGpp in zwei alternativen Orientierungen (5'-und 3'-Orientierung) nahe des aktiven Zentrums an der Oberfläche der RNA-Polymerase nachgewiesen werden. Folgende Modelle der ppGpp-Wirkungsweise wurden demzufolge vorgeschlagen:

1. Die Bindung des ppGpp in 5'-Orientierung erhöht die Affinität für  $Mg^{2+}$ , welches für die mRNA-Synthese benötigt wird. Dies führt zur beschleunigten Substratbindung und Katalyse. Die Bindung des ppGpp in 3'-Orientierung erniedrigt die Affinität für  $Mg^{2+}$  und setzt die Reaktionsgeschwindigkeit herab.

## 1. Einleitung

---

2. Die Bindung von ppGpp an die RNA-Polymerase nahe dem aktiven Zentrum führt zu einer Konkurrenz mit dem Substrat (NTPs).
3. Es kommt zur Basenpaarung mit Cytosin im nicht-kodierenden Strang der DNA. Dies inhibiert die Transkription durch Destabilisierung des offenen Komplexes durch Zerstörung der Protein-DNA Interaktion. Der offene Komplex wird gebildet, nachdem die RNA-Polymerase die konservierten -10- und -35-hexameren Bereiche im Promotorbereich des abzuschreibenden Gens wahrgenommen hat und einen geschlossenen Komplex gebildet hat (Buckle et al. 1999). Dieser wird durch den Vorgang der Nukleation, das Entwinden der DNA innerhalb der -10 Region (Drew et al. 1985; Spassky et al. 1988) und der damit verbundenen Vergrößerung bis hin zum Transkriptionsstartpunkt ausgedehnt und bildet den offenen Komplex (Travers und Muskhelishvili 2005). Nun kann das Gen durch die RNA-Polymerase transkribiert werden.

Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Experimente, welche die Transkription positiv und negativ regulierter Promotoren betrachten, kommen zu einem ähnlichen Bild der ppGpp-Regulation (Magnusson et al. 2005): Die Bindung von ppGpp an die RNA-Polymerase setzt die Halbwertszeit der offenen Komplexe aller Promotoren herab. Die Halbwertszeit der offenen Komplexe der rRNA-Promotoren beispielsweise ist kurz und limitierend für die Transkriptionsinitiation. Daher wirkt eine zusätzliche Verminderung hemmend auf die Transkription.

Für die Repression der rRNA-Synthese werden neben dem Einfluss des ppGpp noch weitere Ursachen diskutiert: NTP-Konzentrationen sowie die Regulatoren Fis und H-NS. Im Gegensatz hierzu scheint die positive Regulation einiger Aminosäurebiosynthese Promotoren eine indirekte Reaktion zu sein. Diese Promotoren weisen langlebige offene Komplexe auf. Dadurch verhindert auch die ppGpp-Bindung an die RNA-Polymerase die Transkription nicht. Die Promotoren werden möglicherweise sogar häufiger verwendet, da die RNA-Polymerase Konzentrationen aufgrund der verminderten rRNA Transkription ansteigen. rRNA kann einen Anteil von 80% an der gesamten stabilen RNA ausmachen und somit kann ein beachtlicher Teil der RNA-Polymerasen dadurch zur Verfügung gestellt werden. Trotz dieser Erklärung kann ein zusätzlicher aktiver Mechanismus der erhöhten Transkription an solchen Promotoren nicht ausgeschlossen werden. Ein Kandidat hierfür ist das Protein DksA, welches an die RNA-Polymerase bindet und die Regulation der rRNA-Promotoren durch ppGpp und NTPs potenziert (Paul et al. 2004a).

Als weitere Wirkungsweise des ppGpp wurde die Beeinflussung der Interaktion der RNA-Polymerase mit „alternativen  $\sigma$ -Faktoren“ vorgeschlagen. Der  $\sigma$ -Faktor, assoziiert mit dem RNA-Polymerase-Core-Enzym, ist an der Promotorerkennung während der Initiation der Transkription beteiligt (Neidhardt et al. 1990). In *E. coli* sind sieben  $\sigma$ -Faktoren bekannt.

Diese werden abhängig von den Umgebungsbedingungen induziert und bewirken die Transkription adäquater Gene.  $\sigma^{70}$  (*rpoD*), der „Haushalts  $\sigma$ -Faktor“, ist für die Erkennung von Promotoren für Gene zuständig, die zum Zellwachstum und zur Vermehrung unter optimalen Bedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase benötigt werden (Neidhardt et al. 1990). Unter abweichenden Umweltbedingungen kommt es neben der Verwendung des „Haushalts  $\sigma$ -Faktors“ zur Verwendung „alternativer  $\sigma$ -Faktoren“. Ist die Zelle unter anderem erhöhten Temperaturen ausgesetzt, so interagiert  $\sigma^{32}$  (*rpoH*) mit der RNA-Polymerase und bewirkt die Expression von Chaperonen und Proteasen, um mit der erhöhten Menge falsch gefalteter Proteine zurecht zu kommen (Straus et al. 1987). Zur Regulation der Flagellen sowie der Chemotaxis verwendet *E. coli*  $\sigma^{28}$  (*rpoF* bzw. *fliA*). Gene für die Eisencitrat Aufnahme werden durch die  $\sigma^{19}$ -RNA-Polymerase transkribiert ( $\sigma^{19}$  ist kodiert durch *fecI*). Umweltbedingungen, die zu einer Veränderung der Zellwand führen, induzieren  $\sigma^{24}$  (auch  $\sigma^E$ , kodiert durch *rpoE*). Zur Regulation der „generellen Stressantwort“ dient der Stressantwort-Faktor  $\sigma^{38}$  (auch  $\sigma^S$ , kodiert durch *rpoS*). Die Gene für den Stickstoff-Stoffwechsel sowie substratspezifische Transportsysteme und Proteine für die Akquirierung alternativer Energie-Quellen werden durch die  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase transkribiert ( $\sigma^{54}$ , auch  $\sigma^N$  wird kodiert durch *rpoN*).  $\sigma^{54}$  nimmt unter den  $\sigma$ -Faktoren eine Sonderstellung ein, da dieser nur eine geringe Homologie zu den übrigen  $\sigma$ -Faktoren aufweist (Merrick 1993) und die RNA-Polymerase assoziiert mit  $\sigma^{54}$  DNA selbst nicht schmelzen kann. Weitere verstärkende Bindeproteine werden hierfür benötigt. Des Weiteren ist ppGpp für die Transkription einiger  $\sigma^{54}$ -abhängiger Gene nötig (Laurie et al. 2003).  $\sigma^{32}$ -abhängige Hitzeschock-Gene zeigen nur eine schwache Expression unter ppGpp-Abwesenheit (Grossman et al. 1985).  $\sigma^{38}$ -abhängige Gene werden ebenfalls durch ppGpp positiv kontrolliert (Jishage et al. 2002). *relA/spoT*-Nullmutanten weisen ähnliche Phänotypen wie *rpoS*-Mutanten auf. Teilweise kann dies durch die Tatsache erklärt werden, dass die *rpoS*-Transkription ppGpp-abhängig ist. *In vivo* wurde jedoch gezeigt, dass  $\sigma^{38}$ -abhängige Promotoren ppGpp sogar unter Anwesenheit von  $\sigma^{38}$ -Wildtypkonzentrationen zur Induktion benötigen. Dies legt die Vermutung nahe, dass ppGpp sowohl an der Produktion als auch an der Aktivität von  $\sigma^S$  beteiligt ist.

ppGpp scheint die Bindefähigkeit der verschiedenen  $\sigma$ -Faktoren an das RNA-Polymerase Core Enzym ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) zu beeinflussen und scheint notwendig für das Funktionieren vieler „alternativer  $\sigma$ -Faktoren“ zu sein (Carmona et al. 2000; Kvint et al. 2000). Die „alternativen  $\sigma$ -Faktoren“ kompetitieren mit  $\sigma^{70}$  unter Anwesenheit von ppGpp *in vivo* signifikant besser um das RNA-Polymerase-Core Enzym (Jishage et al. 2002).

### 1.3.6 Die generelle Stressantwort

Die generelle Stressantwort wird durch zahlreiche Umwelteinflüsse ausgelöst. Dazu gehören Nährstoffmangel oder Limitierung (Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphat oder Aminosäuren), hohe Osmolarität, Temperaturerhöhung bzw. -erniedrigung sowie pH-Wert Änderungen in den sauren Bereich (Wick und Egli 2004). Vermittelt wird diese Stressantwort durch den Sigma-Faktor  $\sigma^S$ , den zweithäufigsten Sigma-Faktor neben  $\sigma^{70}$ . Abhängig von den induzierenden Bedingungen erfolgt die Regulation von  $\sigma^S$  auf transkriptionaler, translationaler oder Protein-Stabilitäts-Ebene. Die transkriptionale Rolle ist in der Regulation der  $\sigma^S$ -Verfügbarkeit jedoch nur von untergeordneter Bedeutung. Speziell unter Kohlenhydrat-Limitierung spielt die posttranslationale Modifikation durch Hemmung der  $\sigma^S$ -Proteolyse eine entscheidende Rolle (s.u.) (Wick und Egli 2004).

Transkriptionale Kontrolle: Bei der  $\sigma^S$ -abhängigen Transkription spielen drei Promotoren eine Rolle. Von den ersten zwei Promotoren wird *rpoS* zusammen mit dem Gen *nlpD* transkribiert, welches für ein Lipoprotein mit unbekannter Funktion kodiert. Diese beiden schwachen Promotoren sind für die geringe Basal-Level Expression verantwortlich, die in wachsenden, nicht gestressten Zellen vorliegt (Ichikawa et al. 1994; Lange et al. 1995; Lange und Hengge-Aronis 1994). Der dritte Promotor liegt innerhalb des *nlpD*-Gens und ist vermutlich hauptverantwortlich für die *rpoS*-Transkription (Lange und Hengge-Aronis 1994). Diese wird von verschiedenen Molekülen beeinflusst, wie z.B. von cAMP, ppGpp, Polyphosphat oder schwachen Säuren (Wick und Egli 2004). Für cAMP sind sowohl aktivierende als auch inaktivierende Einflüsse beschrieben worden (Lange und Hengge-Aronis 1994; McCann et al. 1993). ppGpp hingegen wird für die  $\sigma^S$ -Transkription benötigt (Gentry et al. 1993). ppGpp<sup>0</sup>-Mutanten weisen eine geringere  $\sigma^S$ -Konzentrationen auf (Hirsch und Elliott 2002). Ob Variationen der Konzentrationen des Alarmons ppGpp unter verschiedenen physiologischen Zuständen einen Einfluss auf die *rpoS*-Transkription haben, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch Regulatoren beeinflussen die *rpoS*-Transkription. So stimuliert der Regulator HU die Expression (Balandina et al. 2001), wohingegen der Regulator H-NS hemmend wirkt (Barth et al. 1995; Yamashino et al. 1995). Viele Widersprüche sind in der Literatur zu finden. Ursachen widersprüchlicher Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen liegen mitunter an der Verwendung von *relA*-Mutanten für  $\sigma^S$  Studien (Wick und Egli 2004).

Translationale Regulation: Durch erniedrigte Temperaturen, erhöhte Osmolarität oder auch in der späten stationären Phase erfolgt die Regulation von  $\sigma^S$  auf translationaler Ebene (Wick und Egli 2004). Es wird angenommen, dass die Sekundärstruktur der mRNA für  $\sigma^S$  unter den genannten Umwelteinflüssen einer Konformationsänderung unterworfen wird, welche die Translation erlaubt. Die Translation der *rpoS*-mRNA wird durch die kleinen regulatorischen RNAs DsrA, RprA und OxyS beeinflusst. Beispielsweise bindet DsrA an den nicht



translatierten Bereich am 5' Ende der *rpoS*-mRNA, öffnet dadurch die hemmende Sekundärstruktur und erlaubt den Zugang der Ribosomen (Lease et al. 1998; Lease und Belfort 2000; Majdalani et al. 1998). Sowohl die Synthese als auch die Stabilität sind bei niedrigen Temperaturen erhöht und erklären den Anstieg der  $\sigma^S$ -Konzentrationen nach einer Temperaturniedrigung. Für die *rpoS* Translation ist ebenfalls das kleine RNA-bindende Protein Hfq nötig (Muffler et al. 1997b). Man vermutet, dass Hfq die RNA-RNA Interaktionen vermittelt und so die Regulation ermöglicht. Die RNA-bindenden Kälteschock-Proteine CspC und CspE scheinen ebenfalls einen regulatorischen Effekt auf die  $\sigma^S$ -Translation auszuüben. Eine Überexpression bewirkt die Stabilisierung der mRNA (Phadtare und Inouye 2001). DnaK, ein Hitzeschock-Protein, aktiviert die Translation (Muffler et al. 1997a). Weiterhin wurde ein Einfluss für ppGpp auf translationaler Ebene beschrieben. DksA spielt hierbei als Aktivator der Translation ebenfalls eine Rolle (Brown et al. 2002).

Posttranslationale Kontrolle:  $\sigma^S$  wird in schnell wachsenden Zellen konstitutiv exprimiert, unterliegt aber mit einer Halbwertszeit von 1,4 Minuten einer schnellen Degradation (Lange und Hengge-Aronis 1994). Der Protease-Komplex ClpXP ist für diese Degradation verantwortlich (Schweder et al. 1996).  $\sigma^S$  wird durch Komplexierung mit einem Protein (RssB) zum Abbau durch ClpXP markiert und degradiert. RssB wirkt hier als Katalysator der Degradation und *rssB*-Null-Mutanten sind nicht in der Lage,  $\sigma^S$  abzubauen.

Physiologische Effekte: Die Aktivität von  $\sigma^S$  als Antwort auf einen auslösenden Reiz führt zum Schutz gegenüber dem reizauslösenden Faktor. Darüber hinaus erwirbt die Zelle auch einen Schutz gegenüber zahlreichen weiteren Umwelteinflüssen. Solch ein Stress-Schutz ist sinnvoll, weil die auslösenden Reize in der Regel mit einer Erniedrigung der Wachstumsrate und einer herabgesetzten Proteinbiosynthese einhergehen. Diese erschwert eine rasche Antwort auf Stressreize (Lease und Belfort 2000). Für die Transkription  $\sigma^S$ -abhängiger Gene ist ppGpp nötig (Kvint et al. 2000). Des Weiteren erhöht ppGpp die Fähigkeit von  $\sigma^S$ , mit  $\sigma^{70}$  um das RNA-Polymerase Core-Enzym zu kompetitieren (Jishage et al. 2002). Die Expression von  $\sigma^S$  ermöglicht *E. coli* eine erhöhte Toleranz gegenüber  $H_2O_2$ , Sauerstoff-Radikalen, Austrocknung, saurem oder basischen pH-Wert, osmotischen Stress, Ethanol und Hitze sowie Kälte (Wick und Egli 2004).

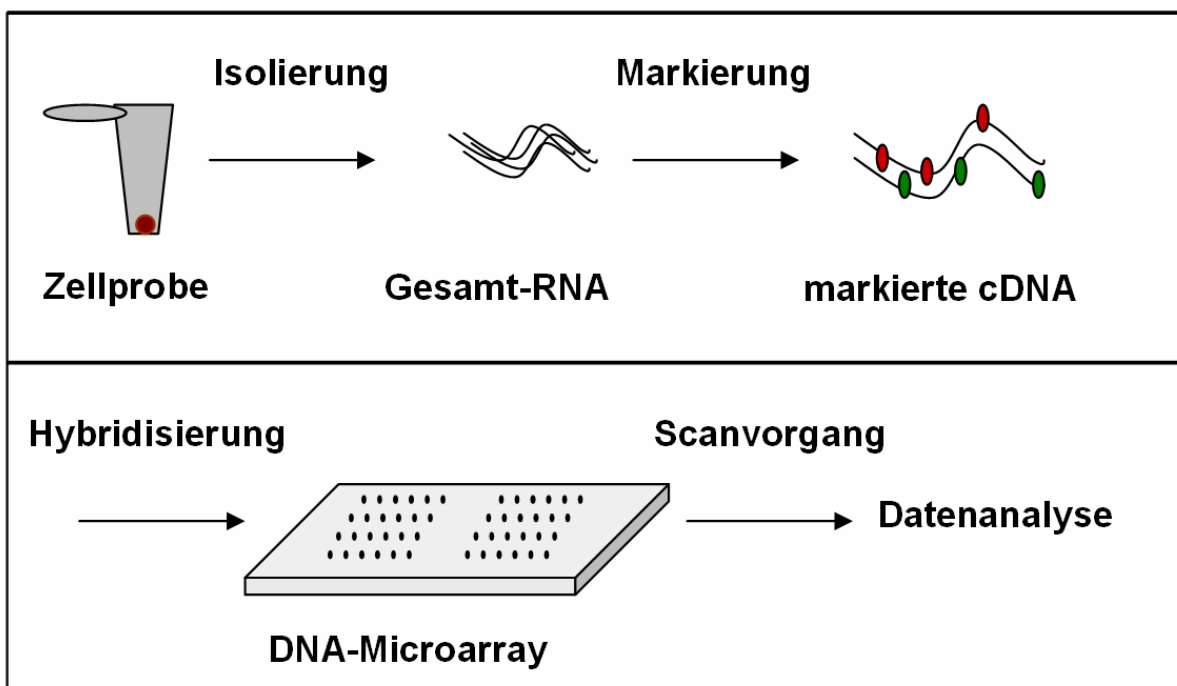
### **1.4 Die Microarray-Technologie**

DNA Microarrays, entwickelt von Dan Brown und Kollegen im Jahre 1995 (Schena et al. 1995) stellen eine Technologie zur umfassenden Transkriptionsanalyse dar. Anders als bei den herkömmlichen Methoden der Expressionsanalyse (Real-Time PCR, Northern-Blot) können mit der Microarray-Technologie die Expressionsveränderungen aller Gene eines Organismus zeitgleich betrachtet werden. Edwin Southern beschrieb als erster die Verwendung von markierten Nukleinsäuremolekülen zur Hybridisierung mit DNA-Molekülen, welche an eine feste Oberfläche immobilisiert worden waren - den so genannten Southern Blot (Southern 1975). Hierbei konnte jedoch nur ein Gen auf einmal betrachtet werden. Die Entwicklung von Techniken wie dem RNase Protection Assay (Ausubel 1995) oder der Seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) (Velculescu et al. 1995) erlaubte die simultane Untersuchung von über zehn Genen. Mit der zunehmenden Verfügbarkeit genomischer Daten stieg der Bedarf an der simultanen Analyse mehrerer tausend Gene gleichzeitig. Zunächst erlaubte die Entwicklung genomischer Filter-Arrays das Screening von Klon-Bibliotheken. cDNA Bibliotheken wurden dafür in definierter Anordnung auf Nylon- oder Nitrocellulose-Filter gedruckt und konnten so nach Hybridisierung den entsprechenden cDNA-Klonen zugeordnet werden. Auch wenn hier die Analyse mehrerer 100 Gene möglich war, so hatten diese Techniken dennoch Nachteile bezüglich der verwendeten Materialien (poröse Membranen, Verwendung von radioaktiven Reagenzien). Dies führte 1995 zur Entwicklung der fluoreszenzbasierten cDNA Microarrays (Schena et al. 1995). Neben der Verwendung zur Analyse von Expressionsveränderungen kommen Microarrays u.a. auch zur Detektion genetischer Polymorphismen, so genannter „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) (Erdogan et al. 2001; Fan et al. 2000) zum Einsatz. Auch finden sie Verwendung in der diagnostischen Analyse, beispielsweise für die molekulare Detektion bakterieller Antibiotika-Resistenzen (Grimm et al. 2004; Yu et al. 2004).

#### 1.4.1 Grundlagen der Microarray-Technologie

DNA-Sonden (Oligonukleotide oder cDNA-PCR-Produkte), die jeden offenen Leserahmen eines zu untersuchenden Organismus repräsentieren, können in genau definierter Anordnung unter Zuhilfenahme spezieller Druckroboter auf speziell beschichteten Glasobjektträgern an vordefinierten Punkten, den so genannten Spots, aufgebracht und immobilisiert werden. Alternativ werden die Sonden auf dem Microarray *in situ* synthetisiert (Affymetrix verwendet diese Methode (Lipshutz et al. 1999)). Dem Design der Oligonukleotid-Sonden kommt eine sehr große Bedeutung zu. Spezifische Sonden zur Detektion einer bestimmten Zielsequenz mit einer Länge von 50 Oligonukleotiden sollten beispielsweise weniger als 75-80% Sequenzähnlichkeit zu allen anderen Genen des untersuchten

Organismus haben, sowie keinen komplementären Bereich größer als 15 Basen-Paare mit allen anderen Genen gemeinsam haben (Kane et al. 2000). Sie sollten im GC-Gehalt und der Schmelztemperatur angepasst sein, sowie frei von Sekundärstrukturen und Selbst-Hybridisierung sein (Southern et al. 1999). Die Sonden binden komplementäre Nukleinsäuren von Test- oder Referenzproben. Dabei können Einkanal- oder Zweikanal-Arrays verwendet werden. Bei Einkanal-Arrays werden die Referenz- und die zu untersuchende Probe auf unterschiedlichen Arrays hybridisiert, bei Zweikanal-Arrays werden beide Proben auf dem gleichen Array hybridisiert. Hier werden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion verwendet, die in zwei verschiedenen Kanälen ausgelesen werden (s.u.). Das zeitgleiche Auftragen zweier konkurrierender, unterschiedlich markierter cDNA Proben führt zu relativen Expressionswerten (Yang und Speed 2002). Im Folgenden wird über die Methode der Zweikanal-Arrays berichtet sowie über die Vorgehensweise zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene bei konkurrierenden Zweikanal-Arrays. Einen graphischen Überblick gibt Abb. 1.7.



**Abb. 1.7: Durchführung eines Zweikanal-Microarray Experiments.** Aus der Zellprobe wird Gesamt-RNA isoliert, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf dem Microarray hybridisiert. Der Microarray wird eingescannt und die dabei erhaltenen Bilddateien analysiert.

Zur Herstellung der zu hybridisierenden cDNA wird zunächst Gesamt-RNA aus der zu untersuchenden biologischen Proben isoliert. Daraufhin werden Fluoreszenzfarbstoffe (entweder direkt durch den Einbau cyanin-markierter Nucleotide oder indirekt über die Inkorporation amino-allyl markierter Nucleotide und die anschließende Kopplung an

## 1. Einleitung

---

fluoreszierende Farbstoffe) über eine Reverse Transkription eingebaut und die dabei erhaltene cDNA auf dem Microarray hybridisiert. Zur Markierung verwendet man überwiegend die Fluoreszenzfarbstoffe Cyanin 3 (Cy3, Anregungswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm) und Cyanin 5 (Cy5, Anregungswellenlänge: 649 nm, Emissionswellenlänge: 670 nm). Die Arrays werden daraufhin in einem Microarray-Scanner mit der entsprechenden Wellenlänge belichtet und die dabei emittierten Fluoreszenzsignale in Form von 16 bit Tiff-Bilddateien registriert. Diese Bilddateien werden mit Hilfe spezieller Bildanalyseprogramme in Intensitätsdaten umgewandelt, welche dann weiter ausgewertet werden.

### 1.4.2 Design des Experiments

Die Planung eines Microarray-Experiment gliedert sich in drei Teile (Yang und Speed 2002):

1. Wissenschaftlicher Teil mit den Fragestellungen: Welches Ziel soll mit dem Experiment erreicht werden? Welche spezifischen Fragen sollen mit dem Experiment beantwortet werden können und welche Priorität kommt ihnen jeweils zu? Wie wird das Experiment die gestellten Fragen beantworten können?

2. Praktisch logistischer Teil mit den Fragestellungen: Welche RNA Proben (Referenz, zu analysierende Probe) stehen in welchem Maße zur Verfügung?

Wie viele Microarray-Slides können verwendet werden?

3. Fragestellungen zur Durchführung: Welcher experimentelle Prozess (RNA-Isolierung, cDNA-Synthese) ist der geeignetste? Welche Kontrollen sind geplant (positiv, negativ)? Besteht die Möglichkeit zur Verifikation (Real-Time PCR, Northern-Blot)?

Ist die wissenschaftliche Frage nach dem Ziel des Experiments beantwortet, kommt dem experimentellen Design eine entscheidende Bedeutung zu. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass bei Zweikanal-Arrays die interessierenden Unterschiede so weit wie möglich über die Hybridisierung auf einem Chip erfasst werden sollten, um die Varianz der Expressionsunterschiede möglichst gering zu halten (Yang und Speed 2002), und nicht indirekt, beispielsweise durch Verwendung einer gemeinsamen Referenz. Jede nicht erfasste Verzerrung der Daten kann zu einer Verfälschung der Ergebnisse einer statistischen Analyse führen. Deshalb ist darauf zu achten, möglichst viele unabhängige Einheiten während des Experiments zu erzeugen (Churchill 2002). Als unabhängige experimentelle Einheiten können nur diejenigen Experimente angesehen werden, deren biologisches Material, welches als Grundlage der erhaltenen Daten diente, tatsächlich in allen Teilabschnitten des Experiments unabhängig voneinander behandelt worden ist (Cox 1958). Als unabhängige experimentelle Einheiten können also nur nicht-gepoolte biologische Replikate, nicht hingegen technische Replikate (also identische Sonden auf dem selben Microarray, identische cDNA-Proben auf unterschiedlichen Microarrays) angesehen werden.

Die Notwendigkeit dieser Vorgehensweise wird aus der Tatsache ersichtlich, dass die Korrelation von Fluoreszenz-Intensitätsverhältnissen doppelter Sonden auf dem selben Microarray typischerweise mehr als 95% beträgt, auf unterschiedlichen Microarrays hingegen in den Bereich zwischen 60- und 80% fällt (Churchill 2002). Biologische Replikate weisen oft eine noch geringere Korrelation auf. Des Weiteren werden Streuungen in der biologischen Population ohne biologische Replikate nicht berücksichtigt. Gerade diese Unterschiede machen eine profunde statistische Analyse unabdingbar und zeigen, dass biologische Replikate, wann immer möglich, den technischen Replikaten vorzuziehen sind. Trotzdem spielen auch Kriterien wie die Probenverfügbarkeit oder auch finanzielle Aspekte eine entscheidende Rolle.

Jüngst sind Arbeiten erschienen, die sich mit der Verlässlichkeit der Microarray-Technologie befassen. Dabei wurden Untersuchungen bezüglich der Unterschiede zwischen verschiedenen Plattformen (cDNA-Microarrays, Oligonukleotid-Microarrays sowie Affymetrix-Chips) sowie zwischen verschiedenen Laboren angestellt (Bammler et al. 2005; Irizarry et al. 2005). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die unterschiedliche Behandlung der gleichen experimentellen Einheit (identische mRNA als Ausgangssubstanz) durch verschiedene Labore einen größeren Effekt auf die Reproduzierbarkeit der Daten hatte als der Einfluss der Verwendung verschiedener Plattformen. Die Reproduzierbarkeit zwischen Laboren konnte durch Standardisierung der experimentellen Vorgehensweise deutlich erhöht werden. Darüber hinaus hat vor allem die Wahl der Datenanalyse einen großen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit gezeigt. Eine angemessene Datenanalyse, die sämtliche Verzerrungen, die auftreten können, richtig berücksichtigt, erhöht die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in Microarray-Experimenten (siehe 1.5, „Datenprozessierung und statistische Auswertung von Microarray-Experimenten“). Zur Kontrolle von Microarray-Experimenten und, um die Möglichkeit zu eröffnen, solche Experimente mit eigenen vergleichen zu können, haben sich weltweit Arbeitsgruppen zur sogenannten Microarray Gene Expression Data Society (MGED) zusammengeschlossen (Mitglieder aus Europa, Amerika und Japan) (Causton und Game 2003). Diese haben vier Arbeitsbereiche etabliert, die sich der Kontrolle der Microarray-Experimente verpflichtet sehen:

1. MAGE - Eine Gruppe, die sich mit der Etablierung des Datenmanagements befaßt.
2. MIAME - Eine Gruppe, die Richtlinien für die minimale Information von Array-Experimenten aufstellt, die der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden müssen.
3. Ontology - Eine Gruppe, die sich mit der Beschreibung von Microarray-Experimenten befasst sowie
4. Normalization - Eine Gruppe, die Datenanalysemethoden untersucht und weiterentwickelt.

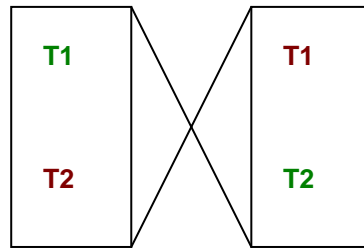
Im Folgenden wird aufgezeigt, was bei der statistischen Analyse von Microarray-Experimenten zu berücksichtigen ist.

### **1.5 Datenprozessierung und statistische Auswertung von Microarray-Experimenten**

Gesamtgenomische Microarray-Experimente resultieren in großen Datenmengen, in denen jedem Gen verschiedene Intensitätswerte entsprechend der Berechnung durch den Microarray-Scanner zugeordnet werden. Um Aussagen über signifikant differentiell exprimierte Gene treffen zu können und weitere statistische Analysen durchführen zu können, die die biologische Fragestellung beantworten sollen (Clusteranalyse, Klassifikation), müssen diese Rohdaten einer statistischen Analyse adäquat zur Verfügung gestellt werden. Bei Zwei-Kanal-Microarrays erfolgt zuerst die Transformation der Intensitätsdaten in logarithmische Verhältniswerte. Die so transformierten Daten sollten neben einer Qualitätskontrolle, die oft schon auf der Ebene der Bildanalyse (hat der Spot die geeignete Größe/Intensität?) stattfindet, einer Hintergrundkorrektur unterzogen werden. Verschiedene Korrekturmöglichkeiten werden vorgeschlagen. Am einfachsten ist die Korrektur durch Subtraktion des Hintergrunds vom Vordergrund. Die Hintergrund- bzw. Vordergrund-Intensitätswerte werden über das Bildanalyseprogramm berechnet (Yang et al. 2000). Die Hintergrund-korrigierten Intensitäten für den roten Kanal (Cy5) werden im Folgenden mit  $R$ , die für den grünen Kanal (Cy3) mit  $G$  bezeichnet. Die Transformation der Intensitätsdaten in logarithmische Verhältniswerte erfolgt, da das Verhältnis der Intensitätswerte ( $R/G$ ) nicht symmetrisch um 1 verteilt ist, sondern falls  $R$  größer als  $G$  ist, den Bereich von 1 bis Unendlich, falls  $G$  größer als  $R$  ist, jedoch nur den Bereich von 0 bis 1 einnimmt. Des Weiteren werden die logarithmierten Expressionsverhältniswerte im Folgenden als „Log-Ratios“ bzw. als  $M$ -Werte bezeichnet. Somit berechnen sich die logarithmierten Expressionsverhältniswerte zu  $M = \log_2 R/G$  für jeden Spot. Die logarithmische Gesamtintensität eines Spots berechnet sich zu  $A = 1/2 \log_2 RG$ .

Daraufhin müssen die Daten normalisiert werden. Dies ist notwendig, da die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe die Datenkorrelation beeinflussen kann: Zum einen baut die Reverse Transkriptase bevorzugt Cy3-dCTPs in die cDNA ein, zum anderen trägt die stärkere Fluoreszenzintensität des Farbstoffs selbst zu Verschiebungen der Intensitätsverhältnisse bei. Des Weiteren spielen auch Faktoren wie unterschiedliche Nadel-Geometrien zum Absetzen der Spots auf dem Array, die abgesetzte Menge an Sonden, Hybridisierungseffekte und Staub oder auch Fusseln eine Rolle (Quackenbush 2002; Schuchhardt et al. 2000). Zur Kontrolle von intensitätsabhängigen Verzerrungen, kann schon auf der Ebene des Experiments ein Ausgleich geschaffen werden, indem so genannte Dye-

Swap Experimente durchgeführt werden. Ein Dye-Swap Experiment ist ein Experiment, bei dem zwei Microarrays mit cDNA-Proben gleichen RNA-Ursprungs hybridisiert werden. Der Unterschied zwischen den Microarrays ist die Markierung der cDNA. Ist auf dem ersten Microarray Probe 1 mit Cy3-dCTP markiert und Probe 2 mit Cy5-dCTP dann ist auf dem zweiten Microarray Probe 1 mit Cy5-dCTP und Probe 2 mit Cy3-dCTP markiert. Die Farben werden also über Kreuz vertauscht. Im Idealfall lassen sich die Einbauunterschiede bei entsprechender Verrechnung der „Log-Ratios“ so eliminieren (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8: Dye-Swap Experiment:** Zwei Microarrays werden mit cDNA gleichen RNA-Ursprungs hybridisiert, die cDNA ist jedoch unterschiedlich markiert. Eine Probe ist auf dem ersten Microarray mit Cy3 (grün) markiert, auf dem zweiten mit Cy5 (rot). Für die andere ist es umgekehrt.

Die einfachste und am häufigsten verwendete Normalisierungsmethode nimmt an, dass Verzerrungen auf dem logarithmischen Maßstab konstant über den Array verteilt sind. Daher werden die „Log-Ratios“ durch Subtraktion einer Konstanten  $c$  korrigiert:  $M_{\text{norm}} = M - c$ . Für die globale Konstante  $c$  wird gewöhnlich der Mittelwert oder der Median der  $M$ -Werte einer Anzahl von Genen auf dem Array, die als „nicht differentiell exprimiert“ angenommen werden, abgeschätzt. Oft ist jedoch eine Abhängigkeit des „Rot-Grün Unterschiedes“ von der Intensität der Sonden festzustellen. Diese Abhängigkeit kann über einen geeigneten robusten „Scatterplot Smoother“ beispielsweise eine „Local Weighted Regression“ (loess) geschätzt werden (Yang et al. 2002). Die normalisierten Werte berechnen sich dann zu  $M_{\text{norm}} = M - c(A)$ . Um Unterschiede der verschiedenen Nadeln beim Drucken mit zu berücksichtigen, kann eine Anpassung für jede Nadel einzeln vorgenommen werden, beispielsweise mit Hilfe einer so genannten „Print-Tip-Group Loess Normalisierung“  $M_{\text{norm}} = M - c_i(A)$ , wobei  $i$  die Region des Arrays bezeichnet (Smyth et al. 2003).

Nun schließt sich beispielsweise eine statistische Analyse der Daten zur Suche nach differentiell exprimierten Genen an. In den Anfängen der Microarray-Analyse wurde für diesen Zweck ermittelt, ob die mittleren  $M$ -Werte der Gene oberhalb oder unterhalb eines vordefinierten Wertes liegen. Diese Vorgehensweise hat sich als ungenau herausgestellt – die Ergebnisse waren schlecht und oft gar nicht reproduzierbar, da die Variabilität der Expressionslevel für jedes Gen nicht mit in Betracht gezogen wird (Lönnstedt und Speed 2002; Tusher et al. 2001). Die Variabilität der  $M$ -Werte unter den Genen zwischen den

## 1. Einleitung

---

Replikaten ist nicht konstant und Gene mit großer Varianz haben eine große Chance einen großen mittleren  $M$ -Wert zu erreichen, auch wenn sie nicht differentiell exprimiert sind. Eine Methode, die die Variabilität der Gene mit einbezieht, erfolgt über die Berechnung der  $t$ -Teststatistik für jedes Gen (Gleichung 1.1):

$$t = \frac{\bar{M}}{(s/\sqrt{n})} \quad \text{Gleichung 1.1}$$

$\bar{M}$  ist der mittlere  $M$ -Wert,  $s$  ist die Standardabweichung und  $n$  der Stichprobenumfang. Hohe  $t$ -Werte führen zu kleinen  $p$ -Werten (Definition siehe Kapitel 6 "Glossar"). Im Fall eines Tests wird das Ergebnis als signifikant angesehen, falls der berechnete  $p$ -Wert kleiner als das vorher festgelegte Signifikanzniveau ist. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass Gene (Stichproben) mit einer sehr kleinen Varianz hohe  $t$ -Statistiken erhalten können, auch wenn die Gene nicht differentiell exprimiert sind. Um dieses Problem zu umgehen, schlagen Lönstedt und Speed eine parametrische, empirische Bayes-Annäherung der  $t$ -Statistik vor (Lönstedt und Speed 2002). Diese so genannte „penalized  $t$ -Statistik“ berechnet sich zu (Gleichung 1.2):

$$t = \frac{\bar{M}}{\sqrt{(a + s^2/n)}} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

Der Penalty-Wert  $a$  wird hierbei auf Grund des Mittelwertes sowie der Standardabweichung der Stichprobenvarianzen  $s^2$  geschätzt. Verschiedene Varianten der penalized  $t$ -Statistik wurden zur Analyse von Microarray-Daten vorgeschlagen. Für die Auswertung der Microarray-Daten der vorliegenden Arbeit wurde ein von Gordon Smyth in das Software Paket „limma“ implementierter empirischer Bayes-Ansatz verwendet. Über ein lineares Modell werden Koeffizienten errechnet, die im einfachsten Fall den mittleren  $M$ -Werten in obigen Gleichungen entsprechen, sowie ein Schätzer für die Varianz über alle Gene bestimmt. Damit werden analog zu Gleichung 1.2 die moderaten  $t$ -Statistiken berechnet (Smyth et al. 2003). Der Vorteil der Methode liegt darin, dass die Varianzen aller Gene in die Berechnung der einzelnen  $t$ -Teststatistiken mit einbezogen werden.

Sind für alle Gene die konkreten Werte der verwendeten Statistik berechnet, muss entschieden werden, welche Gene als „signifikant differentiell exprimiert“ angesehen werden können. Zunächst wird aus den errechneten  $t$ -Werten der sogenannte  $p$ -Wert bestimmt, der die Wahrscheinlichkeit unter der Null-Hypothese (das Gen ist nicht differentiell exprimiert) dafür angibt, dass die  $t$ -Teststatistik (als theoretische Größe) betragsmäßig größer ist als dieser  $t$ -Wert. Ein  $p$ -Wert, der kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau ist, zeigt also



an, dass es unter der Annahme, dass das Gen nicht differentiell exprimiert ist, sehr unwahrscheinlich ist, zufällig einen betragsmäßig so großen t-Wert vorzufinden. In diesem Fall wird man die Null-Hypothese ablehnen, d.h. das Gen als „differentiell exprimiert“ ansehen.

In jeder Testsituation können bei gegebener Null-Hypothese zwei Arten von Fehlern auftreten. Ein Fehler erster Art bzw. ein falsch positiver Fehler bedeutet in unserem Fall, dass ein Gen aufgrund der Daten vom verwendeten Test als „differentiell exprimiert“ gefunden wurde, obwohl es das nicht ist. Ein Fehler zweiter Art bzw. ein falsch negativer Fehler hingegen liegt vor, wenn ein tatsächlich differentiell exprimiertes Gen nicht erfasst wurde. Werden, wie im Fall der Microarrays, mehrere Hypothesen getestet (für jedes Gen wird ein Test durchgeführt), so erhöht sich die Chance, einen Fehler erster Art zu begehen, mit der Anzahl der Hypothesen. Gene mit kleinen p-Werten von beispielsweise 0,01 können bei einer ausreichend großen Menge an untersuchten Genen auf dem Array schon zufällig als „differentiell exprimiert“ gefunden werden. Werden z.B. 1000 Gene mit einem Signifikanzniveau von 0,05 untersucht, dann werden im Mittel  $1000 \cdot 0,05 = 50$  Gene als „differentiell exprimiert“ gefunden, die gar nicht differentiell exprimiert sind! Die Frage der differentiellen Expression kann also neu und besser formuliert als ein Problem des „multiplen Hypothesen-Testens“ verstanden werden (Dudoit et al. 2003). Verschiedene Methoden zur Kontrolle der genannten multiplikativen Fehler sind für Microarray-Analysen diskutiert worden.

Eine Möglichkeit der Kontrolle stellt die „Family Wise Error Rate“ dar (Quinn und Keough 2002). Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, mindestens ein falsch positives Gen unter den als „differentiell exprimierten“ identifizierten Genen zu finden, unabhängig davon, ob die Gene tatsächlich differentiell exprimiert sind oder nicht. Diese Methode ist sehr konservativ. Ein weit weniger konservatives Verfahren bietet die Kontrolle mittels „False Discovery Rate“. Diese entspricht dem erwarteten Anteil an Fehlern unter den Genen, die „als signifikant differentiell exprimiert“ gefunden werden. Der Quotient der als falsch positiv erwarteten Gene und aller differentiell bestimmten Werte ermöglicht die Berechnung eines angepassten p-Wertes, der für Vorhersagen über differentielle Expression verwendet werden kann.

### **1.6 Die Zielsetzung dieser Arbeit**

Eine Glukose-Limitierung in *Escherichia coli* führt zu zahlreichen physiologischen Veränderungen. Neben der Hungerantwort, die durch das Bestreben der Zelle charakterisiert ist, Kohlenhydrate zu akquirieren, stellt die Stringente Kontrolle eine weitere weitreichende Veränderung dar, die durch die Limitierung ausgelöst wird. Sie erlaubt der Zelle eine optimale Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen. Fällt die Glukose-Konzentration unter die Affinität der Glukose-Aufnahmesysteme in *E. coli*, kommt es zur extremsten Form des Hungerns, der so genannten Starvation. Einzelne Aspekte dieser komplexen Antworten wurden bereits über klassische molekularbiologische Methoden bis ins Detail aufgeklärt.

Die vorliegende Arbeit soll nun dazu beitragen, die physiologische Antwort von *E. coli* K12 (W3110) unter Kohlenhydrat-Limitierung auf Transkriptom-Ebene genomweit zu erfassen und damit genauer charakterisieren zu können. Von Interesse ist eine ganzheitliche Sichtweise dieser Stress-Antwort über einen längeren Zeitraum unter Limitierung, die auch die regulatorischen Mechanismen mit einbezieht.

Die Glukose-Limitierung soll in *E. coli* K12 (W3110) mittels einer gekoppelten Batch/Fed-Batch-Fermentation mit konstanter Glukose-Zufütterungsrate in der Fed-Batch-Phase ausgelöst werden. Die Strategie der Fermentation erlaubt die Überwachung experimenteller Parameter wie der Glukose-Konzentration, der Sauerstoff-Verfügbarkeit, der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Abgas etc. Dies soll größere Reproduzierbarkeiten bei Microarray Analysen erlauben. Darüber hinaus erlaubt die Fermentations-Strategie ein langsames Abfallen der Wachstumsrate in *E. coli* und damit eine bessere zeitliche Auflösung der Stressantworten.

Die über die vorliegende Studie gewonnenen Ergebnisse sollen im Rahmen eines Systembiologie-Projektes für die Aufstellung eines mathematischen Modells zur dynamischen Modellierung der Stressantwort verwendet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Die zur Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme und deren Bezugsquellen sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in analysereiner Qualität bezogen:

**Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits**

<b>Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits</b>	<b>Hersteller / Firma</b>
3 - [N-Morpholino] - propansulfonsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Agarose	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Borsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Cy3 - dCTP	Amersham, Uppsala, Schweden
Cy5 - dCTP	Amersham, Uppsala, Schweden
Diethyl - Pyrocarbonat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
dNTPs	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
EDTA	Metabion, Martinsried, Deutschland
EDTA (Dinatrium-Salz)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ethanol absolut	Riedel de Haën, Hannover, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Formaldehyd	Riedel de Haën, Hannover, Deutschland
Formamid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Hybridisierungspuffer für Gene Frames	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
K12 V2 Oligonukleotid Set	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Lysozym	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumacetat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumcitrat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer	Sigma ARK GMBH, Steinheim, Deutschland
RNA 6000 Nano Lab Chip Kit	Agilent, Waldbronn, Deutschland
RNA ladder high range	MBI Fermentas, St. Leon - Rot, Deutschland
RNA protect Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2. Material und Methoden

**Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits. Fortsetzung**

Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits	Hersteller / Firma
RNase-free DNase Set (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNaseOut	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
SDS	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Spotting Puffer A	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Superscript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
SYBR Safe <sup>TM</sup> DNA Gel Stain	MolecularProbes/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

### 2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet (Tab. 2.2):

**Tab. 2.2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller /Firma
Agarose Gelelektrophorese Apparaturen	Mini-Sub <sup>TM</sup> DNA Cell Mini-Sub <sup>TM</sup> DNA Cell GT Power Pac 300	BioRad, München, Deutschland
Eppendorf Cups	Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Färbegestell	Färbegestell	Ehlert und Partner, Niederkassel-Rheidt, Deutschland
Bioreaktor	30 L; IBVT Stuttgart	Bioengineering AG, Wald, Schweiz
Falcons	PP Schraubverschlussröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Glaskasten	Glaskasten	Ehlert und Partner, Niederkassel-Rheidt, Deutschland
Glaswaren	Erlenmeyerkolben, Bechergläser, Flaschen	Schott Glas, Mainz, Deutschland
Heizrührer	RCT Basic	IKA Labortechnik, Stauffen, Deutschland
Hybridisierungs-ofen	DUO Therm Hybridization Oven OV5	WhatmanBiometra, Göttingen, Deutschland
Hybridisierungsstation	TS400	Tecan
Klebefolien	PCR foil selbstklebend	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tab. 2.2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien. Fortsetzung

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller /Firma
Mikrotiterplatten	384PP, F-Boden, transparent	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Deckel	PS Abdeckplatte	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex, Ecully Cedex, Frankreich
Nadeln zum Drucken der <i>Microarrays</i>	PT 3000	Point Technologies, Boulder, USA
Objektträger Epoxid-beschichtet	Epoxy-Slides	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Delaware, USA
Pipetten	Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Pipettenspitze	Greiner, Fredensborg, Dänemark
Scanner	ScanArray Express Microarray Scanner	PerkinElmer, Kalifornien, USA
Sterilfilter	Ø 0,22 µm	Millipore, Molsheim, Frankreich
Speed Vac	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spotter für <i>Microarrays</i>	Microgrid II	BioRobotics, Frankfurt, Deutschland
Tischzentrifugen	Centrifuge 541 7C Centrifuge 541 7R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV Leuchttisch	UV Leuchttisch	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Vortex	Janke und Kunkel Vortex Genie 2	IKA Labortechnik, Stauffen, Deutschland Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	Precision Advanced Basic	Ohaus Waagen, Giessen, Deutschland Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg, Deutschland

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.3 Software

Spezielle Software, die zur Generierung sowie Auswertung der Microarray-Daten verwendet wurde, ist in Tab. 2.3 aufgelistet:

**Tab. 2.3: Liste der Software, die im Zuge der Auswertung der Microarrays verwendet wurde**

Software	Firma/Autor	Applikation
R Vers. 2.1.1	R Development Core Team	Plattform für die Anwendung von limma, sma sowie statmod
Limma, Vers. 2.0.2	Gordon Smyth	Statistische Analyse
Statmod, Vers. 1.2.0	Gordon Smyth	Statistische Analyse
Sma, Vers. 0.5.14	Gordon Smyth	Statistische Analyse
ScanArray Express Vers 3.0	PerkinElmer	Scannen der Microarrays
TAS Application Suite V. 2.6.0.2	Genomic Solutions	Drucken der Arrays Erzeugung des Gal Files
Cluster Vers. 2.11	Eisen	Visualisierung der differentiell exprimierten Gene
TreeView Vers. 1.6	Eisen	
CS ChemDraw Pro 6.0	CambridgeSoft	Strukturformel-Erstellung (ppGpp)

### 2.1.4 Verwendete Gleichungen

- Standardabweichung

Zur Berechnung der Standardabweichung  $s$  für die RNA- sowie die cDNA-Ausbeute wurde Gleichung 2.1 verwendet:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

$s$ : Standardabweichung

$x$ : gemessener Wert (Konzentration der RNA)

$n$ : Grundgesamtheit der Werte

- Anordnung der differentiell exprimierten Gene

Zur Veranschaulichung wurden die differentiell exprimierten Gene bezüglich der Ähnlichkeit des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderung geordnet. Die Ordnung erfolgte über ein hierarchisches Clustern nach Gleichung 2.2. Jedem Gen wird dabei ein Vektor im  $N$ -dimensionalen Raum ( $N$  entspricht der Anzahl der untersuchten Zeitpunkte des Experiments,

die Koordinaten bilden die „Log-Ratios“) zugeordnet und die Abstände der Vektoren zueinander werden mathematisch erfasst. Ein geringerer Abstand bedeutet hier eine größere Ähnlichkeit.

$$r = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left[ \frac{X_i}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_i)^2}} \right] \left[ \frac{Y_i}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i)^2}} \right] \quad \text{Gleichung 2.2}$$

r: Korrelationskoeffizient

N: Anzahl der untersuchten Zeitpunkte

X, Y: gemessene Werte der betrachteten „Log-Ratios“ in den beiden Datenserien

X<sub>i</sub>, Y<sub>i</sub>: Mittelwerte von X und Y

### 2.1.5 Mikroorganismen

Für die durchgeführten Fermentationen wurde der Organismus *Escherichia coli* K12 W3110 (DSM 5911) verwendet.

### 2.1.6 Medien, Lösungen und Puffer

Medien, Lösungen und Puffer wurden für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Lösungen, deren Komponenten sich durch das Autoklavieren zersetzen oder verändern, wurden sterilfiltriert. Dies waren Aminosäure- und Zuckerlösungen.

Die jeweils verwendeten Medien, Lösungen und Puffer werden bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Herstellung gesamtgenomischer *E. coli* K12 Microarrays

Gesamtgenomische *E. coli* K12 Microarrays wurden mit dem Microgrid II Spotter der Firma Biorobotics hergestellt. Hierfür wurde das MWG *E. coli* K12 V2 Oligoset der Firma MWG Biotech verwendet. Dieses beinhaltet 4608 Oligonukleotid-Sonden mit einer Länge von 50 Nukleotiden, geliefert in zwölf Greiner 384 PP Mikrotiterplatten mit F-Boden. 4284 dieser Sonden decken 4237 offene Leserahmen des *E. coli* Genoms ab, da 47 Gene zweimal repräsentiert waren. Zusätzlich sind 48 Kontroll-Oligonukleotide, welche für Gensequenzen aus *Arabidopsis* spezifisch sind und keine Homologie zu *E. coli* Gensequenzen aufweisen, als Negativkontrollen enthalten. Hinzu kommen interne Kontrollen, die für die Datenauswertung nicht herangezogen werden können. Details über das Design der Sonden sind dem User Manual zu entnehmen; eine Quellinformation für die zugrunde liegenden Sequenzen stellt die NCBI GenBank Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) dar. Die Sonden waren in Puffer A (MWG) gelöst und wurden mit 16 Nadeln der Firma Point (PT 3000) als Duplikate auf die Epoxid-beschichteten Glasobjektträger (MWG Epoxy-Slides) gedruckt. Pro Druckvorgang wurden insgesamt 27 Glasobjektträger bedruckt. Davon wurden drei als so genannte „Pre-Spot Slides“ verworfen und 24 konnten als Microarrays für Experimente eingesetzt werden. Gedruckt wurde unter folgenden Bedingungen (Software Einstellungen, Software: TAS Application Suite V. 2.6.0.2):

- Tool: 4x4 Konfiguration
- Group (Tool Type): 2. Micro Spot (384 Well)
- Source Action: Dwell/Remove one lid at a time
- 60 Spots/Source Visit, hiervon waren 10 Pre Spots
- Soft Touch Distance: 1,5 mm
- Feuchtigkeitskontrolle: Minimal: 58%; Zielfeuchtigkeit: 63%
- Waschbedingungen: 3 x zu Beginn, 5 x am Ende, verwendet wurden Bad 1 zwei Sekunden und Bad 2 drei Sekunden (2 mm wiggle); gewaschen wurde mit ddH<sub>2</sub>O
- Alle Replikate wurden auf den ersten Epoxy-Slide zuerst gedruckt.

Nach dem Drucken wurden die Microarrays bei 42°C über Nacht in einem Hybridisierungssofen (Whatman Biometra) inkubiert. Eine mit Wasser befüllte Petrischale diente der Luftbefeuchtung. Anschließend wurden die Microarrays in Glaskästen mit eingesetztem Färbegestell (Ehlert und Partner) mit 0,2% w/v SDS Lösung für 2 min unter Rühren gewaschen, zwei mal für 1 min in ddH<sub>2</sub>O unter Rühren gewaschen und daraufhin für 20 min in ddH<sub>2</sub>O im Hybridisierungssofen bei 50°C inkubiert. Daraufhin wurden die Arrays mit Stickstoff getrocknet und bis zur Hybridisierung dunkel und trocken gelagert. Ein Microarray



jedes Druckvorgangs wurde, um das erfolgreiche Absetzen aller Sonden zu überprüfen, mit SYBR Safe™ DNA Gel Stain (MolecularProbes) angefärbt, indem etwa 750 µL der Lösung auf die bedruckte Fläche aufgegeben wurde, für drei Minuten inkubiert und daraufhin vier mal mit 0,5 x TBE-Puffer (Tab. 2.4) gewaschen wurde. Das erfolgreiche Absetzen wurde über Anregung bei 550 nm mittels des Microarray-Scanners visualisiert.

**Tab. 2.4: Zusammensetzung der Stocklösung zum Waschen nach Anfärben der Microarrays mit SYBR Safe™ DNA Gel Stain (MolecularProbes) für die Qualitätskontrolle.** Verwendet wurde eine 0,5 x Lösung.

<b>5 x TBE-Puffer</b>	
Tris-Borat	0,45 M
EDTA	0,01 M

### 2.2.2 Fermentation

Zur experimentellen Erfassung der Glukose-Limitierung wurde ein Fed-Batch-Fermentationsverfahren verwendet. Fermentationen erlauben durch die Kontrolle der Parameter Nährstoffverfügbarkeit, Wachstum und pH-Wert eine optimale Reproduzierbarkeit des biologischen Experiments, was für eine reproduzierbare Microarray-Analyse unabdingbar ist (siehe 1.4.2, „Design des Experiments“).

Die Fermentationen sowie die Messung verschiedener Parameter (Glukosekonzentration, Acetatkonzentration, Biotrockenmasse sowie photometrische Biomasse-Bestimmung, Ammoniumkonzentration, CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Konzentration (Abgasanalyse), pH-Wert sowie Nukleotidbestimmungen), welche dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden von Timo Hardiman und Kollegen am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT) der Universität Stuttgart durchgeführt (Keller 2005). Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst wurde eine Vorkulturreihe des Bakteriums *Escherichia coli* K12 W3110 angelegt, welche zur Überimpfung des zuvor vorbereiteten und sterilisierten Bioreaktors verwendet wurde. Dazu wurden Kolonien auf einer LB-Agar Platte per 3-Strich Methode vereinzelt und im 50 ml Schüttelkolben (37°C, 24 h, 300 rpm) inkubiert (Medium siehe Tab. 2.6). Hieraus wurde eine weitere Vorkultur im 500 ml Schüttelkolben angeimpft und für weitere 14 h (37°C, 300 rpm) inkubiert. Details für die Vorgehensweise bei der Anlage von Kulturen sind Isaac und Jennings (1996) zu entnehmen (Isaac und Jennings 1996).

Die Fermentationen wurden in einem 30 L Bioreaktor durchgeführt. An eine anfängliche Batch-Phase schloss sich die eigentliche Fed-Batch-Fermentation an. Das Umschalten erfolgte, als die Glukosekonzentration unter 0,05 g/L gesunken war. Prozessparameter sind Tab. 2.5 zu entnehmen:

## 2. Material und Methoden

**Tab. 2.5: Prozessparameter der drei Fed-Batch-Fermentationen. Quelle: (Keller 2005)**

$V_R^0$ : Reaktionsvolumen bei Start des Batch,

$c_S^0$ : Glucosekonzentration bei Start des Batch,

$c_X^0$ : Biomassekonzentration bei Start des Batch,

$V_R^{Start}$ : Reaktionsvolumen beim Start des Fed-Batch,

$c_S^{Zulauf}$ : Glucosekonzentration im Zulauf,

$c_S^{Start}$ : Glucosekonzentration im Bioreaktor beim Start des Fed-Batch,

$c_X^{Start}$ : Biomassekonzentration beim Start des Fed-Batch,

$c_S^{Ende}$ : Glucosekonzentration im Bioreaktor beim Ende des Fed-Batch und

$c_X^{Ende}$ : Biomassekonzentration beim Ende des Fed-Batch

Parameter Batch	Fermentation 1	Fermentation 2	Fermentation 3
$V_R^0$ [L]	17,68	17,12	17,00
$c_S^0$ [g/L]	7,95	8,37	8,0
$c_X^0$ [mg/L]	22	47	6
Parameter Fed-Batch	Fermentation 1	Fermentation 2	Fermentation 3
$V_R^{Start}$ [L]	17,6	16,87	16,6
Zulauftrate [L/h]	0,396	0,267	0,294
$c_S^{Zulauf}$ [g/L]	170	190	198
$c_S^{Start}$ [g/L]	0,02	0,02	0,1
$c_X^{Start}$ [g/L]	4,79	4,35	4,8
$c_S^{Ende}$ [g/L]	<0,04	<0,04	<0,01
$c_X^{Ende}$ [g/L]	13,62	14,61	13,7

Der Fed-Batch-Prozess wurde unter Zuhilfenahme eines am IBVT entwickelten Steuerprogramms (Programm „Fed batch control tower“) mit konstanter Feed Rate (Pirt, 1974) realisiert. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde durch Regelung der Rührerdrehzahl über dem unteren Limit von 50% Sättigung gehalten. Bei der Fermentation wurden Temperatur (37°C), Druck (1,5 bar) und pH-Wert (pH 7) durch Regelung konstant gehalten, die Schaumbildung wurde bei Bedarf durch Zugabe von Polyethylenglycol (PEG 2000) unterbunden. Um eine optimale Kontrolle über die Nährstoffverfügbarkeit im Medium zu erhalten, wurde ein definiertes Minimalmedium verwendet. Zur vereinfachten Herstellung des Mediums und des Zulaufs wurden zunächst Stammlösungen hergestellt (Tab. 2.6), die für die Herstellung des Minimalmediums für Vorkulturen und den Batch-Ansatz verwendet wurden (Tab. 2.7). Das Feed-Medium wurde entsprechend Tab. 2.8 hergestellt.

**Tab. 2.6: Stammlösungen für das definierte Minimalmedium.** Angegeben sind die Konzentrationen der Stammlösungen sowie die Endkonzentrationen (ohne Kristallwasser) im Bioreaktor (Batch) und Feed. Quelle:(Keller 2005)

Stammlösung	Komponente	Konzentration [g/L]	Endkonzentration Im Batch/Feed [g/L]	Bemerkungen
10x Mineralsalz-Lösung	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	20	0,88/-	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26,8	2,68/-	
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	10	1/-	
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	146	14,6/-	
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	40,2	3,92/-	
500x $\text{CaCl}_2$ (150 mM)	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	22,05	0,034/1,11	
500x $\text{MgSO}_4$ (1 M)	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	246,48	0,241/3,85	
1000 x Thiamin	Vitamin B1-Hydrochlorid	10	0,01/-	steril filtriert mit 0,2 $\mu\text{m}$ Sterilfilter
100 x Thiamin	Vitamin B1-Hydrochlorid	20	-/0,2	steril filtriert mit 0,2 $\mu\text{m}$ Sterilfilter
20% Glukose	Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	220	8/-	
40% Glukose	Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	440	-/200	
Spurenelemente-Lösung	$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	16,7	0,033/0,44	
	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	20,1	0,060/0,80	
	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,18	0,0003/0,004	
	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,1	0,0003/0,004	
	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,16	0,0003/0,004	
	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,18	0,0003/0,004	
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - Stammlösung	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		-/63,36	Mit $\text{H}_3\text{PO}_4$ auf pH 4,7 eingestellt

## 2. Material und Methoden

---

**Tab. 2.7: Zusammensetzung des Minimalmediums für die Vorkulturen.** Angegeben ist der entsprechende Volumenanteil der jeweiligen Stammlösung am Gesamtvolumen sowie die Endkonzentration des Vorkulturmediums. Quelle: (Keller 2005)

Stammlösung	Volumenanteil [mL/L]	Endkonzentration [g/L]
10 x Mineralsalz	100	
500 x CaCl <sub>2</sub>	2	0,034
500 x MgSO <sub>4</sub>	2	0,241
Spurenelemente-Lösung	3	
20% Glukose	23,5	4,7
1000 x Thiamin	1	0,01

**Tab. 2.8: Zusammensetzung des Feed-Mediums.** Angegeben ist der entsprechende Volumenanteil der jeweiligen Stammlösung am Gesamtvolumen sowie die Endkonzentration des Feed-Mediums. Quelle:(Keller 2005)

Stammlösung	Volumenanteil [mL/L]	Endkonzentration [g/L]
40% Glukose	500	200
Spurenelemente-Lösung	40	
500x CaCl <sub>2</sub>	66,67	1,11
500x MgSO <sub>4</sub>	31,97	3,85
Thiamin 100 x sterilfiltriert	10	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Stammlösung		63,36

Die Glukosekonzentration wurde zum einen enzymatisch, zum anderen über eine Online-Messsonde erfasst, die Acetatkonzentration wurde enzymatisch nachgewiesen. Zur Messung der Ammoniumkonzentration wurde ein chemischer Test herangezogen. Die Biomassekonzentration wurde während der Fermentation über die optische Dichte sowie eine Trockengewichtsbestimmung analysiert. Der Gasanteil von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Bioreaktorabluft wurde durch eine Abgasanalyse kontinuierlich online gemessen. Die Sauerstoffbestimmung erfolgte mit einer elektrochemischen Zelle, die Kohlendioxidkonzentration wurde aufgrund von Strahlungsabsorptionsänderungen und damit verbundener detektierbarer Druckänderungen über Strahlungsabsorption im Infrarot-Bereich bestimmt. Die Konzentrationen der Nukleotide AMP, ADP, ATP, GDP, GTP, ppGpp sowie cAMP wurden mittels HPLC-Analyse bestimmt. Die Bestimmung der cAMP Konzentration erfolgte über die Konzentrationsmessungen der äußeren sowie der inneren Konzentrationen, die übrigen Nukleotide konnten im extrazellulären Raum nicht nachgewiesen werden (Keller 2005). Details zu den Messverfahren sind der Diplomarbeit von Markus Keller, angefertigt am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart zu entnehmen (Keller 2005).

### 2.2.3 Zellernte

Während der Fermentationen wurden für die RNA-Isolierung zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Eine Zellsuspension entsprechend eines  $OD_{600}$ -Äquivalents von 15 wurde eins zu drei mit „RNA protect Bacteria Reagent“ von Qiagen versetzt, um die Degradation der RNA zu verhindern. „RNA protect Bacteria Reagent“ dringt schnell in die Zellen ein und stabilisiert die zelluläre RNA *in situ*. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 3220 g). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur RNA-Isolierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.2.4 RNA-Isolierung und Qualitätskontrolle

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Midi Kits“ nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen). Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht auf der Kombination von RNA-Bindung (an eine Silika-basierte Membran) und geeigneter Zentrifugationsgeschwindigkeit. Ein spezieller Hochsalzpuffer erlaubt die Bindung von bis zu einem Milligramm RNA mit einer Länge  $> 200$  Basen an die Membran. Die Lyse und Homogenisierung der Bakterienzellen erfolgt unter Anwesenheit von hoch denaturierendem Guanidinisothiocyanat, welches RNAsen inaktiviert und eine erfolgreiche Aufreinigung garantiert. Ein DNA-Verdau wurde auf der Säule mit dem „RNase freien DNase Kit“ von Qiagen durchgeführt, um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen. Die Elution erfolgte mit  $500\ \mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser. Hiervon wurden  $10\ \mu\text{L}$  für die Qualitätskontrolle (s.u.) zurückgehalten, die übrige RNA-Lösung wurde durch Fällung und Resuspension aufkonzentriert (siehe 2.2.5, „RNA-Fällung“). Somit konnte die erforderliche RNA-Konzentration zum Einsatz für die Reverse Transkription erreicht werden. Die Qualität der RNA wurde photometrisch, durch eine Formaldehyd-Gelelektrophorese sowie mit dem Agilent Bioanalyser 2100 (RNA 6000 Nano LabChip Kit) kontrolliert.

Die photometrische Bestimmung erfolgte mit dem NanoDrop, einem Photometer, das zur Erstellung eines Nukleinsäure-Spektrums zwischen  $220,6$  und  $453,1\ \text{nm}$  lediglich  $1,5\ \mu\text{L}$  RNA-Probe benötigt. Die zugehörige Software (ND-1000 V3.1.2) erstellt eine Tabelle für den gemessenen Bereich und berechnet das Absorptionsverhältnis von  $260\ \text{nm}/280\ \text{nm}$  sowie das Absorptionsverhältnis von  $260\ \text{nm}/230\ \text{nm}$ . Das Absorptionsverhältnis  $260\ \text{nm}/280\ \text{nm}$  sollte zwischen  $1,8$  und  $2,0$  liegen. Es lässt Rückschlüsse auf Proteinkontaminationen ( $< 1,8$ ) zu. Das Absorptionsverhältnis  $260\ \text{nm}/230\ \text{nm}$  sollte über  $1,8$  liegen und zeigt Verunreinigungen mit Lösungsmitteln, Salzen sowie Proteinen an (Sambrook et al. 1989).

Die Formaldehyd-Gelelektrophorese stellt eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld dar. Abbauprodukte sowie DNA-Kontaminationen der RNA können mit Hilfe von UV-Licht detektiert werden. Die

## 2. Material und Methoden

---

Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgt durch Zugabe von Ethidiumbromid in die Gellösung. Dieses interkaliert in den Nukleinsäuren und lässt sich mit UV-Licht zur Fluoreszenz anregen. Qualitativ hochwertige bakterielle RNA weist eine scharfe 16S ribosomale Bande mit einer Größe von 1,5 kb sowie eine scharfe 23S ribosomale Bande mit einer Größe von 2,9 kb auf. Ein Schmier und unscharfe Banden weisen auf eine mögliche Degradation während der Aufreinigung hin (Sambrook et al. 1989).

Für ein Formaldehyd-Gel (Tab. 2.9) wurde Agarose (1,2% w/v) in 1 x FA Gelpuffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf etwa 55°C 40 mL 1,2%ige Formaldehyd-Gellösung mit etwa 3 µL Ethidiumbromid-Stocklösung (0,5 µg/L) sowie 720 µL Formaldehyd versetzt, in ein Flachbett mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen und erstarren gelassen. Daraufhin wurde das Gel im Flachbett in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1 x FA Gel-Laufpuffer überschichtet und eine halbe Stunde equilibriert. Die Proben, eins zu zwei mit 2 x Loading Dye Solution (mit dem Längenstandard mitgeliefert) versetzt, wurden aufgegeben und die Elektrophorese bei 120 V gestartet. Als Längenstandard diente RNA ladder, High Range (200-6000 Basen; Fermentas). Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaubande des Markers sowie des Probenpuffers das Gel zu ca.  $\frac{3}{4}$  durchlaufen hatte.

**Tab. 2.9: Zusammensetzung des Formaldehyd-Gels für die Elektrophorese**

<b>1,2% Formaldehyd-Gellösung</b>	
Agarose	1,2 g
10 x FA Gelpuffer	10 mL
RNase freies Wasser	ad 100 mL
<b>10 x FA Gelpuffer</b>	
MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM
mit NaOH auf pH 7 eingestellt	
<b>1 x FA Gel-Laufpuffer</b>	
10 x FA Gelpuffer	100 mL
Formaldehyd (37%)	20 mL
RNase freies Wasser	880 mL

Die Herstellung RNase-freien Wassers (Tab. 2.10) erfolgte durch Zugabe von DEPC zu ddH<sub>2</sub>O. Dieses wurde daraufhin geschüttelt, über Nacht bei 38°C inkubiert und autoklaviert.

Tab. 2.10: RNase freies Wasser

RNase freies Wasser	
H <sub>2</sub> O	1 L
Diethyl - Pyrocarbonat (DEPC)	1 mL

Die Analyse mit dem Agilent Bioanalyzer stellt ebenfalls eine elektrophoretische Analyse dar. Hierbei wird nur eine geringe Probenmenge (1 µL) benötigt. Diese wird kapillarelektrophoretisch in einem speziellen Chip aufgetrennt (Mueller et al. 2000; Ogura et al. 1998). Zwölf Proben können bei diesem Verfahren gleichzeitig analysiert werden. Zusätzlich zu den Proben werden eine Gelmatrix mit einem fluoreszierenden Farbstoff, der in die RNA interkaliert, und ein interner Standard (Nukleinsäure bekannter Größe) sowie ein Längenstandard (RNA 6000 ladder von Ambion) aufgegeben. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Man erhält ein Elektropherogramm der RNA sowie Konzentrationswerte für rRNAs, Gesamt-RNA sowie ein daraus generiertes virtuelles Gelbild.

Die RNA wurde für Experimente eingesetzt, wenn sie nicht degradiert war und ein 260 nm/280 nm Absorptionsverhältnis zwischen 1,8 und 2 sowie ein 260 nm/230 nm Verhältnis von über 1,8 aufwies.

### 2.2.5 RNA-Fällung

Die Reverse Transkription zur Erzeugung der benötigten Mengen an fluoreszenzmarkierter cDNA (etwa 30 µg) für die Microarray-Hybridisierung erfordert eine Konzentration der eingesetzten RNA von etwa 6 µg/µL. Um diese zu erreichen, wurde die RNA über eine Ethanol-Salz-Präzipitation gefällt. 1/10 Volumen Kochsalzlösung (3 M) sowie zwei Volumen Ethanol (100%) wurden zu der mittels RNeasy Midi Kit (Qiagen) aufgereinigten RNA-Probe gegeben und über Nacht bei -20°C gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde die Probe bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm; 20800 g) für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das milchig durchsichtige Pellet wurde mit 500 µL Ethanol (70%) gewaschen (gevortext und abermals bei maximaler Geschwindigkeit für sieben Minuten zentrifugiert). Nachdem der Überstand erneut verworfen worden war, wurde das RNA-Pellet in der Speed Vac einige Minuten getrocknet und daraufhin mit RNase-freiem Wasser eine Konzentration von etwa 6 µg/µL eingestellt. Die Konzentration der RNA wurde am Nanodrop gemessen und etwa 100 µg RNA wurden für die Reverse Transkription eingesetzt.

### 2.2.6 Reverse Transkription

Die aufkonzentrierte RNA wurde mit der Reversen Transkriptase „Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase“ (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Im Zuge dessen wurden fluoreszenzmarkierte Nukleotide (Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP, Amersham) direkt in die entstehende cDNA eingebaut. Eine Probe jedes Zeitpunkts wurde einmal mit Cy3-dCTP und einmal mit Cy5-dCTP markiert. Die verschieden markierten Proben gleichen RNA-Ursprungs wurden für Dye-Swap Experimente eingesetzt (zur Erklärung des Dye-Swap Experiments siehe Kapitel 1.4 “Die Microarray-Technologie“).

Die Reverse Transkription wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst wurden 3 µL Hexanukleotidprimer (6N; N: A, T, G oder C) zu 16,5 µL Gesamt-RNA (~100 µg) gegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. Hierbei wurden die Sekundärstrukturen der RNA für eine Interaktion mit dem Primer aufgelöst. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur sowie 2 min auf Eis. Dies erlaubte die Assoziation der Primer mit der RNA. Nun wurde der Reaktionsansatz (Tab. 2.11) pipettiert und die Reaktion bei 42°C für zwei Stunden im Heizblock durchgeführt. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Natronlauge (10 µL) und Inkubation bei 65°C für 10 min gestoppt und mit 1 M Salzsäure (10 µL) neutralisiert. Diese Schritte bewirkten die Degradation der RNA. Die so gewonnene cDNA wurde in 1 x TE-Puffer (200 µL) aufgenommen und mittels des „PCR Purification Kits“ (Qiagen) von Enzymen, Salzen und nicht inkorporierten Nukleotiden gereinigt. Nun wurde die Konzentration der cDNA bestimmt. Gleiche Mengen Cy3-dCTP und Cy5-dCTP markierter cDNA wurden entsprechend dem experimentellen Design vereint und in der Speed Vac (Eppendorf) bei 30°C solange eingedampft, bis sie fast trocken waren. Nun wurden sie in 65 µL auf 42°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer (MWG) aufgenommen und bis zur Hybridisierung maximal eine Stunde auf Eis bzw. längstens zwei Tage bei -20°C gelagert.



**Tab. 2.11: Reverse Transkription.** Pipettierschema für die Reverse Transkription zur Erzeugung fluoreszenzmarkierter cDNA für ein Microarray Experiment

<b>Reaktionsansatz für die Reverse Transkription</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Eingesetztes Volumen [<math>\mu</math>L]</b>
5x RT reaction buffer (Superscript II Kit, Invitrogen)	8
dNTP Mastermix (siehe Tab. 2.12)	4
Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP (1 mM)	4
0,1 M DTT (Superscript II Kit, Invitrogen)	4
Superscript II (200 U, Invitrogen)	1,5

**Tab. 2.12: dNTP-Mastermix.** Zusammensetzung des dNTP-Mastermixes zum Einsatz für die Reverse Transkription

<b>dNTP Mastermix</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Eingesetztes Volumen [<math>\mu</math>L]</b>
dATP (100 mM)	5
dTTP (100 mM)	5
dGTP (100 mM)	5
dCTP (100 mM)	2
RNase-freies Wasser	ad 100

### 2.2.7 Hybridisierung

Für die Hybridisierung, die in der vollautomatischen Hybridisierungsstation HS400 (Tecan) durchgeführt wurde, mussten die Cy-Dye markierten cDNA-Proben zunächst aufgeköcht werden (3 min, 95°C). Folgendes Verlaufsprotokoll wurde für die Hybridisierung erstellt (Puffer sind Tab. 2.13- Tab. 2.16 zu entnehmen):

Verlaufsprotokoll:

1. Waschen: 42°C, ein mal, Waschzeit: 30 sec, Haltezeit: 30 sec, 6 x SSPE
2. Probenaufgabe: 42°C
3. Hybridisierung: 42°C, Schüttelfrequenz: medium, Dauer: 12 h
4. Waschen: 23°C, zweimal, Waschzeit: 1 min, Haltezeit: 30 sec, Waschpuffer1
5. Waschen: 23°C, zwei Mal, Waschzeit: 1 min, Haltezeit: 30 sec, Waschpuffer2
6. Trocknen: 30°C, Dauer: 2 min, Stickstoff

## 2. Material und Methoden

**Tab. 2.13: 20 xSSPE Stocklösung.** Vorbenetzung der Microarrays in der Hybridisierungsstation HS400 (Tecan); verwendet wurde eine 6 x SSPE Lösung

<b>20 x SSPE (Stocklösung)</b>	
NaCl	175,3 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	27,6 g
Na <sub>2</sub> EDTA	7,4 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1L
Mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt	

**Tab. 2.14: 1 x SSC Stocklösung**

<b>1 x SSC (Stocklösung)</b>	
NaCl	8,8 g
Natriumcitrat	4,4 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1L

**Tab. 2.15: Waschpuffer 1.** Für den ersten automatischen Waschschrift der Hybridisierungsstation (HS400; Tecan) verwendeter Puffer.

<b>Waschpuffer 1</b>	
NaCl	17,6 g
Natriumcitrat	8,8 g
SDS	1 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1L

**Tab. 2.16: Waschpuffer 2.** Für den zweiten automatischen Waschschrift der Hybridisierungsstation (HS400; Tecan) verwendeter Puffer.

<b>Waschpuffer 2</b>	
1 x SSC	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad 1L

### 2.2.8 Scannen der Arrays

Die fertig getrockneten, hybridisierten Microarrays wurden aus der Hybridisierungsstation entnommen und bis zum Einscannen, das zeitnah folgte, trocken und dunkel aufbewahrt. Die Microarrays wurden mit dem ScanArray Express Microarray Scanner (PerkinElmer) mit einer Auflösung von fünf Mikrometer und einer PMT Einstellung von 70 eingescannt. Die Bilder

beider Kanäle (Cy3, Anregungswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm und Cy5, Anregungswellenlänge: 649 nm, Emissionswellenlänge: 670 nm) wurden direkt hintereinander erzeugt und als 16 bit Tiff-Dateien abgespeichert.

### 2.2.9 Datenextraktion und Bildanalyse

Die mit dem „ScanArray Express Microarray Scanner“ (PerkinElmer) erzeugten 16 bit Tiff-Dateien konnten mit Hilfe der dazugehörigen Bildanalysesoftware (ScanArray Express, Microarray analysis system, Version 3.0.0.0016, PerkinElmer) in Rohdaten umgewandelt werden. Hierbei wurde entsprechend des Designs beim Drucken (2 x 16 Nadeln druckten 32 x 16 x 18 DNA-Punkte; siehe 2.2.1, „Herstellung gesamtgenomischer *E. coli* K12 Microarrays“) ein Netz über die Punkte gelegt. Automatisch wurden die Punkte den Signalen zugeordnet und manuell, falls nötig, nochmals korrigiert. Automatisch wiederum wurden daraufhin Intensitätswerte berechnet und tabellarisch ausgegeben. Dabei wurden Vorder- und Hintergrundwerte (Mean, Median und Mode), die Qualität der Spots sowie weitere Parameter aufgelistet. Folgende Software Einstellungen wurden verwendet: „Quantitation Method: Adaptive Treshold“, „Normalization Method: Total“. Um die Zuordnung der Gene zu den einzelnen DNA-Punkten gewährleisten zu können, wurde die Information über ein Gal-File eingelesen. Das Gal-File wurde mit Hilfe der Software TAS Application Suite V. 2.6.0.2 (Genomic Solutions) erzeugt.

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Microarray-Daten wurde mit der Software R durchgeführt (R Development Core Team 2005). R ist eine Plattform, um statistische Analysen durchzuführen und Grafiken anzufertigen. R ähnelt S, einer Plattform, die von John Chambers und Kollegen an den Bell Laboratorien (ehemals AT & T, jetzt Lucent Technologies) entwickelt wurde, und stellt eine Vielzahl statistischer (lineare und nichtlineare Modellierung, klassischer statistischer Tests, Zeitverlauf-Analysen, Klassifizierungen und Clusteranalysen) sowie graphischer Techniken zur Verfügung. R ist als Open Source Software unter <http://www.r-project.org/> erhältlich.

Diese Software dient als Umgebung für das Microarray-Analyse Paket limma, statmod und sma von Gordon Smyth (Smyth 2005), die speziell für Expressionsanalysen ausgelegt sind. Die genannten Software-Pakete sind unter <http://www.bioconductor.org/> frei erhältlich. Limma ermöglicht das Verwenden linearer Modelle für die Analyse entworfener Experimente sowie die Suche nach differentiell exprimierten Genen. Empirische Bayes'sche Methoden werden verwendet, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, selbst wenn die Anzahl der

## 2. Material und Methoden

---

Microarrays gering ist. Funktionen zur Normalisierung sowie zur Datenanalyse sind sowohl für Einkanal- als auch für Zweikanal-Microarrays ausgelegt.

Zunächst wurden die Daten des jeweiligen Experimentes eingelesen und print-tip-loess normalisiert. Spots, die über das Bildanalyseprogramm „Scan Array Express“ (Version 3.0) als nicht erkannt markiert waren, wurden in der Auswertung auf 10% herabgewichtet. Nun konnte ein Test zur Suche nach differentiell exprimierten Genen durchgeführt werden. Das multiple Hypothesen-Testen (siehe 1.5, „Datenprozessierung und statistische Auswertung von Microarray-Experimenten“) wurde über die „False Discovery Rate“ (fdr) kontrolliert. Die Gene wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  „als signifikant differentiell exprimiert“ angesehen, wenn der fdr-angepasste p-Wert  $< 0,05$  war.

Die Reproduzierbarkeit der Dye-Swap Experimente sowie der biologischen Replikate wurde über den Pearsonschen Korrelationskoeffizienten bestimmt. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient wird berechnet, indem die Kovarianz der beiden Datenserien durch das Produkt der Standardabweichung jeder Serie geteilt wird (Gleichung 2.3):

$$r = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left[ \frac{X_i - \bar{X}}{\sigma_x} \right] \left[ \frac{Y_i - \bar{Y}}{\sigma_y} \right] \quad \text{Gleichung 2.3}$$

r: Pearsonscher Korrelationskoeffizient

N: Gesamtzahl der untersuchten Gene

X, Y: gemessene Werte der betrachteten Gene in den beiden Datenserien

$X_i, Y_i$ : Mittelwerte von X und Y

$\sigma_x$ : empirische Standardabweichung der Datenserie X

$\sigma_y$ : empirische Standardabweichung der Datenserie Y

### 2.2.11 Regulator-Analyse

Sigma-Faktoren und regulatorische Proteine (Aktivatoren sowie Repressoren) werden kurzfristig selten auf Ebene der Transkription reguliert, da die Proteinneusynthese oft zu lange dauert, um auf Umweltbedingungen adäquat antworten zu können. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine indirekte Regulator- und Sigma-Faktor-Analyse durchgeführt. Als Grundlage diente eine Datenbanksuche in der frei zugänglichen Datenbank EcoCyc (<http://EcoCyc.org/>). Die EcoCyc Datenbank stellt einen zusammenfassenden Überblick über die Biologie des Modell-Organismus *Escherichia coli* K12 zur Verfügung (Keseler et al. 2005). Die in der vorliegenden Arbeit als „differentiell exprimiert identifizierten“ Gene wurden hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu den Operonen geordnet und die Regulatoren, die die

differentiell exprimierten Gene regulieren, wurden nach folgenden Kriterien als „aktiv bzw. nicht aktiv“ angesehen:

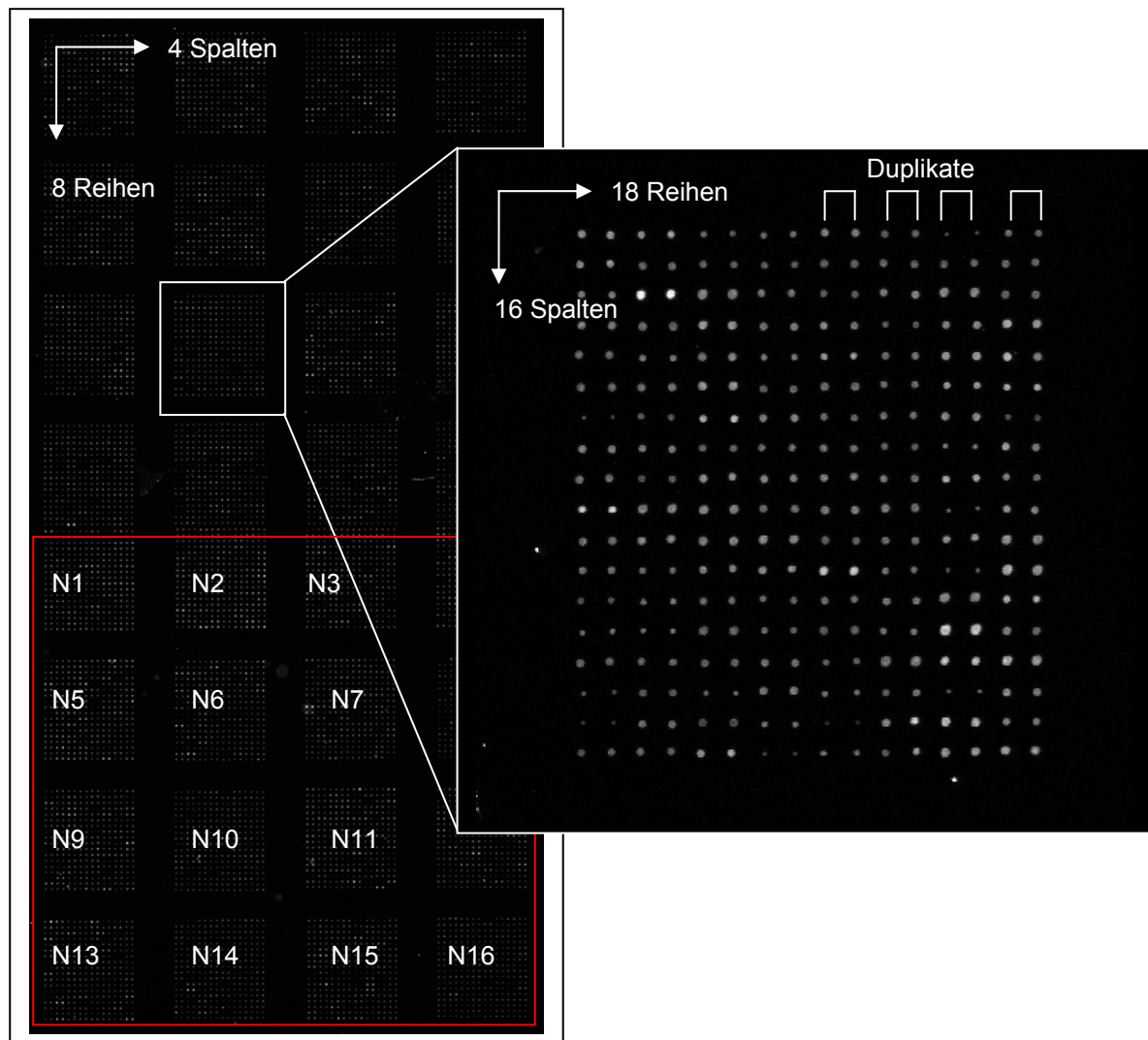
1. Voraussetzung war, dass mindestens 50% der Gene des betroffenen Operons als „differentiell exprimiert“ gefunden wurden.
2. Richtig regulierte Gene: War Kriterium 1 erfüllt, so wurden Aktivatoren für Gene, die hochreguliert gefunden wurden als „aktiv“ deklariert genauso wie Repressoren für Gene, die als herunterreguliert gefunden wurden, wenn die Anzahl der richtig regulierten Gene die Anzahl der falsch regulierten Gene (siehe Kriterium 3) überstieg oder nach Literaturangaben davon ausgegangen werden konnte, dass der betrachtete Regulator unter den gegebenen experimentellen Bedingungen potentiell eine regulatorische Aktivität aufweisen kann. Der Vergleich wurde für den gesamten Zeitverlauf betrachtet.
3. Falsch regulierte Gene: Aktivatoren für Gene, die herunterreguliert gefunden wurden, wurden als nicht aktiv deklariert genauso wie Repressoren für Gene, die hochreguliert gefunden wurden. Der Vergleich wurde für den gesamten Zeitverlauf betrachtet.

## 3 Ergebnisse

Die physiologische Antwort von *E. coli* K12 (W3110) auf einen Kohlenhydrat-Mangel wurde in der vorliegenden Arbeit gesamtgenomisch auf Transkriptomebene analysiert. Mittels einer gekoppelten Batch-/Fed-Batch-Fermentationsstrategie sollten eine Glukose-Limitierung bei *E. coli* ausgelöst werden und zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation Analysen des Transkriptoms mit Hilfe von gesamtgenomischen Microarrays durchgeführt werden. Hierfür wurden dem Bioreaktor zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Aus den Zellproben wurde die Gesamt-RNA isoliert sowie revers in cDNA transkribiert. Während dieses Schrittes wurden fluoreszenzmarkierte dCTP-Nukleotide in die cDNA eingebaut. Diese cDNA Proben wurden auf selbst hergestellten gesamtgenomischen Microarrays hybridisiert. Die prozessierten Microarrays wurden zur Detektion der Fluoreszenzsignale eingescannt und dabei 16 bit Tiff-Bilddateien erzeugt (siehe 2.2.9 „Datenextraktion und Bildanalyse“). Diese dienten der Berechnung von Rohdaten mit einem Bildanalyseprogramm. Die dabei erzeugten Daten wurden statistisch ausgewertet (siehe 2.2.10 „Statistische Auswertung“). Differentiell exprimierte Gene wurden ihrer physiologischen Funktion entsprechend gruppiert und bezüglich ihrer Regulation untersucht. Dabei wurden regulatorische Proteine ( $\sigma$ -Faktoren sowie Aktivatoren und Repressoren) über eine Datenbanksuche (EcoCyc: <http://EcoCyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)) indirekt zugeordnet (siehe 2.2.11 „Regulator-Analyse“).

### 3.1 Herstellung gesamtgenomischer *E. coli* K12 Microarrays

Fünf Chargen à 24 Microarrays wurden gedruckt. Ein Microarray jeder Charge wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff „SYBR Safe™ DNA Gel Stain“ (MolecularProbes) angefärbt und eingescannt, um das Druckergebnis zu visualisieren. Die Stichproben der fünf Chargen wurden über eine Bildanalyse auf das Vorhandensein aller Spots hin untersucht. Für alle Spots auf den untersuchten Microarrays konnten Signale nachgewiesen werden. Die bedruckten Microarrays wurden dementsprechend für die Microarray-Analyse eingesetzt. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch einen eingescannten Microarray. Die Sonden sind auf 32 Subarrays verteilt. Diese sind in vier Spalten mal acht Reihen angeordnet. Ein Subarray entspricht dem Bereich, welcher von einer einzelnen Nadel gedruckt wurde. Ein Subarray, bestehend aus 16 x 18 Spots, ist vergrößert dargestellt. Zu erkennen ist, dass alle Spots abgesetzt wurden.



**Abb. 3.1: Qualitätskontrolle.** Gesamtgenomischer *E. coli* K12 Microarray (4608 Sonden, gedruckt mit 16 Nadeln als Duplikate, entspricht 9216 Spots; „Grid“: 4 Reihen, 4 Spalten; „Subgrid“: 18 Reihen, 16 Spalten) angefärbt mit SybrGreen. Zwei Grids sind dargestellt. Eingescannt: Cy3 - Anregungswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm, 10 µm. Exemplarisch ist ein Grid (entspricht den Spots, die von einer Nadel gedruckt wurden) hervorgehoben. Der Bereich, der von 16 Nadeln gedruckt wurde, ist im unteren Bereich der Abbildung umrahmt. N: Nadel

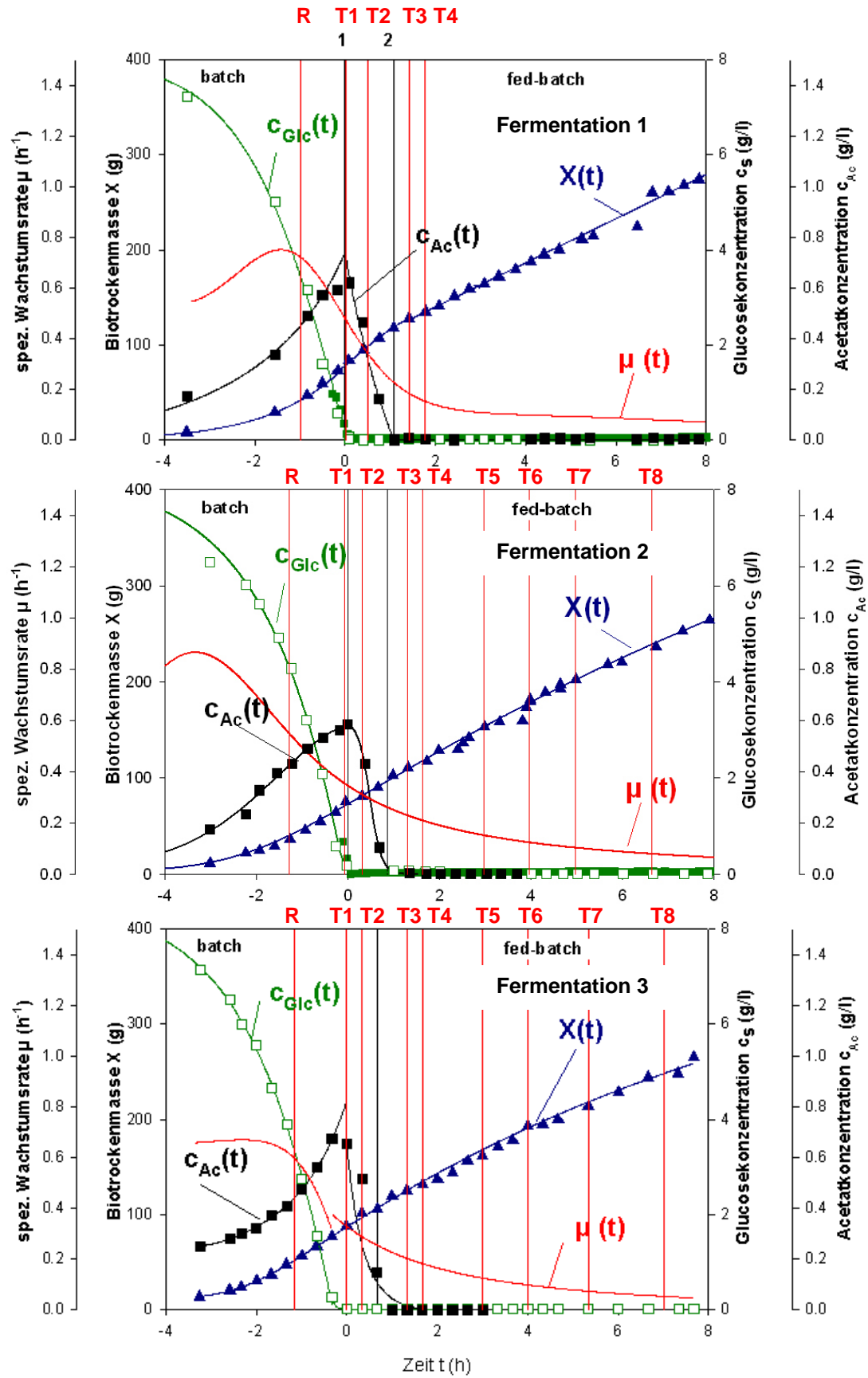
## **3.2 Experimentelles Design**

### 3.2.1 Probengenerierung für die Microarray-Analyse

#### **3.2.1.1 Fermentationen**

Die Fermentationen wurden am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart durchgeführt und sind sehr detailliert in der Diplomarbeit von Markus Keller beschrieben (Keller 2005). Abb. 3.2 gibt einen Überblick über die drei Fermentationen, die als Grundlage der vorliegenden Studie dienten. Die Verläufe von Biotrockenmasse ( $X(t)$ ), Glukose- und Acetatkonzentrationen ( $c_{\text{Glc}}(t)$  bzw.  $c_{\text{Ac}}(t)$ ) sowie der Wachstumsrate ( $\mu(t)$ ) sind dargestellt. Bei allen drei Fermentationen wurde durch die gewählte gekoppelte Batch/Fed-Batch-Fermentationsstrategie eine Glukose-Limitierung erreicht. Im Bioreaktor erfolgte zu keinem Zeitpunkt eine Glukoseakkumulation. Durch den anfänglichen Glukose-Überschuss kam es während des exponentiellen Wachstums während der Batch-Phase zu einer Acetatausscheidung aufgrund einer NADH-neutralen Überflussreaktion der Glykolyse (Metabolic Overflow) (Xu et al. 1999b). Da Glukose unter einer Konzentration von 0,05 g/L limitierend wird, kann Acetat ab diesem Zeitpunkt als sekundäre Kohlenstoff-Quelle wieder aufgenommen und verstoffwechselt werden. Ab dem Zeitpunkt der vollständigen Wiederaufnahme des Acetats setzte die Kohlenstofflimitierung ein (in Abb. 3.2 der mit 2 markierte senkrechte schwarze Strich). Aufgrund der extrazellulären Acetatakkumulation und der daraus folgenden Inhibierung des Wachstums (Luli und Strohl 1990; Xu et al. 1999a) fiel die Wachstumsrate  $\mu$  von ihrem Maximalwert von  $0,7 \text{ h}^{-1}$  schon vor der Limitierung unter  $0,5 \text{ h}^{-1}$ . 3,8 h nach Einsetzen der Limitierung lag die Wachstumsrate  $\mu$  im Durchschnitt noch bei  $0,1 \text{ h}^{-1}$  (Keller 2005).





### 3. Ergebnisse

---

**Abb. 3.2: Fermentationen zur Analyse der Glukose-Limitierung.** Fermentiert wurde *E. coli* K12 W3110 in Glukose Minimalmedium. Bis die Glukosekonzentration unter 0,05 g/L gesunken war, erfolgte eine Batch-Fermentation, anschließend erfolgte die Fed-Batch-Fermentation mit konstanter Glukosezufütterungsrate (0,29 L/h; Konz: 200 g/L). Dargestellt sind Biotrockenmasse [g] (blau), Glukosekonzentration [g/L] (grün), spezifische Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] (rot) sowie die Acetatkonzentration [g/L] (schwarz). Der mit 1 versehene, senkrechte schwarze Strich markiert den Zeitpunkt der Glukose-Limitierung, der mit 2 versehene, senkrechte schwarze Strich markiert den Zeitpunkt des Acetatverbrauchs. Senkrechte rote Striche mit den Bezeichnungen R sowie T1 bis T8 markieren die Zeitpunkte der Probenahme für die Microarray-Analysen. Auf der X-Achse ist die Zeit bezüglich der Glukose-Limitierung aufgetragen. Modifiziert nach Keller (Keller 2005).

Die Zeitpunkte der Probenentnahme für die Microarray-Analyse sind in Abb. 3.2 mit senkrechten roten Strichen versehen. Die Probe R, die für die Microarray-Analysen als Referenz verwendet wurde, stammt aus der exponentiellen Wachstumsphase, die Probe T1 wurde zum Zeitpunkt der Glukoselimitierung (Glukosekonzentration  $< 0,05$  g/L) entnommen, die Probe T2 zwischen Acetat- und Glukoselimitierung und die Probe T3 30 min nach der vollständigen Acetat-Wiederaufnahme. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt komplett unter Kohlenhydrat-Limitierung. Die Probe T4 wurde 50 min nach der vollständigen Acetat-Wiederaufnahme entnommen. Die Proben T5 bis T7 wurden mit einstündigem Abstand und die Probe T8 mit 1,5 h Abstand zur Vorgängerprobe entnommen. Die Fermentationen dauerten insgesamt 18 Stunden. Über einen Zeitraum von neun Stunden wurden Proben für die Microarray-Analyse entnommen. Die Referenzprobe wurde etwa neun Stunden nach dem Animpfen entnommen.

#### 3.2.1.2 RNA Isolierung

Um fluoreszenzmarkierte cDNA für die Hybridisierung synthetisieren zu können, wurde zunächst die RNA aus den entnommenen Bioreaktorproben (R, T1 - T8) isoliert. Für jeden Zeitpunkt wurde Gesamt-RNA aus ca.  $7,5 \times 10^9$  Zellen (dies entsprach einer  $\text{OD}_{600}$  von etwa 15 im verwendeten Medium) isoliert. Durchschnittlich wurden Gesamt-RNA-Konzentrationen von  $388,6 \pm 127$  ng/ $\mu\text{L}$  (Wert  $\pm$  Standardabweichung s - siehe Gleichung 2.1, Kapitel 2.1.4 „Verwendete Gleichungen“) aufgereinigt. Nur Proben mit einem 260/280 nm Verhältnis größer 1,8 und einem 260/230 nm Verhältnis größer 1,8 wurden gefällt und dabei aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte RNA wurde für die Reverse Transkription eingesetzt.

### 3.2.1.3 cDNA Synthese

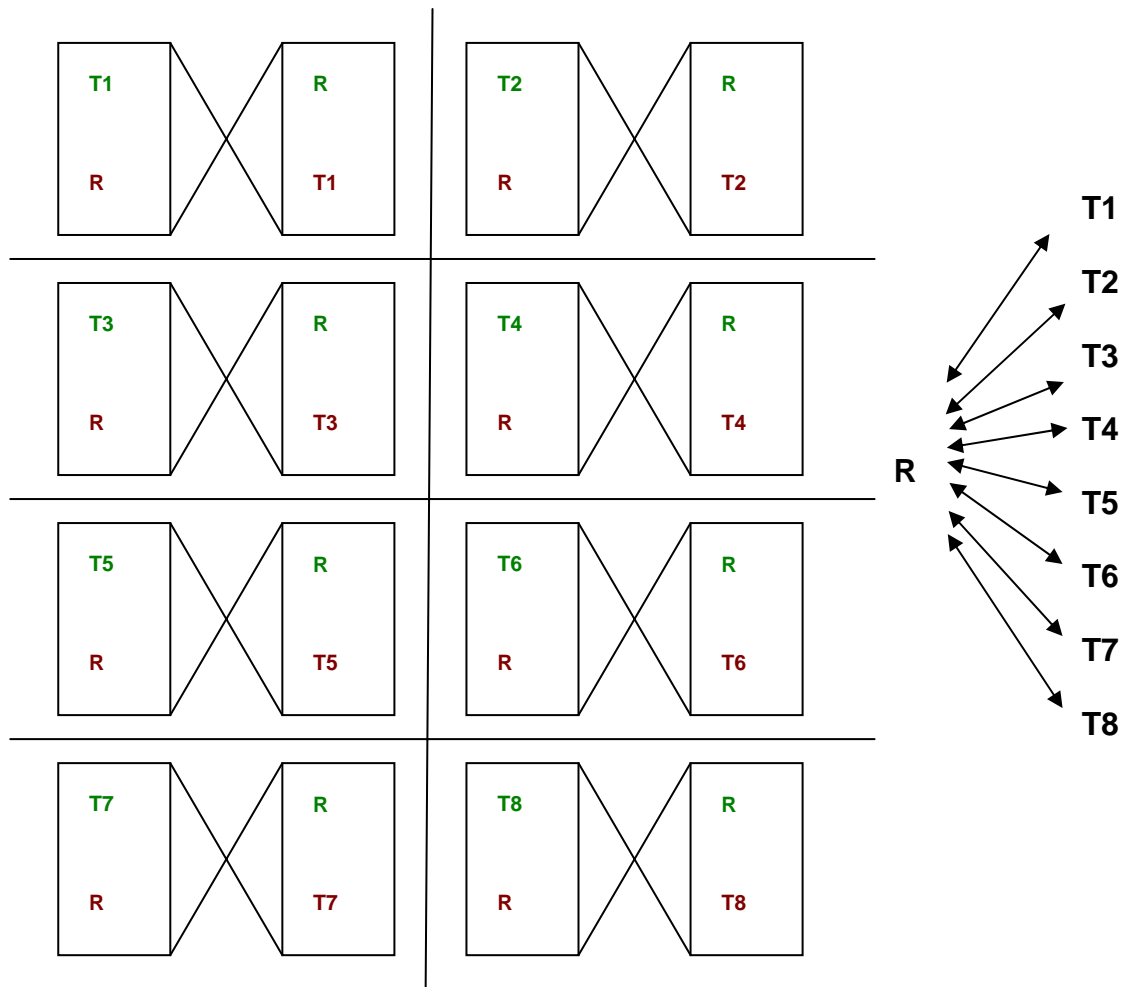
Für die Reverse Transkription und gleichzeitige Markierung der Gesamt-RNA-Proben mit fluoreszenzmarkierten dCTPs (Cy3 und Cy5) wurden etwa 100 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Durch die Reverse Transkription konnten für Fermentation 1  $130 \pm 49$  ng/µL, für Fermentation 2  $93 \pm 52$  ng/µL und für Fermentation 3  $79 \pm 42$  ng/µL cDNA synthetisiert werden (Wert  $\pm$  Standardabweichung s - siehe Gleichung 2.1, Kapitel 2.1.4 „Verwendete Gleichungen“). Im Mittel wurde ein Cy3-dCTP alle 100 Nukleotide und ein Cy5-dCTP alle 273 Nukleotide eingebaut. Auf einem Microarray wurden jeweils 30 µg cDNA hybridisiert.

### 3.2.2 Hybridisierung der Proben auf dem Microarray - Experimentelles Design

Als Methode zum Hybridisieren wurde ein so genanntes „Common Reference Design“ gewählt. Dieses Design erlaubt den direkten Vergleich des jeweils betrachteten Zeitpunkts mit der Referenz. Auf jedem Array wurde eine gemeinsame Referenzprobe (Probe R, exponentielles Wachstum) mit jeweils einem Zeitpunkt (T1-T8) hybridisiert. Die Experimente wurden als Dye-Swap Experimente (Doppelbestimmung, Farbwechsel über Kreuz) durchgeführt (siehe auch Abb. 3.3). Für die Zeitpunkte T1-T4 lagen Proben aus drei unabhängigen Fermentationen vor, für die Zeitpunkte T5-T8 hingegen lagen Proben aus zwei unabhängigen Fermentationen vor. Somit wurde jede Probe T1-T4 der Fermentation 1 auf zwei Arrays und jede Probe T1-T8 der Fermentationen 2 und 3 auf zwei Arrays hybridisiert. Insgesamt wurden folglich vier bzw. sechs Arrays mit Proben eines vergleichbaren physiologischen Zustands hybridisiert. Da jedes Gen auf jeden Array als Duplikat gedruckt wurde, erhält man bei der Auswertung unter Berücksichtigung aller biologischen Replikate für jedes Gen insgesamt zwölf Werte für die Zeitpunkte T1-T4 bzw. acht Werte für die Zeitpunkte T5-T8. Insgesamt wurden 40 Microarrays hybridisiert.

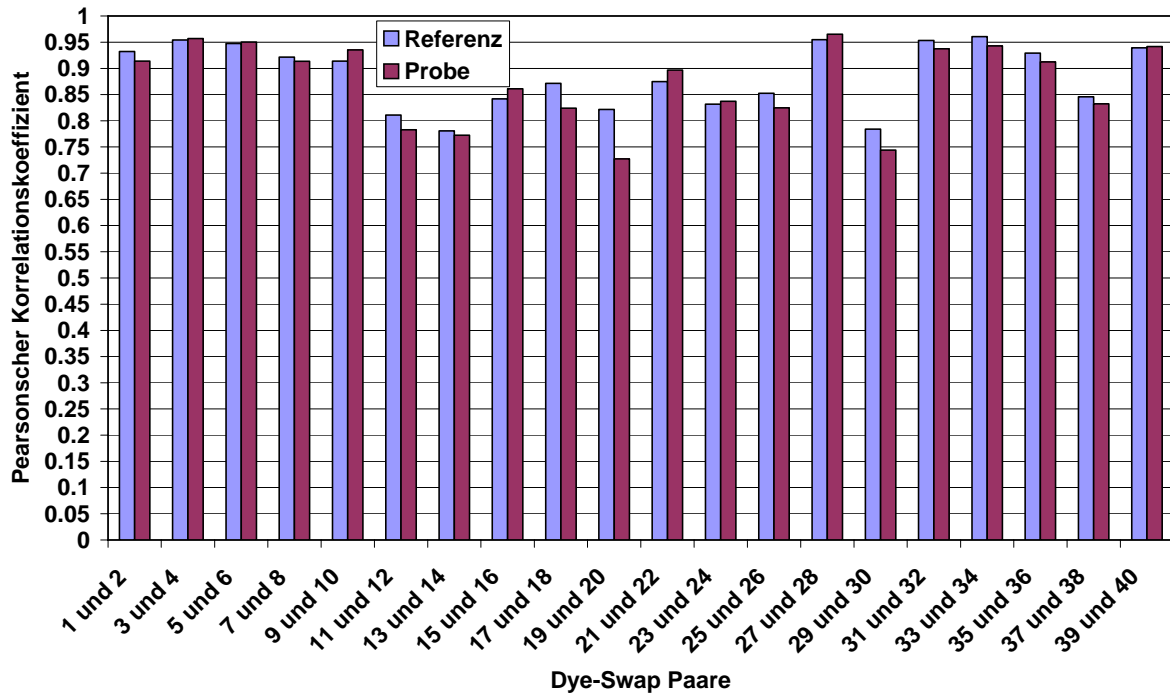
Abb. 3.3 verdeutlicht die Vorgehensweise für eine Fermentation.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.3: Experimentelles Design der Hybridisierung markierter cDNA auf den Microarrays.** Es wurde ein „Common Reference Design“ verwendet. Eine Referenzprobe R wird auf allen Arrays hybridisiert, zusätzlich wird jeweils ein Zeitpunkt (T1-T8) pro Array analysiert. Es wurden Doppelbestimmungen als Dye-Swap Experimente durchgeführt, jede Probe befindet sich also auf zwei Arrays. T1-T8: untersuchte Zeitpunkte, R: Referenzprobe; Kreuz bzw. Doppelpfeil: Dye-Swap

Die Microarrays wurden daraufhin eingescannt und die dabei erhaltenen 16 bit Tiff-Bilddateien mit dem Bildanalyse-Programm ScanArray Express ausgewertet. Unter anderem wurden die mittleren Vordergrundpixelintensitäten und die medianen Hintergrundpixelintensitäten jedes Spots für den roten sowie den grünen Kanal bestimmt. Es folgte die Normalisierung und eine statistische Analyse. Zur Analyse der Reproduzierbarkeit wurde, wie in 2.2.10 „Statistische Auswertung“ beschrieben, der Pearsonsche Korrelationskoeffizient berechnet. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient der Dye-Swap-Paare besaß für die Referenzproben Werte zwischen 0,78 und 0,96 und für die Proben der verschiedenen Zeitpunkte Werte zwischen 0,73 und 0,97 (siehe Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Pearsonscher Korrelationskoeffizient für die 20 Dye-Swap Paare.** Die Korrelationskoeffizienten für die Referenz und die Probe (untersuchter Zeitpunkt) jedes Arrays sind getrennt berechnet und dargestellt worden. Eine Korrelation von 1 zeigt 100%ige Übereinstimmung und somit optimale Reproduzierbarkeit an.

Die biologischen Replikate (Fermentationen) wurden bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit im grünen (Cy3) sowie im roten (Cy5) Kanal untersucht. Die folgenden Angaben beziehen sich auf normalisierte Werte.

Im grünen Kanal wies die Referenz (mit Werten zwischen 0,78 und 0,87 für die Reproduzierbarkeit zwischen Fermentation 1 und Fermentation 2, 0,7 bis 0,93 für die Reproduzierbarkeit zwischen Fermentation 1 und Fermentation 3 sowie 0,68 und 0,91 für die Reproduzierbarkeit zwischen Fermentation 2 und Fermentation 3) höhere Korrelationswerte auf als die untersuchten Zeitpunkte (mit Werten zwischen 0,65 und 0,87 für den Unterschied Fermentation 1 und 2, 0,66 und 0,93 für den Unterschied Fermentation 1 und 3 sowie 0,64 und 0,88 für den Unterschied Fermentation 2 und 3) (siehe auch Abb. 3.5 und Abb. 3.6).

### 3. Ergebnisse

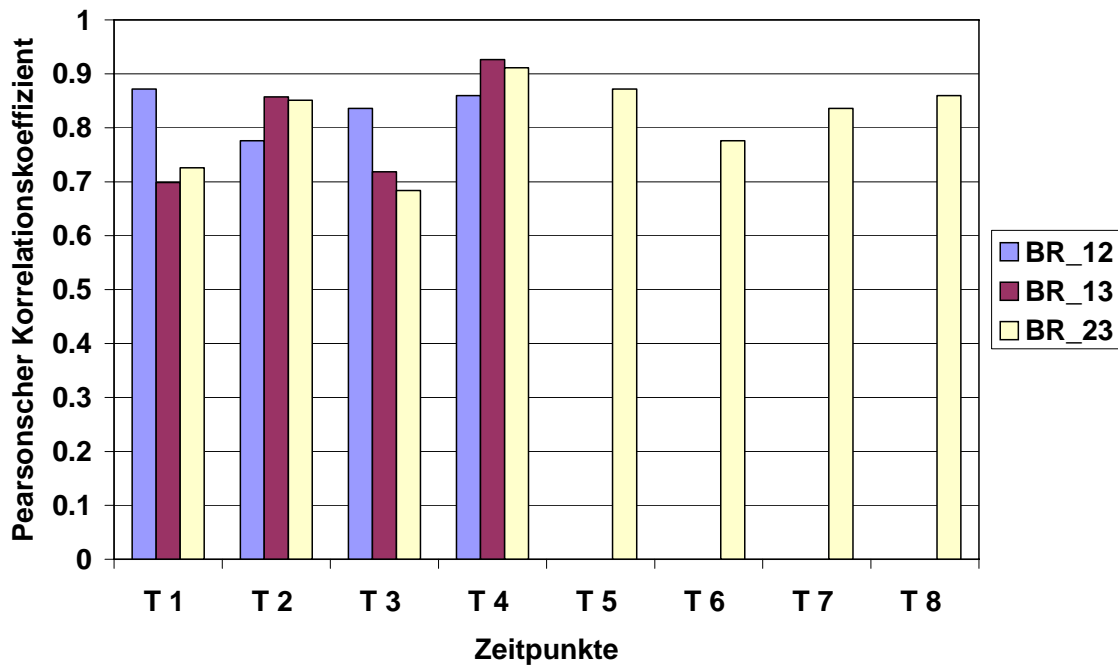


Abb. 3.5: Pearsonsche Korrelationskoeffizienten der biologischen Replikate (Fermentationen 1-3). Dargestellt sind die Werte im **grünen Kanal** (Markierung der cDNA mit Cy3-dCTP) für die **Referenzproben** der Fermentationen 1 und 2 (BR\_12), der Fermentationen 1 und 3 (BR\_13) sowie der Fermentationen 2 und 3 (BR\_23). Eine Korrelation von 1 entspricht einer 100%igen Übereinstimmung.

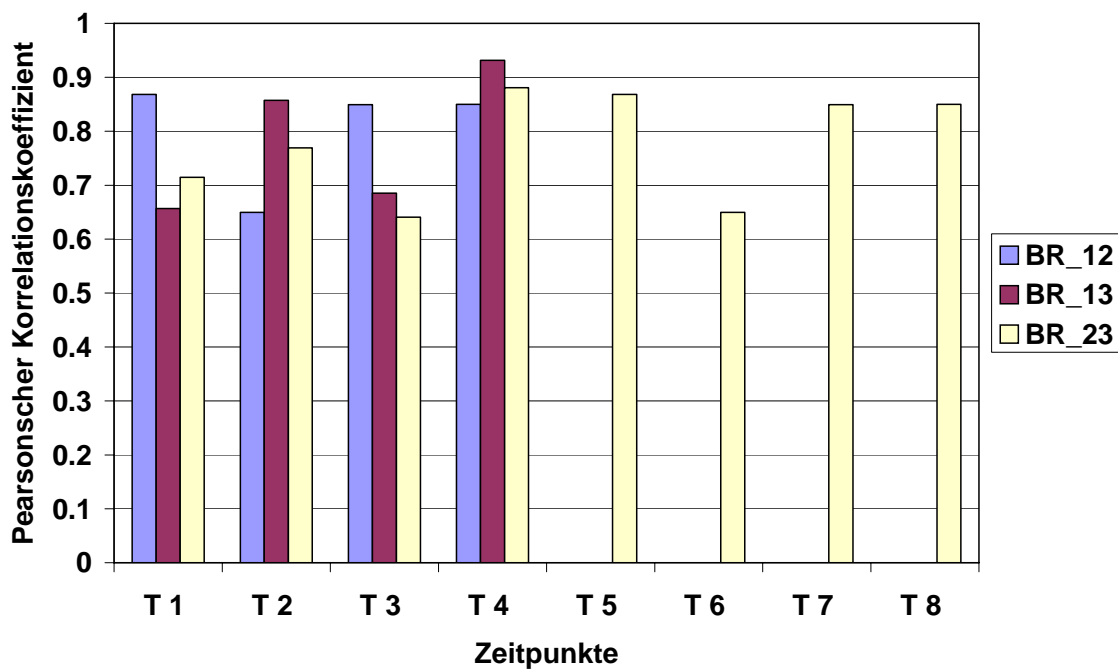
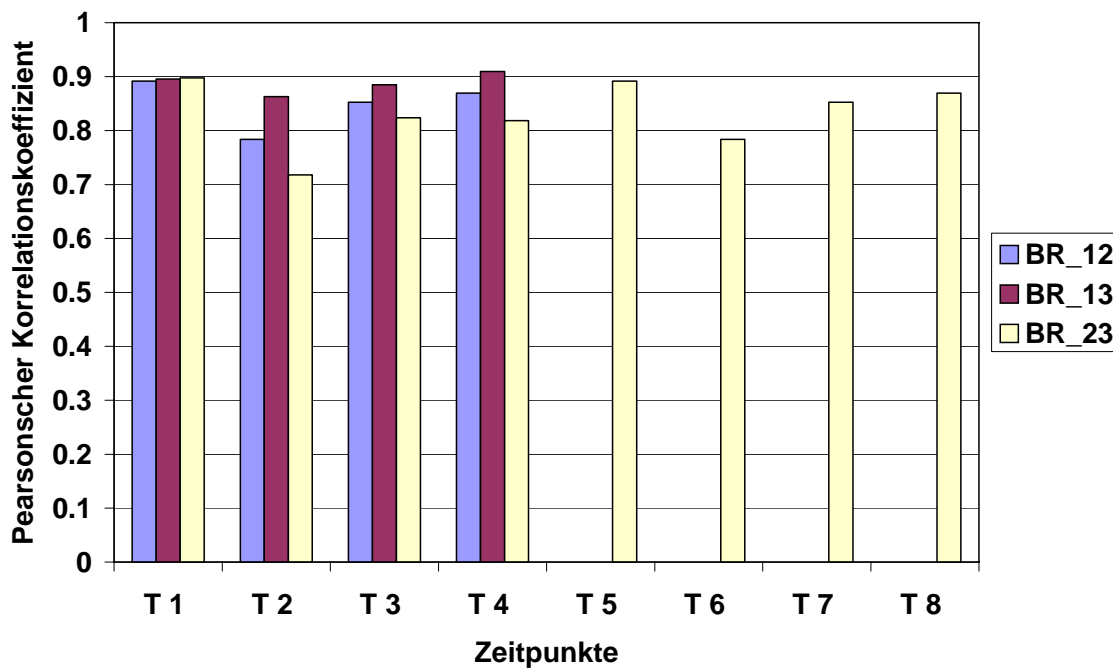


Abb. 3.6: Pearsonsche Korrelationskoeffizienten der biologischen Replikate (Fermentationen 1-3). Dargestellt sind die Werte im **grünen Kanal** (Markierung der cDNA mit Cy3-dCTP) für die **untersuchten Zeitpunkte** der Fermentationen 1 und 2 (BR\_12), der Fermentationen 1 und 3 (BR\_13)

sowie der Fermentationen 2 und 3 (BR\_23). Eine Korrelation von 1 entspricht einer 100%igen Übereinstimmung.

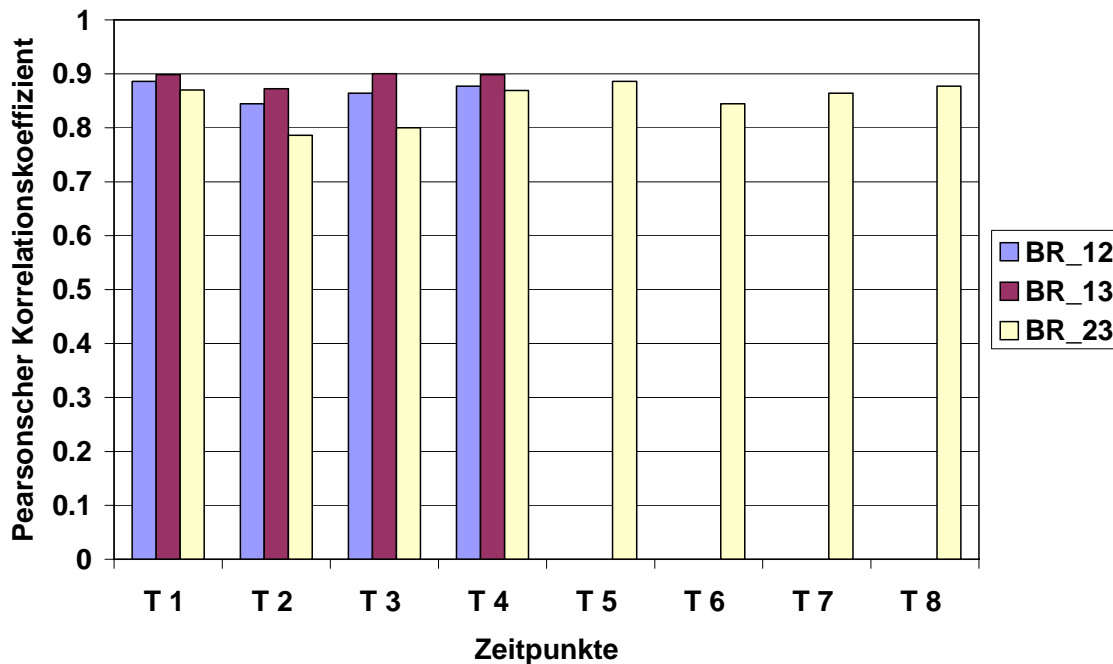
Im roten Kanal gab es nur geringe Unterschiede zwischen untersuchtem Zeitpunkt (mit Werten zwischen 0,84 und 0,89 für den Unterschied Fermentation 1 und 2, zwischen 0,87 und 0,90 für den Unterschied Fermentation 1 und 3 sowie zwischen 0,79 und 0,89 für den Unterschied Fermentation 2 und 3) und Referenz (mit Werten zwischen 0,78 und 0,89 für den Unterschied Fermentation 1 und 2, zwischen 0,86 und 0,91 für den Unterschied Fermentation 1 und 3 sowie zwischen 0,72 und 0,90 für den Unterschied zwischen Fermentation 2 und 3) (siehe auch Abb. 3.7 und Abb. 3.8).



**Abb. 3.7: Pearsonsche Korrelationskoeffizienten der biologischen Replikate (Fermentationen 1-3).** Dargestellt sind die Werte im roten Kanal (Markierung der cDNA mit Cy5-dCTP) für die Referenzproben der Fermentationen 1 und 2 (BR\_12), der Fermentationen 1 und 3 (BR\_13) sowie der Fermentationen 2 und 3 (BR\_23). Eine Korrelation von 1 entspricht einer 100%igen Übereinstimmung.

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 3.8:** Pearsonsche Korrelationskoeffizienten der biologischen Replikate (Fermentationen 1-3). Dargestellt sind die Werte im roten Kanal (Markierung der cDNA mit Cy5-dCTP) für die untersuchten Zeitpunkte der Fermentationen 1 und 2 (BR\_12), der Fermentationen 1 und 3 (BR\_13) sowie der Fermentationen 2 und 3 (BR\_23). Eine Korrelation von 1 entspricht einer 100%igen Übereinstimmung.

Insgesamt waren die Daten im roten Kanal mit Werten zwischen 0,72 und 0,91 und einer mittleren Korrelation von  $0,86 \pm 0,04$  (Wert  $\pm$  Standardabweichung) besser reproduzierbar als im grünen Kanal mit Werten zwischen 0,64 und 0,93 und einer mittleren Korrelation von  $0,8 \pm 0,09$  (Wert  $\pm$  Standardabweichung).

75% der A-Werte der Negativ-Kontrollen lagen unter einem Wert von 8,2. Dieser Wert wurde als Grenzwert zur Bestimmung der Spots, die ein ausreichend hohes Signal in beiden Kanälen zeigen, festgelegt. Damit wurde verhindert, dass bei der Suche nach differentiell exprimierten Genen auch Gene in die Auswahl kommen, die unter den verglichenen Bedingungen mit hoher Wahrscheinlichkeit eigentlich nicht exprimiert sind und beobachtete Unterschiede somit rein zufälliger Natur sind.

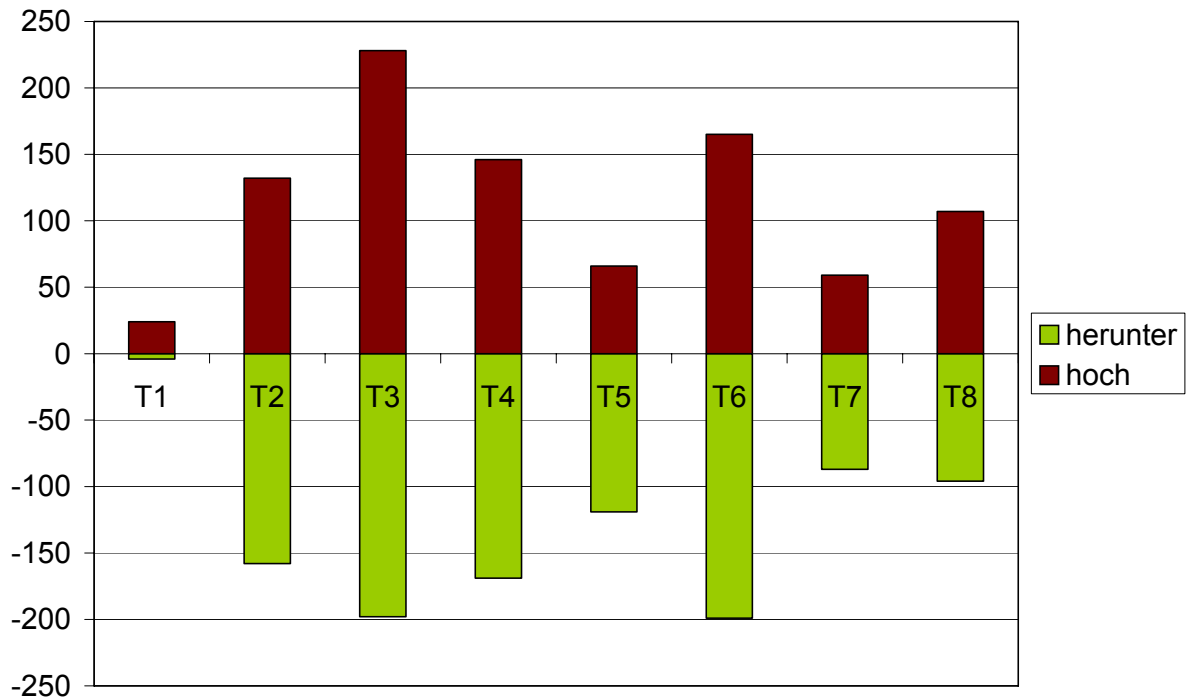


### 3.3 Bestimmung differentiell exprimierter Gene

Zu allen acht Zeitpunkten wurden signifikant differentiell exprimierte Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert  $< 0,05$  im Vergleich zur Referenz gefunden. Wurden signifikant erhöhte mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Referenz nachgewiesen, wird das betreffende Gen als hochreguliert bezeichnet, wurden signifikant geringere mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Referenz nachgewiesen, so wird das Gen als herunterreguliert bezeichnet. Im Vergleich zur Referenz wurden zum ersten Zeitpunkt ( $c_{\text{Glc}}(\text{T1}) < 0,05 \text{ g/L}$ ) 24 Gene, zum zweiten Zeitpunkt (T2, Glukose limitiert, Acetat vorhanden) 132 Gene, zum dritten Zeitpunkt (T3, Acetat ~30 min limitiert) 228 Gene, zum vierten Zeitpunkt (T4, 1 h nach T3) 146 Gene, zum fünften Zeitpunkt (T5, 2 h nach T3) 66 Gene, zum sechsten Zeitpunkt (T6, 3 h nach T3) 165 Gene, zum siebten Zeitpunkt (T7, 4 h nach T3) 59 Gene und zum achten Zeitpunkt (T8, 5,5 h nach T3) 107 Gene hochreguliert gefunden. Herunterreguliert gefunden wurden zum ersten Zeitpunkt 4 Gene, zum zweiten Zeitpunkt 158 Gene, zum dritten Zeitpunkt 198 Gene, zum vierten Zeitpunkt 169 Gene, zum fünften Zeitpunkt 119 Gene, zum sechsten Zeitpunkt 199 Gene, zum siebten Zeitpunkt 87 Gene und zum achten Zeitpunkt 96 Gene. Einen Überblick gibt Abb. 3.9. Dem Anhang sind Details wie die fdr-angepassten p-Werte, die t-Werte, die A- sowie die M-Werte geordnet nach Zeitpunkten zu entnehmen (Tab. 7.1 bis Tab. 7.8).

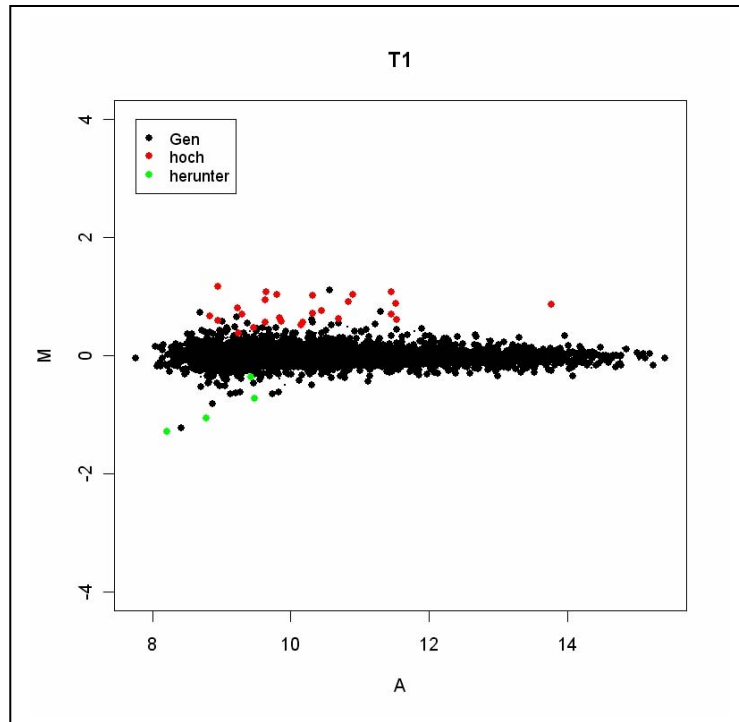
### 3. Ergebnisse

---

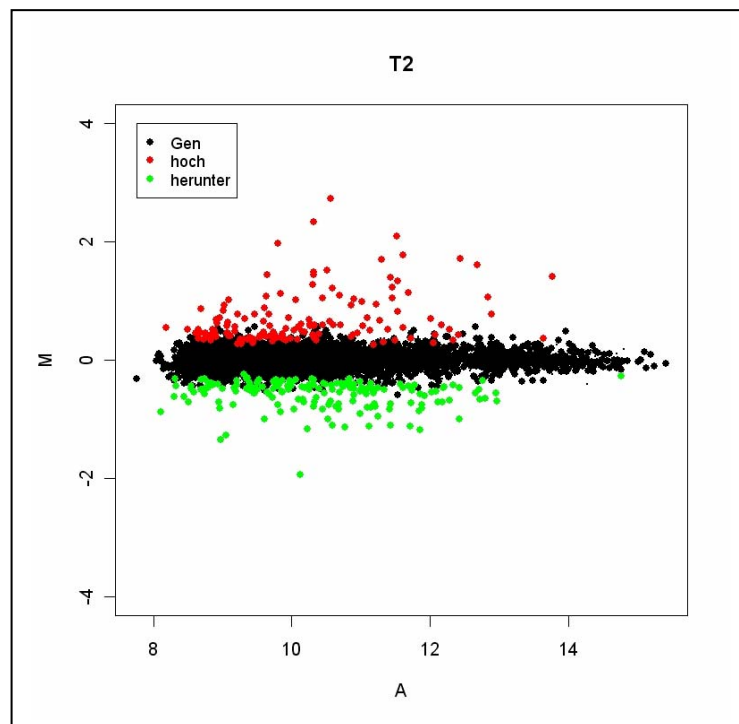


**Abb. 3.9: Differenziell exprimierte Gene im Zeitverlauf.** Dargestellt ist die Anzahl der „als signifikant hoch- bzw. herunterreguliert“ identifizierten Gene im Vergleich zur Referenz über die acht betrachteten Zeitpunkte (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$ ).

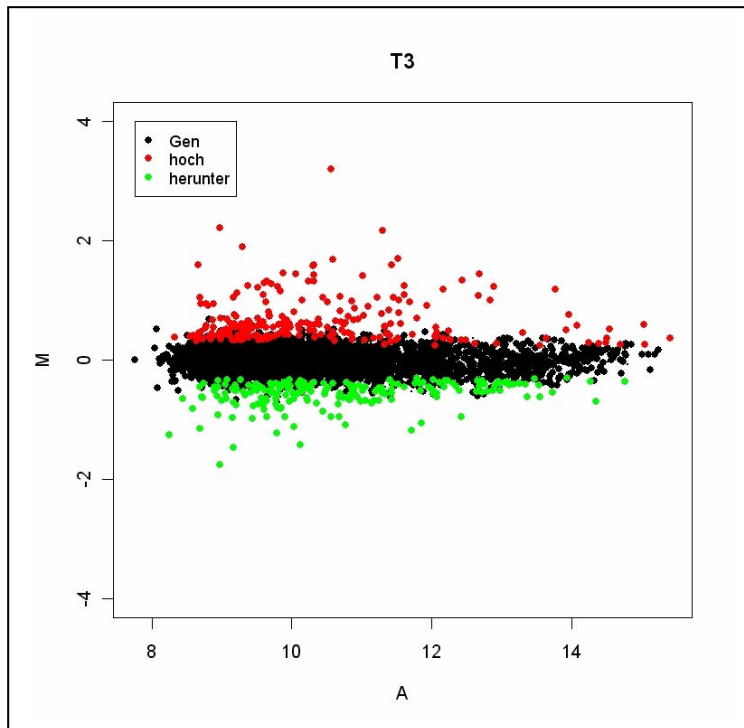
Die unten gezeigten *MA*-Plots (Abb. 3.10 bis Abb. 3.17) stellen für alle Gene die Koeffizienten der aufgestellten linearen Modelle (*M*-Werte) sowie deren mittlere Intensitäten (*A*-Werte) dar. Die *M*-Werte aller differenziell exprimierten Gene liegen zwischen -2,6 und 3,2. Dies entspricht einer maximal 6 fachen Herunterregulation sowie einer maximal 9 fachen Hochregulation. Die doppelte Standardabweichung ( $s^2$ ) liegt zwischen 0,2 und 1,3. Bei Annahme einer Normalverteilung der Daten liegen 95% der Koeffizienten-Werte für die entsprechenden Gene im angegebenen Bereich ( $\text{Wert} \pm s^2$ ). Die Werte der doppelten Standardabweichung für signifikant differenziell exprimierte Gene in alphabetischer Reihenfolge sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Tab. 7.9). Die mittleren *A*-Werte lagen zwischen 8 und 16.



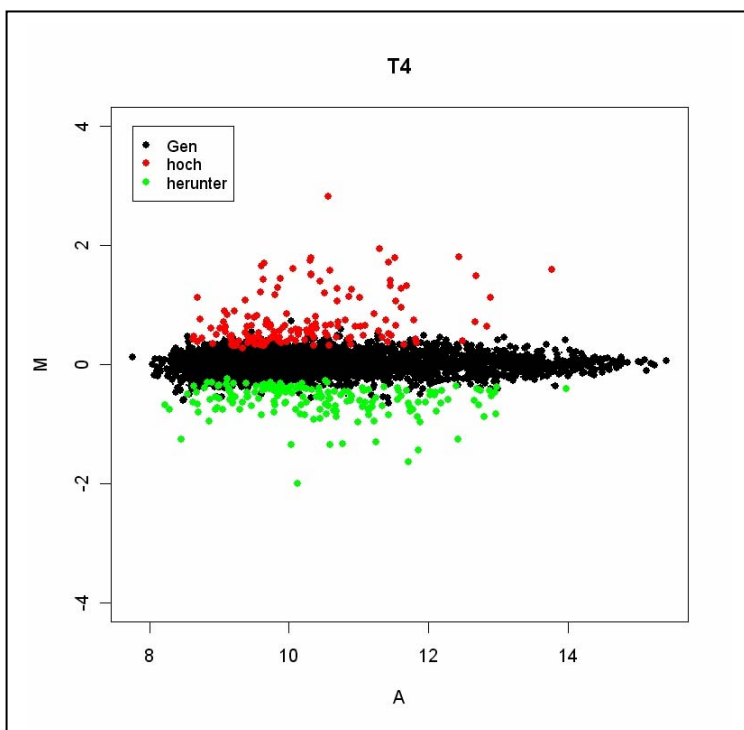
**Abb. 3.10: MA-Plot für den Zeitpunkt T1.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -1,3 und 1,2; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.



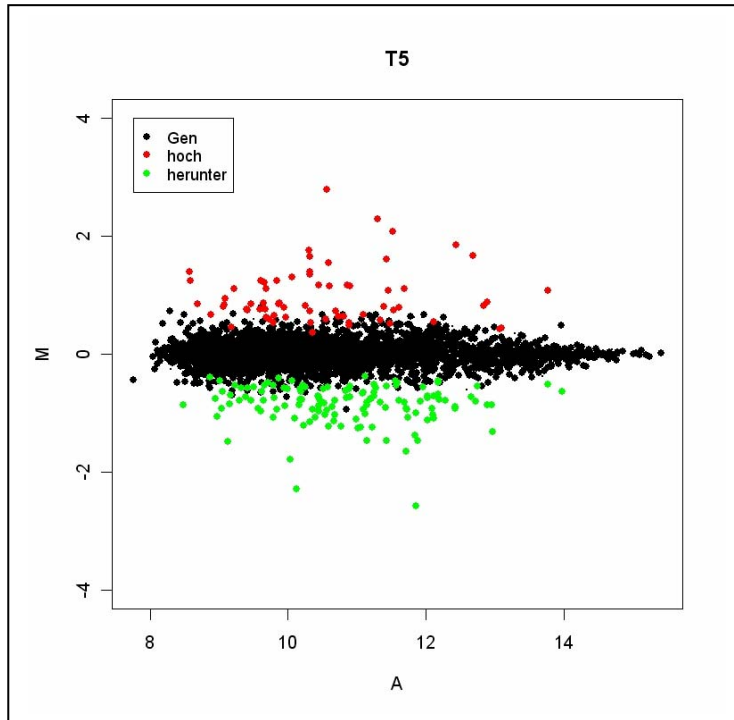
**Abb. 3.11: MA-Plot für den Zeitpunkt T2.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -1,9 und 2,7; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.



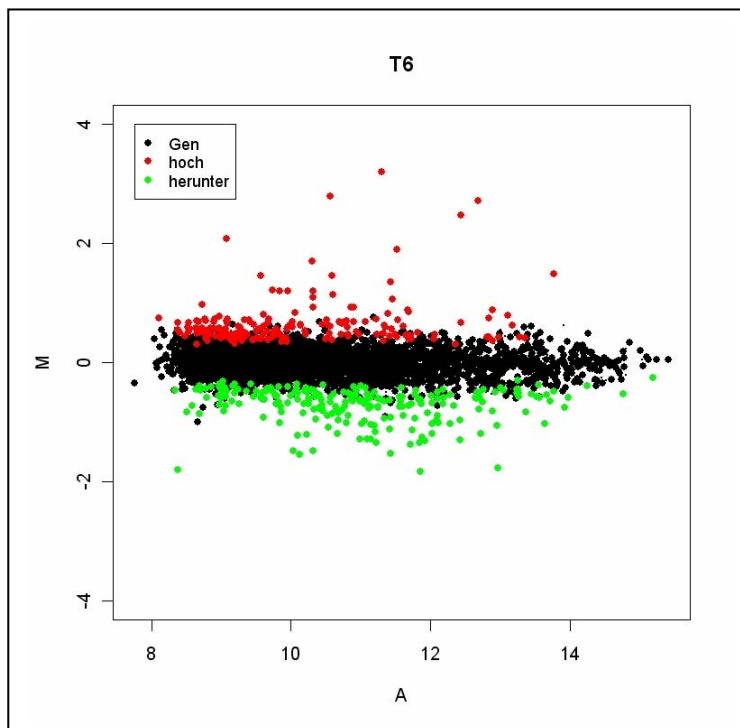
**Abb. 3.12: MA-Plot für den Zeitpunkt T3.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -1,8 und 3,2; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.



**Abb. 3.13: MA-Plot für den Zeitpunkt T4.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -2 und 2,8; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.



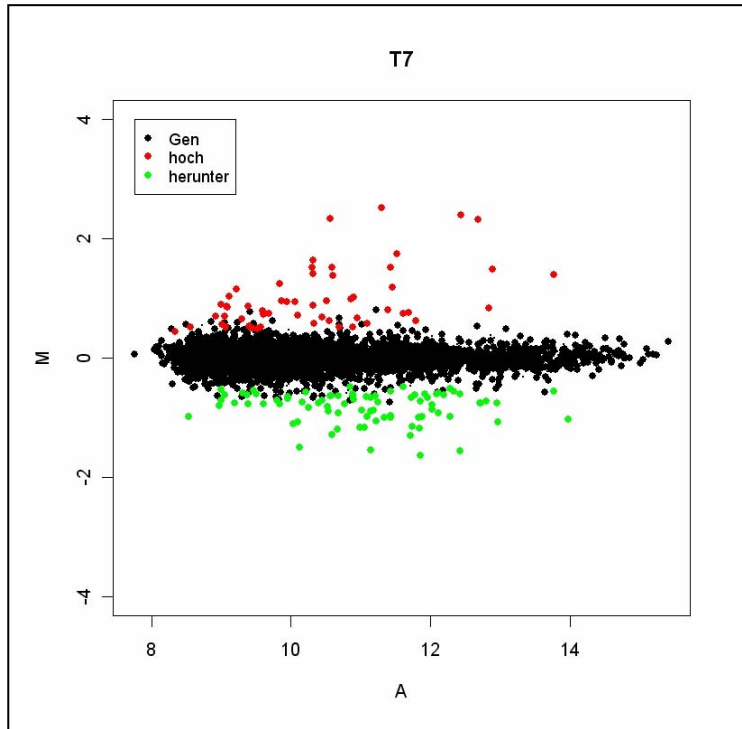
**Abb. 3.14: MA-Plot für den Zeitpunkt T5.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -2,6 und 2,8; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.



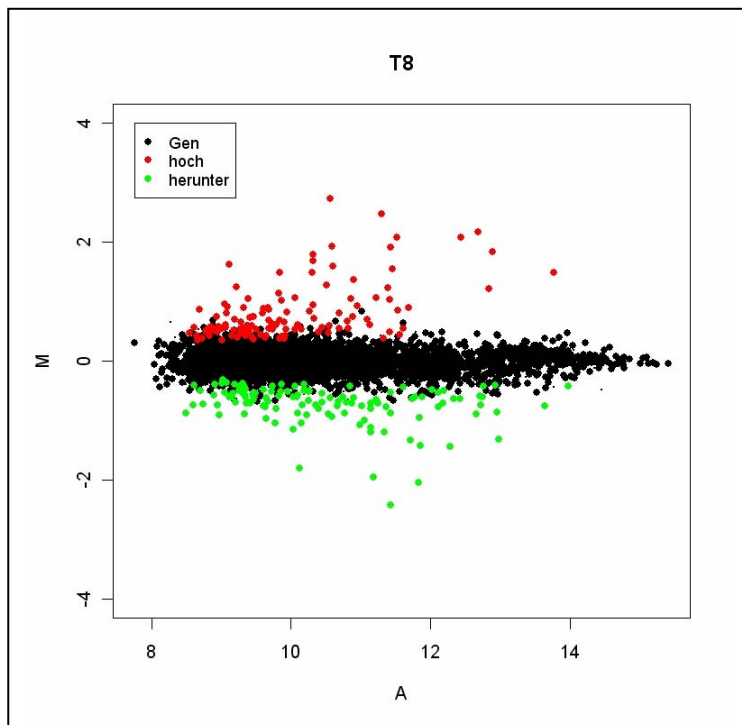
**Abb. 3.15: MA-Plot für den Zeitpunkt T6.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -1,8 und 3,2; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.

### 3. Ergebnisse

---



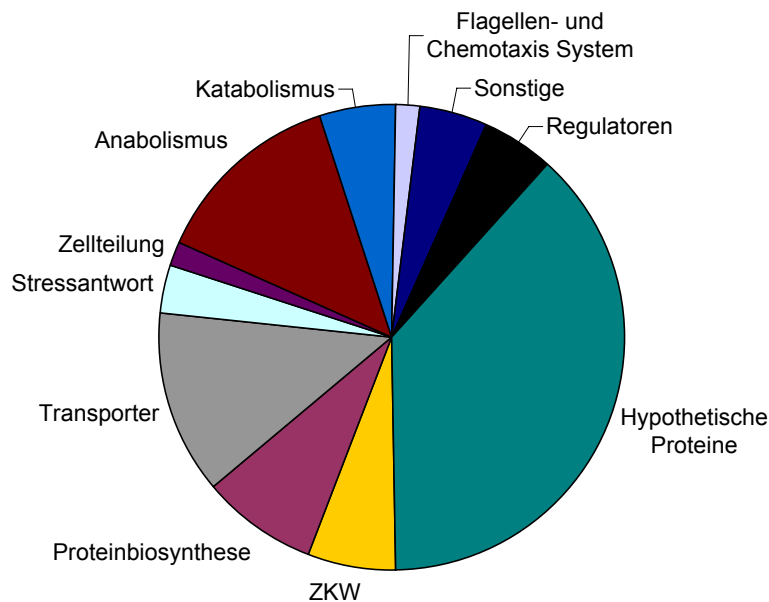
**Abb. 3.16: MA-Plot für den Zeitpunkt T7.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -1,6 und 2,5; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.



**Abb. 3.17: MA-Plot für den Zeitpunkt T8.** Dargestellt sind die Koeffizienten des linearen Modells ( $M$ ) jedes Gens in Abhängigkeit der mittleren Gesamtintensität ( $A$ ). Die Koeffizienten liegen zwischen -2,4 und 2,7; hochregulierte Gene sind in rot dargestellt, herunterregulierte Gene in grün.

Insgesamt änderten sich die RNA-Konzentrationen von 962 Transkripten (exklusive interner Kontrollen, Negativ Kontrollen sowie der Replikate) in mindestens einem Zeitpunkt signifikant im Vergleich zur Referenz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$ . 367 dieser Transkripte kodierten für hypothetische Proteine oder für Proteine mit noch unbekannter Funktion. Die Gene der übrigen 595 Transkripte konnten verschiedenen physiologischen Funktionen zugeordnet werden (Abb. 3.18):

„Transporter“ - 121 Gene; „Zentraler Kohlenstoffwechsel“ (Glykolyse, Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, Pentosephosphat-Weg, Tricarbonsäure-Zyklus, Glyoxylat-Zyklus, Atmung) - 58 Gene; „Anabolismus“ (incl. Salvage Pathway der Nukleotide) - 128 Gene; „Katabolismus“ - 51 Gene; „Proteinbiosynthese“ - 79 Gene; „Stressantwort“ - 33 Gene; „Zellteilung“ - 16 Gene; „Flagellen- und Chemotaxis System“ - 17 Gene; „Regulatoren und Zwei-Komponenten Systeme“ - 48 Gene; „Sonstige“ - 44 Gene.



**Abb. 3.18: Physiologische Einteilung differentiell exprimierter Gene.** Anteil der unter Glukose-Limitierung differentiell exprimierten Gene an verschiedenen physiologischen Funktionen in der Zelle. ZKW: Zentraler Kohlenstoffwechsel.

Im Folgenden werden die Daten nach der physiologischen Funktion geordnet über eine Darstellung nach Eisen (Eisen et al. 1998) visualisiert (Zentraler Kohlenstoffwechsel) bzw. tabellarisch geordnet (s.u.). Jedem Koeffizienten des linearen Modells eines Gens (dieser entspricht im einfachsten Fall dem mittleren „Log-Ratio“ in einem Zeitpunkt und repräsentiert eine relative Expressionsänderung zur Referenz) wird zur Visualisierung ein Farbwert zugeteilt. Die grüne Farbe zeigt herunterregulierte Gene im Bezug zur Referenz an, die rote

### 3. Ergebnisse

---

Farbe zeigt hochregulierte Gene im Bezug zur Referenz an. Intensiver leuchtende Farben repräsentieren größere Koeffizienten. Hieraus darf aber nicht zwangsläufig auf eine signifikant größere Expressionsänderung geschlossen werden, da die Standardabweichung der Koeffizienten in der Darstellung nicht berücksichtigt wird. Die Absolutwerte zu verschiedenen Zeitpunkten können folglich in dieser Darstellung nicht untereinander verglichen werden.

Alle nachfolgenden Grafiken und Tabellen stellen Gene dar, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  in mindestens einem Zeitpunkt im Vergleich zur Referenz als „signifikant differentiell reguliert“ identifiziert werden konnten. Die Koeffizienten sind in den Tabellen zum gegebenen Zeitpunkt farbig unterlegt, wenn eine signifikante Änderung im Vergleich zur Referenz detektiert wurde. Grün zeigt eine Herunterregulation an, rot zeigt eine Hochregulation an.

Die Gene sind bezüglich der Ähnlichkeit des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderung geordnet. Die Ordnung erfolgte über ein hierarchisches Clustern nach Gleichung 2.2 (siehe 2.1.4 „Verwendete Gleichungen“).

Hypothetische Proteine und Proteine mit noch unbekannter Funktion sowie Proteine, die in die Kategorie „Sonstige“ fallen, da sie keiner der aufgeführten physiologischen Zuordnungen entsprachen, sind im Anhang aufgeführt (siehe Tab. 7.11 sowie Tab. 7.10).

#### 3.3.1 Transporter

*E. coli* verfügt über verschiedene Transportsysteme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten und Affinitäten. Dies ermöglicht den Zellen die optimale Aufnahme von Nährstoffen bei verschiedener Nährstoffverfügbarkeit (Lengeler 1993). Allein für Kohlenhydrat-Transporter sind in Bakterien mindestens sieben verschiedene Transporter-Typen beschrieben worden: Die seltenen „Facilitator“ scheinen auf die Familie der *Enterobacteriaceae* beschränkt zu sein (Glycerol-Transport). Weiterhin besitzen Bakterien Uniporter, über die sie Substrate entlang des Konzentrationsgefälles unidirektional in die Zelle aufnehmen, sowie Symporter, die den elektrochemischen Gradienten für  $H^+$  oder  $Na^+$  ausnutzen. Substrate werden hier zeitgleich mit den Ionen in die Zelle aufgenommen. Antiporter hingegen ermöglichen der Zelle die Exkretion giftiger Produkte oder die Aufnahme von Vorstufen-Metaboliten aus der Umgebung. Das Vorstufen-Molekül aus dem extrazellulären Raum wird im Austausch gegen ein Produkt aus dem Zellinneren transportiert. Weiterhin existieren Bindeprotein-abhängige Transporter, die sogenannten ABC-Transporter sowie die Phosphotransferase-Systeme (PTS-Systeme). Der letztgenannte Transporter-Typ phosphoryliert das Substrat beim Transport durch die Membran und macht es somit impermeabel. Außer den Symportern wenden die bisher genannten Transporter-



Typen Energie auf, um Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Man spricht daher von „aktivem Transport“. Der Rückfluß der Substrate wird durch das Schließen der betreffenden Transporter oder auch durch die Substratphosphorylierung verhindert. Neben dem „aktiven Transport“ existiert auch der Mechanismus der kanal- oder porenvermittelten Diffusion. Substanzen werden in Richtung eines vorhandenen Konzentrationsgefälles durch Porine, die in der äußeren Zellmembran lokalisiert sind, transportiert. Porine sind wassergefüllte Kanäle, die entweder unspezifisch den Durchtritt von Stoffen ermöglichen oder über spezifische Substratbindestellen verfügen (Lengeler 1993; Schneider 2000).

121 Gene, welche für Transporter oder Transporter-Untereinheiten kodieren, wurden über die Microarray-Analyse in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz „als signifikant differentiell exprimiert“ identifiziert. Diese umfassten Uni-, Sym- und Antiporter, ABC-Transporter, PTS-Transportsysteme, Porine, und andere. Substrate der Transporter stellten verschiedene Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren, Metalle sowie Schwefelverbindungen dar. Die PTS-Transportsysteme stellten den einzigen Transportertyp dar, dessen mRNA ausschließlich verstärkt transkribiert wurde. Alle übrigen Transportertypen wurden teilweise hoch- und teilweise herunterreguliert. Die Expression der Transporter-Gene änderte sich oft schon mit dem Einsetzen der Glukose-Limitierung zum ersten untersuchten Zeitpunkt T1 signifikant. Im Folgenden werden die Gene der Transporter, welche signifikant in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz verändert waren, geordnet nach dem Typ und im zeitlichen Verlauf tabellarisch aufgelistet (siehe Tab. 3.1 bis Tab. 3.5). Gene, die für Glukose-Transportsysteme kodieren, werden gezielt besprochen.

### **3.3.1.1 Uni-, Sym- und Antiporter**

Verschiedene Uni-, Sym- und Antiporter wurden sowohl verstärkt als auch vermindert im Vergleich zur Referenz transkribiert (Tab. 3.1). Das Gen des Galaktose MFS Transporters (*galP*), der unter anderem auch Glukose transportiert, war zum Zeitpunkt T3 unter vollständiger Kohlenhydrat-Limitierung verstärkt abgeschrieben worden.

### 3. Ergebnisse

**Tab. 3.1: Uni-, Sym- und Antiporter.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Uni-, Sym- und Antiporter bzw. deren Untereinheiten kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ydaH</i>	AbgT Transporter	-0.04	-0.02	-0.29	-0.01	0.14	0.81	-0.10	-0.07
<i>yceE</i>	YceE MFS Transporter	0.01	0.27	-0.06	0.05	0.09	1.19	-0.18	0.10
<i>ydeF</i>	YdeE MFS Transporter	-0.14	-0.03	0.22	0.13	0.11	0.64	0.22	0.01
<i>sugE</i>	SugE SMR Transporter	0.00	0.00	0.17	0.15	0.17	0.43	0.11	0.01
<i>dctA</i>	DctA Dicarboxylat DAACS Transporter	-0.03	-0.09	0.09	0.15	0.15	0.40	0.06	0.03
<i>yjiO</i>	YjiO MFS Transporter	0.13	0.10	0.13	0.11	0.28	0.46	0.03	0.17
<i>yhaO</i>	YhaO STP Transporter	0.05	0.10	0.22	-0.04	-0.02	0.37	0.37	0.17
<i>yeeO</i>	YeeO MATE Transporter	0.05	-0.04	0.14	-0.05	-0.04	0.23	0.89	-0.08
<i>gltP</i>	Glutamat/Aspartat DAACS Transporter	0.00	0.09	0.35	-0.25	-0.14	0.16	0.11	0.24
<i>araJ</i>	MFS Transporter uncharakterisiert	0.13	0.07	0.36	0.05	0.13	0.09	0.23	-0.04
<i>yidY</i>	YidY MFS Transporter	0.02	-0.22	0.23	-0.10	0.11	0.15	0.32	0.43
<i>yghK</i>	YghK Transporter	0.12	-0.05	0.14	0.18	0.04	0.07	0.23	0.38
<i>yhcL</i>	YhcL DcuC Transporter	-0.12	0.21	0.29	-0.03	0.20	-0.03	0.00	0.43
<i>b2789</i>	YgcZ MFS Transporter	-0.09	0.11	0.35	0.17	0.11	0.09	0.09	0.40
<i>b2372</i>	YfdV AEC Transporter	-0.12	0.28	0.42	0.09	0.09	-0.03	0.15	0.54
<i>nanT</i>	NanT Sialinsäure MFS Transporter	-0.04	0.00	0.17	-0.04	0.00	0.27	0.08	0.52
<i>acrF</i>	UE von AcrEF-TolC Efflux Transport System	-0.11	-0.03	0.65	0.03	0.11	0.40	0.14	0.59
<i>yjhB</i>	YjhB MFS Transporter	-0.09	0.18	0.60	0.22	0.20	0.49	0.26	0.66
<i>melB</i>	MelB GPH Transporter	-0.05	0.15	0.35	0.06	0.08	0.24	0.21	0.48
<i>idnT</i>	IdnT Idonate Gnt Transporter	-0.05	0.26	0.21	0.08	-0.10	0.24	0.07	0.31
<i>emrY</i>	UE von EmrKY-TolC Putative Efflux System	-0.19	0.22	0.35	0.27	-0.11	0.15	-0.12	0.56
<i>b2740</i>	YgbN Gnt Transporter	0.08	0.12	0.40	0.07	0.00	0.24	0.20	0.12
<i>yeiM</i>	YeiM NUP Transporter	0.07	0.15	0.36	-0.02	0.04	0.07	0.08	0.11
<i>galP</i>	Galaktose MFs Transporter	-0.03	0.24	0.55	0.11	-0.06	0.22	0.01	0.18
<i>yhaU</i>	YhaU MFS Transporter, uni/Sym/antiporter	-0.02	0.13	0.38	0.21	0.10	0.08	-0.03	0.19
<i>gntP</i>	UE von Gluconate Gnt Transporter	-0.08	0.04	0.27	0.13	0.02	0.07	0.02	0.00
<i>yjhF</i>	Konserviertes Protein	-0.47	0.40	0.91	-0.14	-0.19	0.17	0.17	0.44
<i>yjdL</i>	YjdL Peptid POT Transporter	0.02	0.41	0.31	0.33	0.27	0.17	0.23	0.17
<i>yjcG</i>	YjcG SSS Transporter	0.24	0.87	1.29	1.65	1.24	0.60	0.73	0.88
<i>kgtP</i>	KgtP $\alpha$ -Ketoglutarat MFS Transporter	0.04	0.52	0.84	0.73	0.80	0.82	0.81	1.23
<i>lldP</i>	LctP Lactat Transporter	0.16	0.35	0.50	0.16	0.33	0.34	0.48	0.48
<i>ydjE</i>	YdjE MFS Transporter	-0.04	0.36	0.25	-0.16	0.16	0.30	0.02	0.08
<i>rhaT</i>	Rhamnose RhaT Transporter	-0.18	-0.32	-0.14	-0.45	-0.71	-0.63	-0.32	-0.12
<i>codB</i>	Cytosin NCS1 Transporter	-0.23	-1.14	-1.09	-1.34	-1.23	-0.74	-0.77	-0.88
<i>acrB</i>	RND-Typus Permease, UE von AcrAB-MDR-CPLX	-0.16	-0.26	-0.48	-0.37	-0.49	-0.43	-0.27	-0.41
<i>acrA</i>	Membranfusionsprotein, UE von AcrAB-MDR-CPLX	-0.12	-0.22	-0.41	-0.23	-0.38	-0.19	-0.09	-0.20
<i>yhjE</i>	YhjE MFS Transporter	-0.12	-0.16	-0.06	-0.49	-0.22	-0.11	-0.21	-0.09
<i>chaA</i>	ChaA Kalzium CaCA Transporter	-0.10	-0.15	-0.31	-0.09	-0.07	-0.01	0.00	0.12
<i>ampG</i>	AmpG Muropeptid MFS Transporter	-0.03	-0.11	-0.37	-0.07	0.00	-0.31	-0.03	-0.03
<i>lysP</i>	Lysin APC Transporter	-0.05	-0.25	0.09	-0.36	-0.16	-0.10	-0.06	0.12
<i>focA</i>	FocA FNT Transporter	0.05	-0.24	0.05	-0.18	-0.03	-0.12	-0.12	-0.40
<i>yiiP</i>	FieF CDF Transporter	-0.01	-0.05	-0.05	0.02	-0.10	-0.31	-0.12	0.01
<i>b3836</i>	TatA, UE von TatABCE Protein Export Komplex	0.04	0.14	0.05	-0.11	0.05	-0.38	-0.13	-0.03
<i>xylE</i>	XylE Xylose MFS Transporter	-0.08	-0.02	-0.18	0.15	0.07	-0.50	-0.07	-0.34

#### 3.3.1.2 ABC-Transporter

ABC-Transporter weisen eine beschränkte Substratspezifität auf und transportieren mit hoher Affinität. Ursache hierfür ist der Transport unter ATP-Hydrolyse und weiterhin die Expression von spezifischen Bindeproteinen im Periplasma. Diese Proteine binden das Substrat mit hoher Affinität und transportieren es zum Transporter. Dadurch können Substrate auch gegen Konzentrationsgradienten transportiert werden (Lengeler 1993).

ABC-Transporter wurden sowohl signifikant hochreguliert als auch herunterreguliert (siehe auch Tab. 3.2). Die intensivsten Änderungen waren zwischen den Zeitpunkten T2 und T4 zu verzeichnen. Gene des zum Glukose-Transport befähigten Galaktose-ABC-Transporters (*mgIAB*) waren signifikant verstärkt abgeschrieben worden.

**Tab. 3.2: ABC-Transporter.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für ABC-Transporter bzw. deren Untereinheiten kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>artQ</i>	UE von Arginin ABC Transporter	0.28	-0.29	0.54	-0.08	0.29	0.12	-0.15	0.14
<i>modF</i>	ABC Transporter uncharakterisiert	0.07	-0.02	0.16	0.01	0.02	0.56	-0.02	0.05
<i>yehY</i>	UE von YehW/YehX/YehY/YehZ	0.10	-0.21	0.11	0.20	0.43	0.73	-0.05	0.01
<i>yjfF</i>	UE von YtfQ/YtfR/YtfS/YtfT/YjfF	0.07	0.15	0.14	0.14	0.26	0.40	0.04	-0.03
<i>aroP</i>	APC-Transporter	-0.01	0.05	-0.02	0.08	0.19	0.37	0.03	-0.13
<i>yehX</i>	UE von YehW/YehX/YehY/YehZ	-0.16	0.00	0.25	0.03	-0.01	0.08	-0.05	0.42
<i>nikC</i>	Nickel ABC Transporter	0.04	0.19	0.34	-0.14	0.02	0.45	0.10	0.43
<i>yejE</i>	UE von YejA/YejB/YejE/YejF ABC Transporter	-0.04	0.04	0.59	0.06	0.07	0.08	0.12	0.00
<i>b0832</i>	YliA/YliB/YliC/YliD ABC Transporter	-0.03	0.15	0.58	0.05	0.05	0.00	0.09	-0.01
<i>dppA</i>	UE von Dipeptid ABC Transporter	0.00	-0.01	0.46	0.17	0.00	0.23	0.09	0.03
<i>yphD</i>	UE von YphD/YphE/YphF ABC Transporter	0.04	0.14	0.39	0.11	-0.12	-0.17	0.21	0.10
<i>malK</i>	Maltose/Maltodextrin Transportsystem	1.08	1.43	1.31	1.69	0.86	0.29	0.22	0.00
<i>malE</i>	Maltose/Maltodextrin Transportsystem	0.94	1.08	0.97	1.43	0.55	-0.01	0.30	0.04
<i>malF</i>	Maltose/Maltodextrin Transport System	0.40	0.16	0.16	0.45	0.29	0.33	-0.03	-0.17
<i>yebi</i>	UE von ZnuA/ZnuB/ZnuC ABC Transporter	-0.01	0.04	0.08	0.33	0.15	0.21	0.28	0.34
<i>glnQ</i>	UE von Glutamin ABC Transporter	0.11	-0.06	0.18	0.76	0.39	0.26	0.55	0.35
<i>modB</i>	UE von Molybdän ABC Transporter	0.32	0.78	0.56	0.64	0.31	0.35	0.57	0.75
<i>mgIA</i>	Galactose ABC Transporter	0.40	0.57	0.75	0.64	0.18	0.53	0.23	0.29
<i>malM</i>	Periplasmatisches Proprotein des Mal-Regulons	0.55	0.50	0.65	1.08	0.54	0.21	0.41	0.58
<i>mgIB</i>	ABC Transporter Galaktose	0.76	1.05	1.04	1.40	1.16	0.63	0.68	0.55
<i>modA</i>	UE von Molybdän ABC Transporter	0.07	0.57	0.68	0.68	0.28	0.22	0.34	0.46
<i>xylF</i>	UE von Xylose ABC Transporter	-0.07	0.37	0.62	0.83	0.41	0.36	0.19	0.36
<i>rbsB</i>	UE von Ribose ABC Transporter	0.74	1.69	2.17	1.94	2.29	3.19	2.51	2.47
<i>glnP</i>	UE von Glutamin ABC Transporter	0.09	0.42	0.66	0.46	0.53	0.37	0.52	0.75
<i>glnH</i>	UE von Glutamin ABC Transporter	0.29	0.93	0.99	1.13	1.16	0.92	0.98	1.05
<i>ybjZ</i>	UE von MacAB Makrolid Transporter Komplex	0.11	0.34	0.39	-0.01	0.33	0.07	0.24	0.56
<i>proW</i>	UE von Prolin ABC Transporter	-0.07	-0.05	-0.12	0.01	-0.09	-0.11	0.18	0.48
<i>proV</i>	UE von Prolin ABC Transporter	-0.32	-0.40	-0.08	-0.12	-0.11	-0.11	0.36	1.14
<i>artI</i>	UE von Arginin ABC Transporter	-0.09	-0.58	-0.02	0.21	-0.04	-0.12	-0.01	0.26
<i>yhbG</i>	UE von YhbG/YhbN ABC Transporter	0.17	0.07	0.07	-0.34	-0.02	-0.14	0.19	0.14
<i>sapA</i>	UE von Peptidaufnahme ABC Transporter	-0.02	0.40	0.10	-0.15	0.07	-0.05	0.15	0.12
<i>yhdY</i>	UE von YhdW/YhdX/YhdY/YhdZ ABC Transporter	0.00	-0.07	0.41	-0.37	-0.02	0.17	0.26	-0.39
<i>yadT</i>	Periplasmatisches Vitamin B12 Bindeprotein	-0.19	-0.14	0.08	-0.69	-0.03	-0.07	0.16	-0.39
<i>phnC</i>	Alkylphosphonat ABC Transporter	0.00	-0.07	-0.31	0.17	0.20	-0.30	0.02	-0.27
<i>potA</i>	UE von ABC Transporter	-0.22	-0.12	0.00	0.27	-0.07	-0.45	-0.03	-0.24
<i>araG</i>	UE von Arabinose ABC-Transporter	-0.03	-0.08	-0.05	0.55	0.01	-0.20	-0.07	-0.11
<i>ugpC</i>	UE von Glycerol-3-Phosphat ABC Transporter	-0.28	0.00	-0.56	0.10	-0.14	0.09	-0.05	-0.24
<i>livF</i>	Leucin ABC transporter	0.03	-0.09	-1.22	-0.16	-0.27	0.28	-0.19	0.01
<i>cydD</i>	UE von cydDC Glutathion ABC transporter	0.00	-0.51	-0.21	-0.47	-0.49	-0.23	-0.38	-0.07
<i>yojI</i>	YojI, ABC Transporter	-0.13	-0.06	-0.15	-0.28	-0.17	-0.06	-0.14	-0.16
<i>dppD</i>	UE von Dipeptid ABC Transporter	0.00	-0.10	-0.23	-0.36	-0.59	-0.26	-0.10	-0.21
<i>yebL</i>	UE von ZnuA/ZnuB/ZnuC ABC Transporter	0.54	-0.74	-0.54	-0.71	-0.39	-0.50	-0.36	-0.36
<i>ycjO</i>	UE von YcjN/YcjO/YcjP ABC Transporter	0.35	-0.45	-0.29	-0.17	-0.12	-0.10	-0.18	-0.27
<i>b1605</i>	ArcD APC transporter	-0.05	-0.28	-0.44	0.05	-0.06	-0.22	-0.21	-0.32
<i>cysW</i>	UE von Thiosulfat ABC Transporter	-0.05	-0.40	-0.55	-0.18	-0.38	-0.41	-0.22	-0.22
<i>cysP</i>	UE von Thiosulfat ABC Transporter	-0.03	-0.38	-0.28	-0.09	-0.30	-0.34	-0.06	-0.29
<i>potC</i>	UE von ABC Transporter	-0.08	-0.42	-0.13	-0.12	-0.28	-0.73	-0.57	-0.63
<i>ybaT</i>	YbaT APC Transporter	-0.10	-0.06	-0.51	-0.47	-0.12	-1.81	-0.24	0.13

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.1.3 PEP-PTS Transporter

Die Gene des PTS-Transportsystems wurden durchweg hochreguliert gefunden (Tab. 3.3). Die Mannose- (*manXY*) sowie die Galaktitol-Systeme (*gatA*) wurden früh hochreguliert (T1). Die auffälligste Änderung spielte sich zwischen den Zeitpunkten T2 und T4 ab. Die Zellen waren hier bereits 50 min unter Kohlenhydrat-Limitierung. Die EIIBC Komponente des Maltose/Glukose Transportsystems (*malX*) wurde ausschließlich zum Zeitpunkt T6 kurz signifikant hochreguliert. Das Glukose-spezifische PTS-Transportsystem (*crr*, *ptsG*) wurde nicht reguliert.

**Tab. 3.3: PEP-PTS Transporter.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für PEP-PTS Transportsystem Untereinheiten kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ptxA</i>	L-Ascorbat Transport	0.12	-0.08	0.29	-0.16	0.21	0.32	0.13	0.06
<i>malX</i>	EIIBCMalX, Maltose-Glucose Transport	0.08	0.11	0.04	0.01	0.09	0.48	0.10	0.26
<i>nagE</i>	EIINag, N-Acetylglucosamin Transport	-0.08	0.04	0.58	0.02	-0.01	0.04	-0.02	0.02
<i>agaW</i>	N-Acetylgalactosamin-spez. IIC Komponente 2	-0.05	0.12	0.55	0.05	0.04	0.22	0.06	0.16
<i>fruA</i>	Fruktose Transport	-0.03	0.22	0.35	-0.13	-0.18	0.14	0.07	0.18
<i>sgcX</i>	UE von PEP - PTS System	0.03	0.66	0.39	0.48	0.59	0.48	0.62	0.59
<i>gatB</i>	Galactitol Transport	0.33	0.49	0.76	0.42	0.48	0.35	0.40	0.47
<i>gatA</i>	Galactitol Transport	1.02	1.49	1.60	1.52	1.65	1.19	1.64	1.78
<i>gatC</i>	Galactitol Transport	0.53	0.95	1.04	0.85	0.60	0.73	0.80	1.06
<i>srlE</i>	UE von EIIGut, Sorbitol Transport	0.07	0.30	0.56	0.21	0.15	0.11	0.16	0.39
<i>srlA</i>	glucitol/sorbitol-spezifische IIB UE	0.26	0.49	0.76	0.34	0.22	0.31	0.20	0.30
<i>manY</i>	Mannose Transport (ManXYZ)	0.61	1.33	1.01	0.65	0.17	-0.04	0.35	0.42
<i>manX</i>	Mannose Transport (ManXYZ)	1.03	1.97	1.23	1.16	0.65	0.13	0.39	0.32
<i>manZ</i>	Mannose Transport (ManXYZ)	0.44	1.01	0.39	0.64	0.20	0.72	0.29	0.08
<i>treB</i>	UE von EITre, Trehalose Transport	0.10	0.15	0.52	0.20	0.29	0.07	1.02	1.62

### 3.3.1.4 Beta-Fass Porine der äußeren Membran

Drei in der äußeren Zellmembran lokalisierte Porine waren signifikant reguliert. LamB, ein Glukose-transportierendes Beta-Fass Protein, wurde zu den Zeitpunkten T1 bis T4 im Vergleich zur Referenz verstärkt abgeschrieben (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4: Beta-Fass Porine.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Porine kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>fhuA</i>	Ferricrom, Colicin M, Phagen	-0.12	-0.30	-0.06	-0.15	-0.06	0.15	0.11	0.03
<i>fadL</i>	Fettsäureaufnahme	0.01	0.07	0.46	0.08	0.12	-0.02	-0.06	0.34
<i>lamB</i>	Maltose/Maltodextrin Transportsystem	0.69	1.04	1.04	1.41	0.30	0.08	0.34	0.11

### 3.3.1.5 Sonstige Transporter

Eine Reihe weiterer Transporter, welche nicht zu einer der oben genannten Gruppen gehören, wurden ebenfalls differentiell exprimiert und sind in Tab. 3.5 aufgeführt.

**Tab. 3.5: Sonstige Transporter.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für sonstige Transporter kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>b1973</i>	Cadmium-induziertes Metalbindeprotein	0.92	-0.31	-0.43	-0.31	0.28	-0.05	-0.19	-0.42
<i>fecA</i>	Äussere Membranrezeptor	-0.11	0.00	-0.39	0.13	-0.06	-0.35	0.12	-0.06
<i>rfbX</i>	RfbX Lipopolysaccharid PST Transporter	-0.08	-0.67	-0.46	-0.76	-1.09	-1.23	-1.08	-0.87
<i>prfA</i>	SecEGY-Sekretionskomplex	0.17	-0.43	-0.21	-0.76	-0.48	-0.95	-0.62	-0.35
<i>exbD</i>	ExbD Protein	-0.26	-0.44	-0.56	-0.37	-0.32	-0.17	-0.34	-0.30
<i>exbB</i>	ExbB Protein	-0.27	-0.72	-0.21	-0.43	-0.34	-0.12	-0.23	-0.23
<i>ftn</i>	zytoplasmatisches Ferritin	0.08	0.71	-0.22	-0.22	-0.17	-0.41	-0.34	-0.51
<i>nmpC</i>	Porin	0.40	0.99	1.40	1.12	0.48	0.55	0.56	0.83
<i>glpF</i>	Glycerol MIP Kanal	0.29	0.68	0.23	0.58	0.82	0.51	0.31	0.37
<i>cstA</i>	Peptidtransporter	0.88	2.09	1.70	1.79	2.08	1.89	1.74	2.08
<i>b2074</i>	MdtABC RND-type Drug Exporter	-0.14	-0.06	-0.17	0.12	-0.14	0.68	-0.04	0.07

### 3. Ergebnisse

---

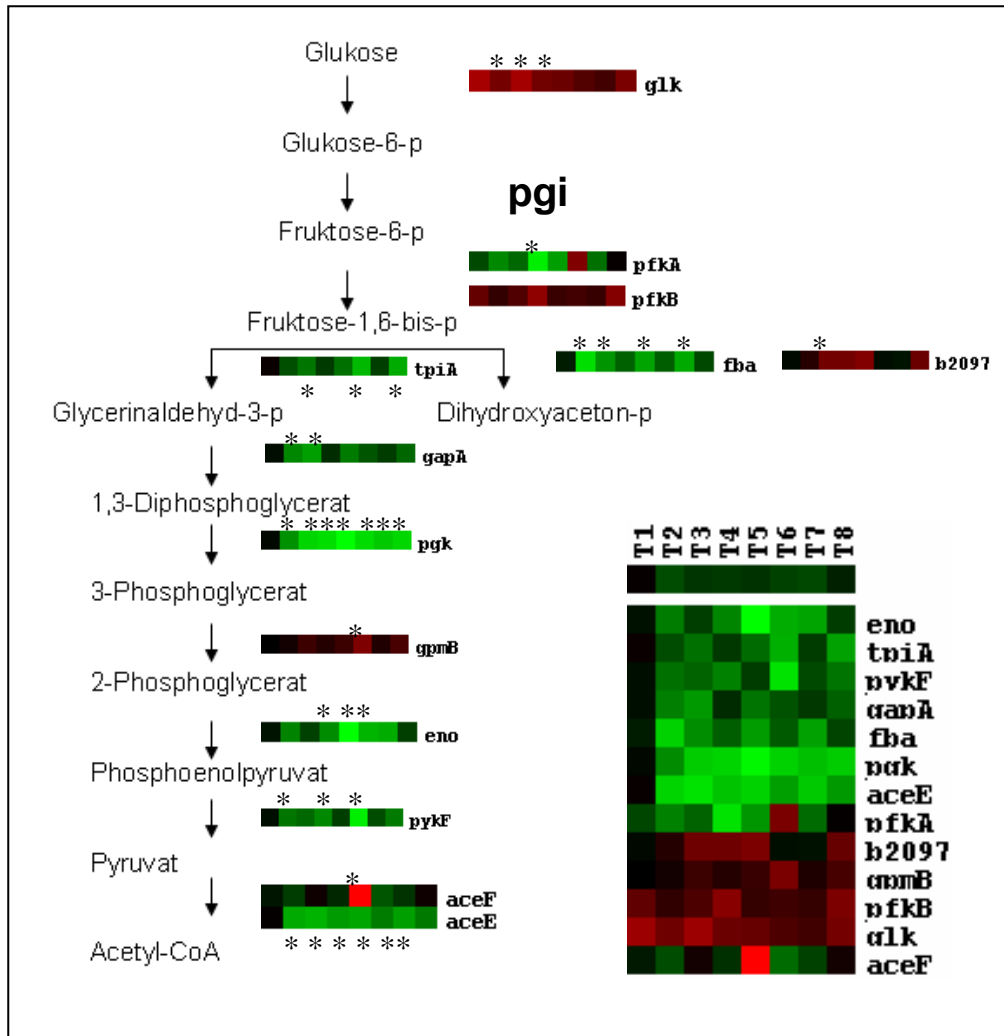
#### 3.3.2 Zentraler Kohlenstoffwechsel (Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, Tricarbonsäure-Zyklus, Glyoxylat-Zyklus und Atmung)

Glukose wird unter aeroben Bedingungen über verschiedene Transportsysteme (abhängig von der Glukose-Konzentration in der Umgebung) in die Zelle aufgenommen (Ferenci 1996) und über den Zentralen Kohlenstoffwechsel zunächst in C3-Körper (Pyruvat) gespalten und nachfolgend vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Dabei wird Energie in Form von ATP über Substratphosphorylierung sowie die Atmungsketten-Phosphorylierung gewonnen. Die Atmungsketten-Phosphorylierung wird durch die ATP-Synthase katalysiert. Dieser Enzymkomplex transportiert Protonen aus dem Periplasma ins Zytoplasma und phosphoryliert zeitgleich ADP zu ATP. Angetrieben wird die ATP-Synthase durch einen Protonengradienten, der über die Atmungskette aufgebaut wird. Verschiedene Enzymkomplexe, die Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH aus dem Zentralen Kohlenstoffwechsel beziehen, transportieren die Elektronen entsprechend ihres elektrochemischen Potentials und pumpen dabei Protonen aus dem Zytoplasma ins Periplasma. Weiterhin stellt der Zentrale Kohlenstoffwechsel Intermediärprodukte für Biosynthesen zur Verfügung (Schlegel 1992). Der Zentrale Kohlenstoffwechsel wird der Substratverfügbarkeit angepaßt und unterliegt daher einer strengen Regulation.

##### **3.3.2.1 Glykolyse (Fruktose-bisphosphat-Weg/Embden-Meyerhof-Parnas-Weg)**

Die Glykolyse stellt den am weitesten verbreiteten Abbauweg für Glukose zu Pyruvat in Bakterien dar. Pyruvat wird weiterhin über eine oxidative Decarboxylierung durch den Pyruvat Dehydrogenase Komplex zu Acetyl-CoA umgesetzt (Schlegel 1992). Über die Microarray-Analyse konnten mit Ausnahme der Umsetzung von Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat alle katalytischen Schritte der Glykolyse auf Transkriptomebene als reguliert identifiziert werden. Die Gene *pfkA* (Phosphofruktokinase 1), *tpiA* (Triosephosphat Isomerase), *fba* (Fruktosebisphosphat Aldolase), *gapA* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), *pgk* (Phosphoglycerat Kinase), *eno* (Enolase) und *pykF* (Pyruvatkinase 1), welche für die Enzyme der Glykolyse (angegeben in Klammern hinter dem betreffenden Gen) kodieren, sowie ein Gen des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes (*aceE*: Pyruvat Dehydrogenase UE1), zeigten überwiegend eine Herunterregulation im Vergleich zur Referenz. Signifikante Änderungen werden aus Abb. 3.19 ersichtlich. Lediglich die Isoenzyme *pfkB* (Phosphofruktokinase 2), *b2079* (Fruktosebisphosphat Aldolase) und *gpmB* (Phosphoglycerat Mutase 2) sowie ein weiteres Enzym des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes, *aceF* (Pyruvat Dehydrogenase UE2) wurden hochreguliert gefunden. Das Gen

*pgi* (Phosphoglucose Isomerase) wurde nicht reguliert. Die Glukokinase (*glk*), die Glukose intrazellulär zu Glukose-6-phosphat umsetzt, wurde hochreguliert. Die Ergebnisse des Transports von Glukose in die Zelle werden in Abschnitt 3.3.1 - „Transporter“ besprochen. Die Enzyme *Eno*, *Pgk*, *GapA* sowie *FbaA* können auch die Glukoneogenese katalysieren (Abb. 3.19).



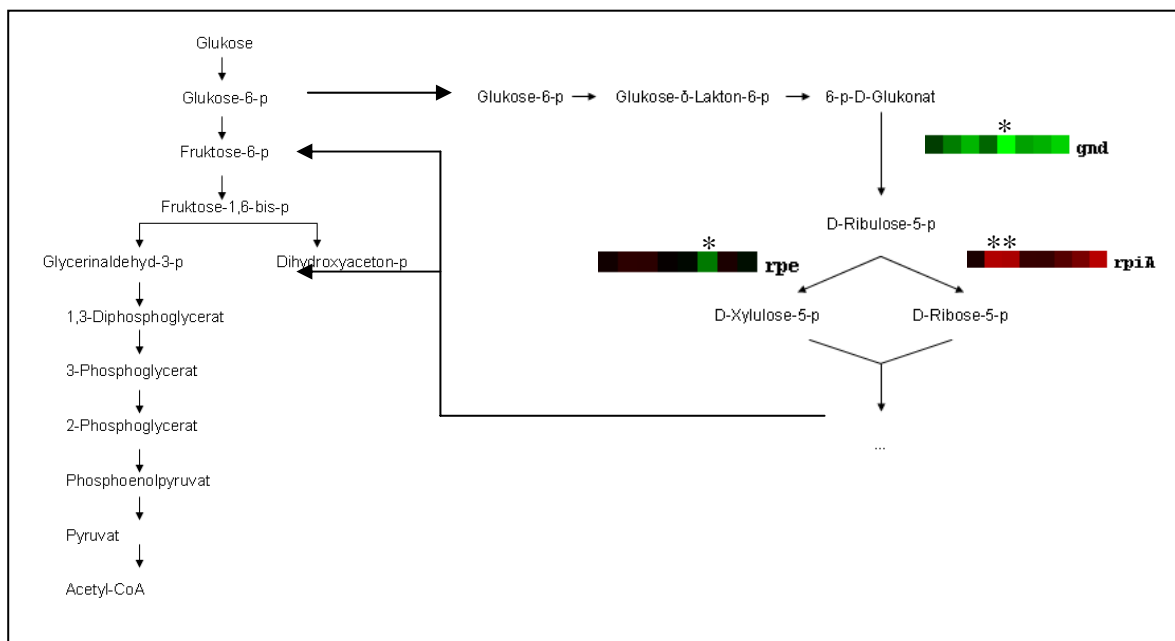
**Abb. 3.19: Glykolyse.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Glykolyse und die sie katalysierenden Enzyme und gegebenenfalls Isoenzyme, kodiert durch die Gene *glk* (Glukokinase), *pfkA* (Phosphofruktokinase 1), *pfkB* (Phosphofruktokinase 2), *tpiA* (Triosephosphat Isomerase), *fba* (Fruktosebisphosphat Aldolase), *b2097* (Fruktosebisphosphat Aldolase), *gapA* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogease), *pgk* (Phosphoglycerat Kinase), *gpmB* (Phosphoglycerat Mutase 2), *eno* (Enolase), *pykF* (Pyruvatkinase 1), *aceE* (Pyruvat Dehydrogenase UE1), *aceF* (Pyruvat Dehydrogenase UE2) im Zeitverlauf. Die grüne Farbe weist auf eine Herunterregulation im Vergleich zur Referenz hin, die rote Farbe weist auf eine Hochregulation im Vergleich zur Referenz hin. Ein Kästchen entspricht einem Zeitpunkt, ein Überblick ist im rechten unteren Bildausschnitt zu sehen. Signifikante Änderungen sind mit einem \* gekennzeichnet. *pgi*: Phosphoglucose Isomerase

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.2.2 Pentosephosphat-Weg und Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg

Der Pentosephosphatweg (PPP) und der Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (auch 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat-Weg - KDPG-Weg genannt) sind neben der Glykolyse die beiden weiteren Stoffwechselwege, über die *E. coli* Glukose-6-Phosphat oxidieren kann. Dabei werden Reduktionsäquivalente in Form von NADPH für Biosynthesen zur Verfügung gestellt (Schlegel 1992). Weiterhin stellt der PPP der Zelle Intermediate für den Anabolismus der Aminosäuren, Vitamine, Nukleotide und Zellwandbestandteile zur Verfügung (Sprenger 1995). Die Hauptaufgabe des KDPG-Weges hingegen ist das Einschleusen verschiedener Zuckersäuren (Glukonat, L-Idonat, Glukoronat, Galaktorunat u.a.) in den Stoffwechsel. Diese werden hierfür zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat abgebaut (<http://www.ecocyc.org> - Stand: Dezember 2005/, (Keseler et al. 2005)).

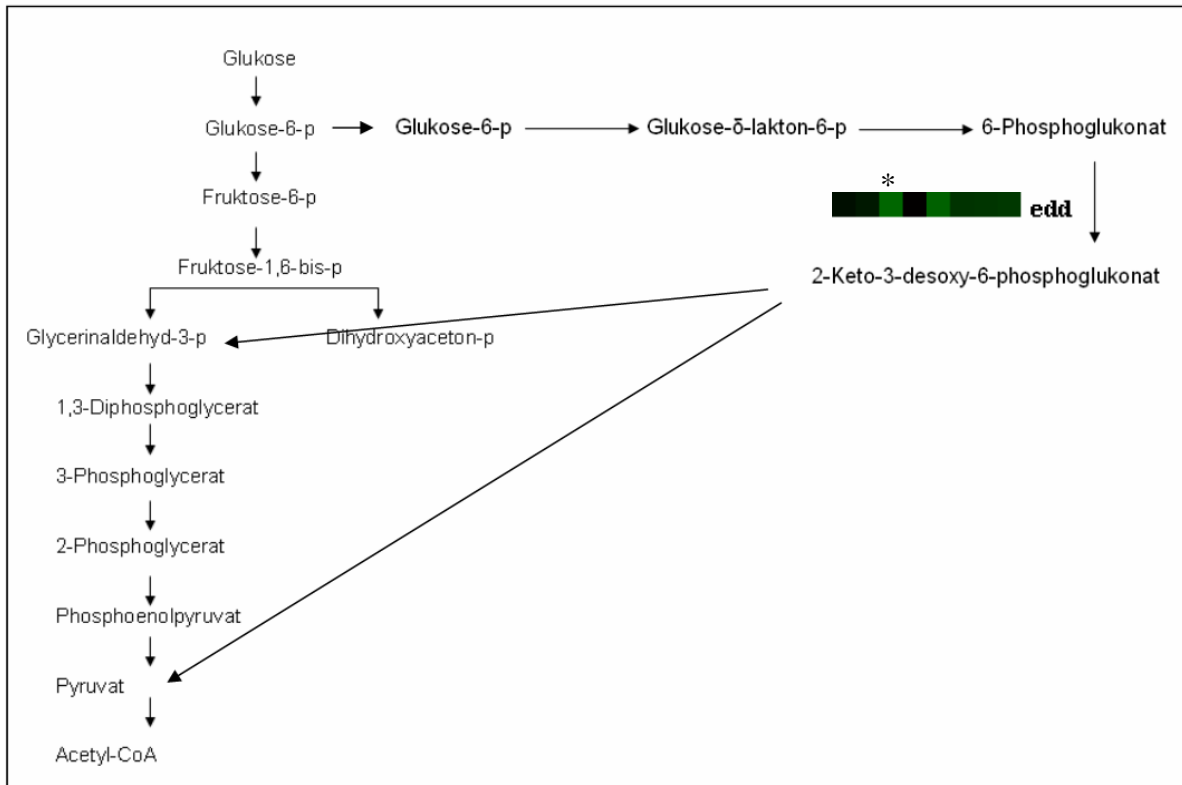
PPP: Gene der Phosphogluconat Dehydrogenase (*gnd*), Ribulosephosphat-3-Epimerase (*rpe*), sowie Ribose-5-Phosphat Isomerase A (*rpiA*) wurden differentiell reguliert.



**Abb. 3.20: Pentosephosphat-Weg (PPP).** Dargestellt sind die Schritte des PPP, deren Gene eine signifikante differentielle Expression in mindestens einem Zeitpunkt zur Referenz aufwiesen: *gnd* (6-Phosphogluconat Dehydrogenase), *rpe* (Ribulosephosphat-3-Epimerase), *rpiA* (Ribose-5-Phosphat Isomerase A). Die grüne Farbe weist auf eine Herunterregulation im Vergleich zur Referenz hin, die rote Farbe weist auf eine Hochregulation im Vergleich zur Referenz hin. Signifikante Änderungen sind mit einem \* gekennzeichnet.

KDPG-Weg: Die Phosphoglukonat Dehydratase (*edd*) wurde zum Zeitpunkt T3 signifikant herunterreguliert (Abb. 3.21).





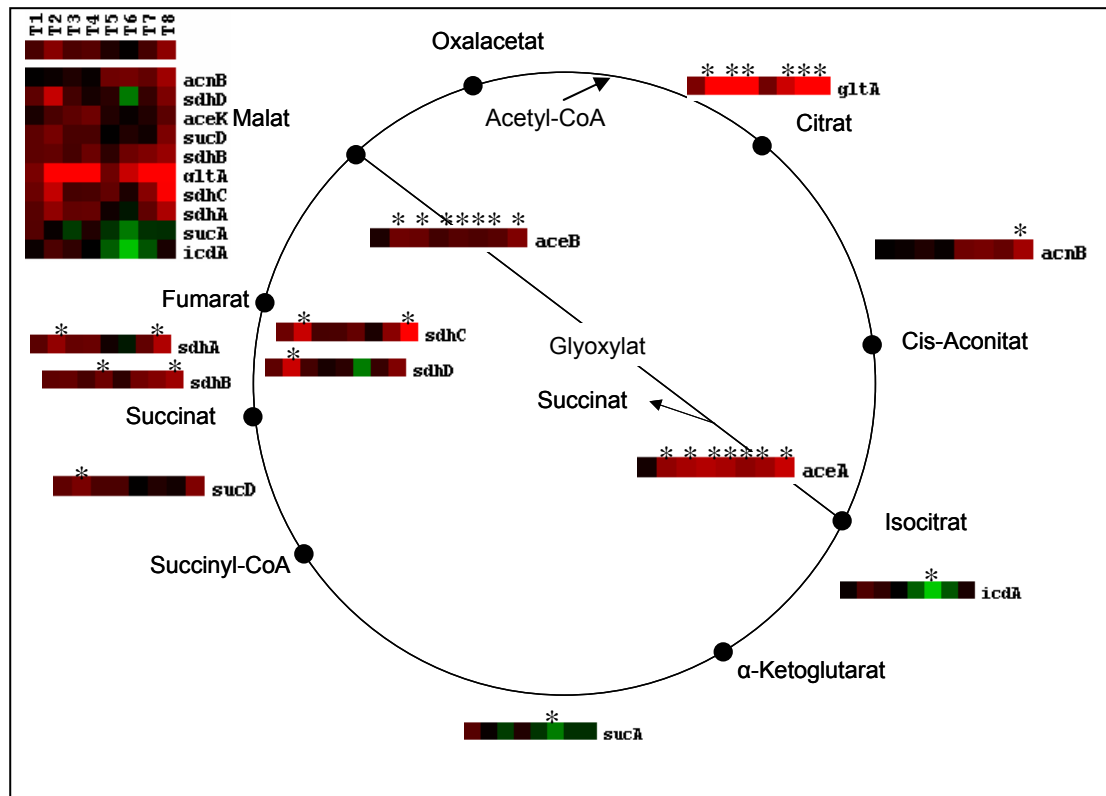
**Abb. 3.21: KDPG-Weg.** Dargestellt sind die Schritte des KDPG-Wegs. Das Gen *edd* (Phosphoglukonat Dehydratase) war signifikant differentiell exprimiert zum Zeitpunkt T3. Die grüne Farbe weist auf eine Herunterregulation im Vergleich zur Referenz hin, signifikante Änderungen sind mit einem \* gekennzeichnet.

### 3.3.2.3 Tricarbonsäure-Zyklus und Glyoxylat-Zyklus

Der Tricarbonsäure-Zyklus (TCA), auch Zitronensäure-Zyklus genannt, dient der Oxidation des Acetyl-CoA zu  $\text{CO}_2$  unter Abspaltung von Wasserstoff. Der Wasserstoff wird entweder direkt auf NAD(P) oder auf Chinon übertragen. Die Coenzyme transportieren den Wasserstoff in der Regel zu den Enzymen der Atmungskette. Für das Wachstum auf Acetat oder auf Verbindungen, die über Acetat abgebaut werden (Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe), verwendet die Zelle den Glyoxylat-Zyklus (auch Glyoxylsäure-Zyklus oder Krebs-Kornberg-Zyklus genannt) (Schlegel 1992).

Die Gene des TCA sowie des Glyoxylat-Zyklus wurden mit den Ausnahmen *icdA* (Isocitrat Dehydrogenase) und *sucA* (2-Oxoglutarat Decarboxylase) zu mindestens einem Zeitpunkt im Vergleich zur Referenz hochreguliert. Dies waren für den TCA die Gene *gltA* (Citrat Synthase), *acnB* (Aconitase), *sucD* (Succinyl-CoA-Synthetase), *sdhABCD* (Succinat Dehydrogenase) und für den Glyoxylat-Zyklus die Gene *aceA* (Isocitrat Lyase) und *aceB* (Malat Synthase). *icdA* und *sucA* wurden beide in Zeitpunkt T6 signifikant herunterreguliert im Vergleich zur Referenz und änderten sich sonst nicht (Abb. 3.22).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.22: TCA und Glyoxylat-Zyklus.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte des TCA sowie des Glyoxylat-Zyklus und die sie katalysierenden Enzyme im Zeitverlauf: *gltA* (Citrat Synthase), *acnB* (Aconitase), *icdA* (Isocitrat Dehydrogenase), *sucA* (2-Oxoglutarat Decarboxylase), *sucD* (Succinyl-CoA-Synthetase), *sdhABCD* (Succinat Dehydrogenase), *aceAB* (Isocitrat Lyase, Malat Synthase). Die grüne Farbe weist auf eine Herunterregulation im Vergleich zur Referenz hin, die rote Farbe weist auf eine Hochregulation im Vergleich zur Referenz hin. Ein Kästchen entspricht einem Zeitpunkt, ein Überblick ist im linken oberen Bildausschnitt zu sehen. Signifikante Änderungen sind mit einem \* gekennzeichnet.

#### 3.3.2.4 Atmungskette und ATP-Synthase

Unter aeroben Bedingungen oxidiert *E. coli* Glukose vollständig zu  $\text{CO}_2$  (Schlegel 1992). Die dabei gewonnenen Reduktionsäquivalente werden mit Hilfe von Coenzymen (NAD(P), FAD) über die Enzymkomplexe der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Diese Komplexe transportieren Wasserstoff ( $\text{H}^+$  und  $\text{e}^-$ ) oder Elektronen und sind in der Zellmembran lokalisiert. In *E. coli* sind an diesem Prozeß Primäre Dehydrogenasen und Terminale Oxidasen beteiligt. Als Elektronenüberträger fungiert weiterhin Ubichinon. Unter anaeroben Bedingungen vermag *E. coli* u.a. Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden oder aber auf gemischte Säurefermentation umzuschalten. Hierbei wird ATP lediglich über Substratphosphorylierung regeneriert. 29 Gene, die für an der Atmung beteiligte Proteine kodieren, waren im Vergleich zur Referenz in mindestens einem Zeitpunkt differentiell

exprimiert. 15 Gene hiervon wiesen eine erhöhte Expression auf, die übrigen eine erniedrigte (Tab. 3.6). Unter anderem wurden Untereinheiten des NADH Dehydrogenase I (*nuoABF*) Komplexes hochreguliert gefunden werden. Des Weiteren wurden Gene des Cytochrom b0 Komplexes (*cyoABCD*) herunterreguliert. Der Cytochrom b0 Komplex stellt eine der drei Terminalen Oxidasen in *E. coli* dar. Diese Oxidase wird unter hohen Sauerstoffkonzentrationen verwendet. Hochreguliert wurden hingegen unter anderem die Gene für den Cytochrom bd-I Komplex (*cydAB*). Dieser wird unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen verwendet. Ferner wurden Gene der ATP-Synthase (*atpAEFGH*) herunterreguliert.

Interessanterweise wurden trotz Abwesenheit von Nitrat im Medium und unter aeroben Bedingungen Untereinheiten der membrangebundenen Nitrat Reduktasen A und Z (*narG*, *narV*) differentiell exprimiert. Weiterhin wurde das Fermentations-/Atmungs-Umschaltprotein (*yafA*) zum Zeitpunkt T6 signifikant hochreguliert.

**Tab. 3.6: Atmung.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die die Atmung betreffen. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>hyfB</i>	Komponente B der Hydrogenase 4	0.18	0.12	1.27	0.00	0.00	-0.04	0.05	0.06
<i>napH</i>	UE von alternativer Chinolon Dehydrogenase	-0.03	0.08	0.21	-0.05	0.00	0.08	0.07	0.54
<i>b1590</i>	UE von Dimethylsulfoxid Reduktase	-0.36	0.13	0.04	0.03	0.01	0.23	0.09	0.54
<i>nrfB</i>	Nitrit Reduktase Komplex	0.03	0.34	-0.03	0.08	-0.07	0.02	0.08	0.25
<i>ldhA</i>	D-Lactat Dehydrogenase	0.08	0.93	0.05	0.00	-0.10	0.11	0.09	-0.11
<i>narG</i>	α-UE von Nitrat Reduktase A	-0.05	0.28	0.14	-0.07	0.10	0.57	0.08	0.03
<i>narG</i>	UE von alternativer Chinolon Dehydrogenase	-0.08	0.00	-0.07	0.19	0.27	0.61	0.20	0.20
<i>nuoF</i>	UE von NADH Dehydrogenase I	0.13	0.02	0.15	0.53	0.19	0.14	0.21	0.07
<i>b1588</i>	UE von Dimethylsulfoxid Reduktase	0.47	0.65	1.08	1.21	0.75	0.48	0.78	0.80
<i>nuoA</i>	UE von NADH Dehydrogenase I	0.38	0.61	0.59	0.73	0.33	0.25	0.20	0.84
<i>nuoB</i>	UE von NADH Dehydrogenase I	0.23	0.61	0.31	0.52	0.54	0.36	0.34	0.58
<i>cydB</i>	UE con Cytochrom bd-I terminale Oxidase UE II	0.38	0.51	0.33	0.56	0.43	0.08	0.23	0.46
<i>cydA</i>	UE con Cytochrom bd-I terminale Oxidase UE I	0.29	0.59	0.38	0.63	0.44	0.07	0.24	0.27
<i>hyfA</i>	Komponente A der Hydrogenase 4	0.21	0.04	0.14	0.31	0.26	0.19	0.33	-0.23
<i>dmsA</i>	UE von Dimethylsulfoxid Reduktase	0.00	-0.50	0.00	-0.12	0.04	0.07	0.36	0.03
<i>narV</i>	UE von Nitrat Reduktase Z	0.04	-0.25	-0.31	-0.02	-0.01	-0.17	-0.23	-0.72
<i>hypF</i>	Hydrogenase Reifungsprotein	-0.12	-0.02	-0.36	-0.18	-0.08	-0.19	-0.04	0.11
<i>hybC</i>	UE von Hydrogenase 2	-0.05	-0.10	-0.34	0.02	-0.12	-0.09	-0.23	-0.04
<i>cyoA</i>	UE von Cytochrom bo terminale Oxidase UE II	-0.05	-0.40	-0.36	-0.16	-0.27	-0.34	-0.12	-0.02
<i>cyoD</i>	UE von Cytochrom bo terminale Oxidase UE IV	0.10	-0.16	0.03	-0.15	-0.13	-0.74	-0.32	-0.06
<i>cyoB</i>	UE von Cytochrom bo terminale Oxidase UE I	0.02	-0.32	-0.33	-0.28	-0.72	-0.30	-0.59	-0.52
<i>cyoC</i>	UE von Cytochrom bo terminale Oxidase UE III	0.23	-0.06	-0.34	-0.46	-0.73	-1.02	-0.86	-0.49
<i>atpH</i>	delta UE von ATP Synthase F1 Komplex	0.22	-0.27	-0.29	-0.42	-0.81	-1.04	-0.90	-0.80
<i>atpG</i>	gamma UE von ATP Synthase F1 Komplex	0.19	-0.21	-0.42	-0.25	-0.40	-0.57	-0.47	-0.31
<i>atpF</i>	UE von ATP Synthase F0 Komplex b	-0.14	-0.55	-0.37	-0.46	-0.86	-1.06	-0.76	-0.86
<i>atpA</i>	Alpha UE von ATP Synthase F1 Komplex	-0.07	-0.51	-0.58	-0.70	-0.82	-0.94	-1.00	-1.19
<i>atpE</i>	UE von ATP Synthase F0 Komplex c	-0.05	-0.25	0.02	-0.35	-0.51	-0.48	-0.56	-0.44
<i>torA</i>	UE von Trimethylamin N-Oxid Reduktase	-0.05	-0.09	-0.03	-0.15	-0.26	-0.37	-0.09	-0.16
<i>yafA</i>	Fermentation/Atmung Umschaltprotein	0.12	0.04	-0.10	-0.36	-0.28	0.40	-0.24	0.03

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.3.3 Anabolismus

Unter dem Begriff Anabolismus faßt man Stoffwechsel-Reaktionen zusammen, die dem Aufbau von Zellbestandteilen dienen. Zellbestandteile werden während des Wachstums benötigt. Der Anabolismus verbraucht Energie in Form von ATP sowie Reduktionskraft, vorwiegend in Form von NADPH (Schlegel 1992).

121 Gene, welche für anabole Enzyme kodieren, waren im Vergleich zur Referenz in mindestens einem Zeitpunkt signifikant differentiell exprimiert. Biosynthese-Enzyme aller makromolekularen Gruppen waren betroffen (Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydrate (Glykogen und Trehalose), Coenzyme und prosthetische Gruppen, Nukleotide (*de novo*- und „Salvage Pathway“-Biosynthese) sowie die Synthese von Zellwand- und Membranbestandteilen. Im Vergleich zur Referenz waren Gene biosynthetischer Enzyme überwiegend vermindert abgeschrieben worden (101 Gene der 121 Gene in mindestens einem Zeitpunkt). Im Folgenden wird ein tabellarischer Überblick über die Gene sowie deren Änderungen gegeben (siehe Tab. 3.7 bis Tab. 3.13).

##### **3.3.3.1 Aminosäure- und Polyamin-Biosynthese**

Unter limitierenden Bedingungen spielt die Aminosäureverfügbarkeit für die Zelle eine entscheidende Rolle. Der Aminosäuremangel gilt als einer der entscheidenden Auslöser der Stringenten Kontrolle (Cashel et al. 1996). Unter Kohlenhydrat-Limitierung konnte eine Regulation verschiedener Aminosäure-Biosynthese-Enzyme detektiert werden. 32 Gene kodierten u.a. für die Biosynthese-Stoffwechsellzyme der Aminosäurefamilien: (I) Glutamat-Familie (Glutamin (*gln*) und Arginin (*arg*)), (II) Familie der Aromaten (Phenylalanin (*aro*) und Tryptophan (*trp*)), (III) Aspartat-Familie (Threonin (*thr*) und Isoleucin (*ile*)), (IV) Serin-Familie (Cystein (*cys*)) sowie (V) Pyruvat -Familie (Valin (*ilv*)) wurden, oft über den gesamten betrachteten Zeitraum, mit Ausnahme von T1, im Vergleich zur Referenz herunterreguliert. Acht Gene für einzelne Biosynthese-Stoffwechsellzyme der Aminosäurefamilien: (I) Glutamat-Familie (Arginin (*argG*)), (II) Aspartat-Familie (Isoleucin und Methionin (*yagD* und *metL*)), (III) Pyruvat-Familie (Valin (*ilv*)) sowie (IV) Familie der Aromaten (Tryptophan (*trpL*)) wurden im Vergleich zur Referenz hochreguliert. Ein Gen der Valin-Biosynthese (*ilvN*) war bereits zum Zeitpunkt T1 hochreguliert. Einen Überblick gibt Tab. 3.7.

**Tab. 3.7: Aminosäure- und Polyamin Biosynthese.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Aminosäure- und Polyamin Biosynthese Enzyme kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yagD</i>	Homocystein Methyltransferase	-0.06	0.08	0.03	-0.06	0.11	0.67	0.23	0.04
<i>argG</i>	Argininosuccinat Synthetase	-0.26	0.04	0.17	0.14	-0.02	0.56	0.07	0.40
<i>trpL</i>	trp Operon leader Peptid	0.17	-0.03	0.00	-0.09	-0.01	0.47	-0.16	-0.11
<i>ilvN</i>	Acetohydroxybutanoat Synthase I	0.58	0.25	0.60	0.46	0.12	0.32	0.19	0.24
<i>ilvB</i>	Acetohydroxybutanoat Synthase I	0.38	0.59	0.33	0.28	0.26	0.27	0.26	0.48
<i>argI</i>	UE von Ornithin Carbamoyltransferase	0.04	-0.18	0.62	0.81	0.04	-0.14	0.18	0.37
<i>metA</i>	UE von Homoserin O-Succinyltransferase	-0.06	0.04	0.43	0.11	0.16	0.08	0.23	0.26
<i>alr</i>	Alanin Racemase	-0.02	0.02	0.51	0.09	-0.10	0.21	0.04	0.37
<i>thrA</i>	UE von Aspartat Kinase I	-0.05	0.12	-0.39	-0.20	-0.01	-0.24	0.17	-0.39
<i>aroK</i>	Schikimisäure Kinase I	-0.14	-0.03	-0.35	-0.14	-0.02	-0.19	-0.04	-0.11
<i>argC</i>	UE von N-Acetylglutamat Kinase	-0.13	-0.32	0.09	0.03	-0.48	-0.45	-0.07	-0.20
<i>argB</i>	UE von N-Acetylglutamat Kinase	-0.45	-1.12	0.41	0.06	-1.01	-0.78	-0.41	-0.19
<i>aroB</i>	UE von 3-Dehydroquinat Synthase	-0.11	-0.08	0.10	-0.36	-0.30	-0.53	-0.18	-0.02
<i>speD</i>	Adenosylmethionin Decarboxylase	-0.03	-0.27	-0.42	-0.16	-0.31	-0.01	-0.11	-0.19
<i>serA</i>	UE von 2-Oxoglutarat Reduktase	0.08	-0.09	-0.11	-0.38	-0.40	-0.11	-0.29	-0.22
<i>ilvH</i>	Acetolactat Synthase III	0.10	-0.02	-0.25	-0.45	-0.25	-0.03	-0.19	-0.17
<i>carB</i>	UE von Carbamoylphosphat Synthetase	-0.02	-0.59	-0.29	-0.53	-0.54	-0.30	-0.03	-0.34
<i>ilvG_1</i>	IlvG_1, Pseudogen, Isoleucin/Valin Biosynthese	0.06	-0.37	-0.43	-0.24	-0.11	-0.30	-0.18	-0.30
<i>cysK</i>	O-Acetylserine (thiol)-Lyase A	0.03	-0.46	-0.46	-0.29	-0.32	-0.34	-0.27	-0.12
<i>ilvM</i>	Acetohydroxybutanoat Synthase II	0.18	-0.20	-0.14	-0.38	-0.27	-0.55	-0.35	-0.22
<i>trpD</i>	Anthranilat Synthase Komponente II	-0.03	-0.55	-0.69	-0.32	-0.78	-0.48	-0.37	-0.62
<i>trpE</i>	Anthranilat Synthase Komponente I	0.22	-0.32	-0.28	-0.55	-0.77	-0.49	-0.45	-0.28
<i>trpC</i>	Indol-3-Glycerol Phosphat Synthase	-0.06	-0.30	-0.74	-0.69	-1.13	-1.20	-1.19	-0.76
<i>trpB</i>	Tryptophan Synthase, beta UE	0.00	-0.40	-0.73	-0.77	-1.48	-1.29	-1.54	-1.12
<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinsäure Reduktase	0.12	-0.38	-0.42	-0.32	-0.73	-0.45	-0.78	-0.70
<i>metE</i>	UE von Homoserin O-Succinyltransferase	0.04	-0.23	-0.71	-0.63	-1.07	-0.59	-0.55	-0.81
<i>speE</i>	UE von Spermidin Synthase	-0.38	-0.44	-0.63	-0.58	-0.92	-0.58	-0.51	-0.60
<i>ilvC</i>	Acetohydroxysäure Isomeroxydase	-0.28	-0.76	-0.36	-0.83	-1.03	-1.09	-0.89	-0.90
<i>aroA</i>	3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyltransferase	-0.05	-0.34	-0.21	-0.46	-0.53	-0.51	-0.48	-0.47
<i>aroG</i>	2-Dehydro-3-Deoxyphosphoheptonat Aldolase	-0.34	-1.19	-1.07	-1.43	-2.57	-1.83	-1.63	-1.42
<i>thrB</i>	UE von Homoserin Kinase	-0.03	-0.64	-0.73	-0.92	-0.93	-0.95	-0.45	-0.74
<i>thrC</i>	Threonine Synthase	0.12	-1.13	-1.19	-1.64	-1.65	-1.38	-1.30	-1.33
<i>gltB</i>	UE von Glutamat Synthase	0.21	-0.83	-1.11	-1.35	-1.79	-1.49	-1.10	-1.15
<i>carA</i>	UE von Carbamoylphosphat Synthetase	-0.42	-1.94	-1.42	-2.01	-2.29	-1.54	-1.50	-1.80
<i>hisC</i>	UE von Histidin-Phosphat Aminotransferase	-0.06	-0.18	-0.07	-0.41	-0.40	-0.31	-0.11	-0.12
<i>hisF</i>	Imidazol Glycerol Phosphat Synthase	-0.21	-0.38	-0.56	-0.22	-0.30	-0.93	-0.50	-0.53
<i>dapF</i>	Diaminopimelinsäure Epimerase	-0.04	-0.22	-0.24	-0.09	-0.24	-0.49	-0.35	-0.28
<i>ddlA</i>	D-Alanine-D-Alanine Ligase A	0.07	-0.45	-0.15	-0.17	-0.23	0.02	-0.33	0.01
<i>speB</i>	UE von Agmatinase	0.06	-0.09	0.00	-0.32	-0.09	0.05	0.11	-0.01
<i>glnB</i>	Glutamine Synthetase PII	-0.21	-0.13	-0.43	0.22	0.04	-0.14	0.00	0.05

### 3.3.3.2 Fettsäuren

Fettsäuren sind Bestandteile biologischer Membranen, spielen aber auch eine Rolle bei der Signalübertragung (Stryer 1996). Die Fettsäurebiosynthese umfaßt zahlreiche Teilschritte. Zunächst wird Malonyl-CoA aus AcetylCoA und Kohlensäure (vorliegend als  $H^+ + HCO_3^-$ ) unter ATP-Verbrauch synthetisiert. Dieser Schritt wird von der Acetyl-CoA-Carboxylase (*accB*, *accD*, *accA*, *accC*) katalysiert. Malonyl-CoA wird daraufhin weiter zu langkettigen Fettsäuren umgesetzt. Diese nachfolgenden Reaktionen werden durch den Fettsäure-

### 3. Ergebnisse

Synthase Komplex, bestehend aus verschiedenen Untereinheiten, katalysiert. Folgende Gene kodieren für Proteine des Komplexes: *acpP*, *fabD*, *fabB*, *fabF*, *fabH*, *fabG*, *fabA*, *fabZ*, sowie *fabI*.

Fettsäuren scheinen eine entscheidende Rolle bei der Kohlenhydrat-Limitierung, speziell der Stringenten Kontrolle, zu spielen. Seyfzadeh und Kollegen konnten mittels Mutanten zeigen, dass ein Fettsäuremangel, ausgelöst durch eine Mutation im Fettsäurestoffwechsel, eine zumindest zum Teil SpoT-abhängige ppGpp Synthese auslöst, trotz vorhandener Kohlenhydrat-Quelle und 20 Aminosäuren im Medium (Seyfzadeh et al. 1993).

Vier Gene des Fettsäure-Synthase Komplexes wurden im Vergleich zur Referenz zu verschiedenen Zeitpunkten ausschließlich signifikant herunterreguliert. Dies waren die Gene *fabG*, *fabZ* und *fabD* sowie *acpP*. Eine Ausnahme hingegen bildete das Gen der Beta-ketoacyl-ACP Synthase II (*fabF*). Dieses wurde zum Zeitpunkt T4 signifikant hochreguliert (siehe Tab. 3.8; bezüglich *acpP* siehe auch 3.3.3 „Anabolismus“). Die Beta-ketoacyl-ACP Synthase II katalysiert neben der Beta-ketoacyl-ACP Synthase I (*fabB*) und der Beta-ketoacyl-ACP Synthase III (*fabH*) - allesamt Untereinheiten des Fettsäure-Synthase Komplexes - die initiale Kondensationsreaktion der Fettsäure-Biosynthese (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)).

Weiterhin wurde eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase (*accB*) von Zeitpunkt T2 bis T8 signifikant herunterreguliert (siehe auch 3.3.3 „Anabolismus“).

**Tab. 3.8: Fettsäuren.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Fettsäurebiosynthese-Enzyme kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>fabF</i>	Beta-ketoacyl-ACP synthase II	0.00	-0.33	-0.22	0.37	-0.22	0.12	-0.06	0.33
<i>fabG</i>	Beta-ketoacyl Reductase	0.00	-0.15	0.03	-0.07	-0.57	-0.74	-0.23	-0.03
<i>fabZ</i>	Beta-Hydroxyacyl-ACP Dehydratase	-0.05	-0.10	-0.24	0.03	-0.06	-0.57	-0.34	-0.53
<i>fabD</i>	Malonyl-CoA-ACP Transacylase	0.01	-0.20	-0.51	-0.04	-0.07	-0.42	-0.37	-0.52

#### 3.3.3.3 Zellwand und Membran

Zellmembranen schützen die Zelle vor zahlreichen äußeren Faktoren und beherrbergen den Bewegungsapparat der Zelle. Darüber hinaus beherrbergen sie Transportsysteme zur Nährstoffaufnahme sowie Entgiftung und stellen den Ort essentieller biochemischer Prozesse wie der oxidativen Phosphorylierung, der Membran- und Zellwand-Biosynthese, der DNA-Replikation sowie der Zellteilung dar. All diese Aktivitäten hängen von einer adäquaten Lipid-Zusammensetzung der Zellmembran ab. Unter Kohlenhydrat-Limitierung

kommt es zu einer Reorganisation der Lipid-Zusammensetzung. Unter anderem steigt der Anteil gesättigter Fettsäuren. Die Reorganisation ist ppGpp-abhängig (DiRusso und Nystrom 1998).

27 Gene für Biosynthese-Enzyme von Membranbestandteilen wurden signifikant differentiell reguliert. Betroffen waren u.a. Gene der Murein-Biosynthese (*amiA*, *mrcA* und *murl*), Gene der Oberflächenantigen-Biosynthese (*ugd*, *rfaL*, *rfaABCD*, *rfaC*, *wecB*, *rfaA*, *yrbH*, *rffG* und *wzc*), ein Gen der Lipopolysaccharid-Biosynthese (*kdsC*) sowie Gene der Phospholipid-Biosynthese (*pgpA* und *pssA*). Des Weiteren sind hier auch membranassoziierte Proteine aufgeführt (*hemM*, *mlpA*, *rlpB*, *pspD*, *uidC*, *ydeB*, *yiaB* sowie *ompX*) (siehe Tab. 3.9).

**Tab. 3.9: Zellwand und Membran.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme kodieren, welche die Zellwand- und Membranbiosynthese beeinflussen. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>entC</i>	Isochorisminsäure Synthase	-0.01	-0.13	0.26	-0.02	-0.03	0.03	0.03	-0.05
<i>wecE</i>	Transaminase	-0.12	-0.03	-0.05	-0.04	0.21	0.44	0.16	-0.14
<i>dniR</i>	Murein Transglycosylase D	-0.16	-0.33	-0.13	0.15	0.11	0.35	-0.01	-0.16
<i>ugd</i>	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase	0.17	0.36	0.59	0.61	0.53	0.30	0.58	0.72
<i>crcA</i>	PagP Homodimer	0.05	0.12	0.28	0.16	0.10	0.55	0.33	0.47
<i>b2060</i>	Tyrosinkinase	-0.02	0.09	0.09	0.06	0.03	0.62	0.04	0.10
<i>pgpA</i>	Phosphatidylglycerophosphatase A	-0.03	-0.02	0.29	0.26	0.00	0.63	0.24	0.12
<i>pssA</i>	Phosphatidylserin Synthase	-0.16	0.35	0.12	-0.01	-0.07	0.09	0.04	0.16
<i>amiA</i>	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase 1	-0.20	-0.12	-0.37	0.02	-0.13	0.03	-0.17	-0.34
<i>yrbI</i>	Phosphatase (Monomer)	-0.07	-0.18	0.04	-0.12	-0.59	-0.22	-0.10	-0.05
<i>yrbH</i>	Arabinose 5-Phosphat Isomerase (Monomer)	-0.07	-0.21	-0.19	-0.16	-0.58	-0.23	-0.03	-0.20
<i>yeaF</i>	Scaffold Protein	-0.10	0.07	0.05	-0.11	-0.41	-0.38	-0.56	-0.61
<i>rfaD</i>	UE von dTDP-L-Rhamnose Synthetase	0.01	-0.50	-0.44	-0.63	-0.65	-0.70	-0.84	-0.66
<i>rfaI</i>	Galactosyltransferase	-0.07	-0.47	-0.11	-0.33	-0.63	-0.70	-0.57	-0.37
<i>rfaL</i>	O-Antigen Ligase	-0.18	-0.31	-0.09	-0.43	-0.37	-0.09	-0.42	-0.24
<i>rfaA</i>	dTDP-Glucose Pyrophosphorylase	-0.21	-0.09	-0.45	-0.47	-0.56	0.10	-0.68	-0.42
<i>rffG</i>	dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase 2	-0.06	-0.23	-0.26	-0.25	-0.37	-0.11	-0.24	-0.27
<i>rfaB</i>	UE von dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase	-0.07	-0.49	-0.45	-0.54	-0.73	0.02	-0.69	-0.62
<i>cvpA</i>	Membranprotein für Colicin V Produktion	-0.25	-0.82	-0.43	-0.28	-0.27	-0.30	-0.06	-0.36
<i>murl</i>	UE von Glutamat Racemase UE	-0.04	-0.21	-0.39	-0.09	-0.17	-0.38	-0.09	-0.23
<i>rfaC</i>	UE von dTDP-L-Rhamnose Synthetase	-0.35	-0.38	-0.10	-0.16	-0.20	-0.05	-0.06	0.08
<i>lgt</i>	Diacylglyceryl Transferase	0.00	0.03	0.30	0.07	0.04	-0.62	-0.03	-0.04
<i>mrcA</i>	Peptidoglycan Synthetase; Penicillin Bindeprotein 1A	0.03	-0.27	0.08	-0.16	-0.03	-0.49	-0.07	-0.20
<i>wbbH</i>	O-Antigen Polymerase	-0.09	-0.19	0.35	-0.10	-0.30	-0.30	-0.31	0.00
<i>wecB</i>	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase	-0.10	0.23	-0.20	-0.16	-0.12	-0.46	-0.18	0.03
<i>galT</i>	Uridyltransferase	0.01	0.13	-0.56	-0.04	0.13	-0.21	0.06	-0.14
<i>rlpB</i>	Lipoprotein RlpB	-0.02	0.11	-0.75	-0.21	0.00	0.04	0.08	-0.02

### 3.3.3.4 Nukleotid-Biosynthese

Nukleotide (Purine und Pyrimidine) spielen bei fast allen biochemischen Prozessen eine Schlüsselrolle (Stryer 1996). Zum einen stellen sie aktivierte Vorstufen der RNA und DNA dar, zum anderen treten sie als aktivierte Zwischenprodukte bei vielen Biosynthesen auf



### 3. Ergebnisse

(z.B. UDP-Glukose für Glykogen). Ferner wirken sie als metabolische Regulatoren (z.B. cAMP) und sind Bestandteile der Coenzyme NAD, FAD und CoA. Nicht zu vergessen sei hier auch die bedeutende Rolle des ATP als Energieüberträger oder auch die Rolle des ppGpp als Modulator der Genregulation.

Nukleotide können aus Aminosäuren, Tetrahydrofolsäurederivaten,  $\text{NH}_4^+$  sowie  $\text{CO}_2$  gebildet werden (*de novo* Biosynthese) oder aber durch die Wiederverwertung vorgefertigter Basen („Salvage Pathway“) (Stryer 1996).

#### 3.3.3.5 Purine und Pyrimidine (*de novo*)

21 Gene der *de novo* Purin- und Pyrimidin-Biosynthese wurden nahezu über den gesamten Zeitverlauf signifikant herunterreguliert. Ausgenommen war der Zeitpunkt T1. Eine Ausnahme stellte eine Untereinheit der Ribonukleosid-diphosphat Reduktase II dar, das Gen *nrdF* war zum Zeitpunkt T5 signifikant herunterreguliert. Die Ribonukleosid-diphosphat Reduktase II katalysiert die Umsetzung von CDP zu dCDP. Details sind Tab. 3.10 zu entnehmen.

**Tab. 3.10: Purine und Pyrimidine (*de novo* Synthese).** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme der *de novo* Synthese von Purinen und Pyrimidinen kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>nrdF</i>	UE von Ribonukleoside-diphosphat Reduktase II	0.08	0.19	0.25	0.46	0.64	0.35	0.34	0.08
<i>purA</i>	Adenylosuccinat Synthase	-0.16	-0.06	-0.11	0.15	0.10	-0.46	-0.22	-0.32
<i>b2873</i>	Phenylhydantoinase Monomer	-0.24	-0.14	-0.44	0.00	-0.35	0.12	-0.04	0.01
<i>purN</i>	UE von Phosphoribosylformylglycinamid Ligase	-0.16	-0.09	-0.23	-0.05	-0.18	-0.49	-0.07	0.04
<i>pyrF</i>	Orotidine-5'-Phosphat-Decarboxylase	-0.15	-0.12	-1.15	-0.66	-0.38	-0.86	-0.21	-0.49
<i>prsA</i>	Ribose-Phosphat Diphosphokinase	-0.16	-0.42	-0.70	-0.15	-0.24	-0.37	-0.44	-0.40
<i>grxA</i>	oxidiertes Glutaredoxin	-0.13	-0.33	-0.06	-0.19	-0.25	-0.13	-0.12	-0.07
<i>dut</i>	dUTP Pyrophosphatase	-0.15	-0.14	-0.20	-0.39	-0.23	-0.25	-0.33	-0.07
<i>purU</i>	Formyltetrahydrofolat Deformylase	-0.14	-0.32	-0.46	-0.63	-0.62	-0.52	-0.76	-0.37
<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	0.00	-0.22	-0.36	-0.45	-0.48	-0.28	-0.14	-0.24
<i>purF</i>	Amidophosphoribosyl Transferase	-0.13	-0.71	-0.93	-0.75	-0.75	-0.43	-0.63	-0.74
<i>guaB</i>	IMP Dehydrogenase	-0.27	-0.76	-0.97	-0.60	-0.85	-0.65	-0.40	-0.61
<i>pyrH</i>	Uridylat Kinase	-0.09	-1.01	-0.83	-0.85	-0.97	-0.92	-0.78	-0.75
<i>pyrB</i>	Aspartat Carbamoyltransferase	0.13	-0.71	-0.46	-0.65	-0.68	-0.69	-0.55	-0.70
<i>adk</i>	Adenylyl Kinase, Purin Biosynthese	-0.02	-0.49	-0.38	-0.91	-0.97	-0.75	-0.63	-0.70
<i>guaC</i>	UE von GMP Reduktase	-0.06	-0.47	-0.49	-0.63	-0.87	-0.68	-0.66	-0.43
<i>gmk</i>	Desoxyguanylat Kinase	-0.02	-0.29	-0.15	-0.32	-0.38	-0.47	-0.33	-0.15
<i>pyrI</i>	Aspartat Carbamoyltransferase	0.15	-0.95	-0.68	-1.31	-0.72	-0.75	-0.74	-0.72
<i>guaA</i>	GMP Synthase	0.13	-0.28	-0.19	-0.54	-0.55	-0.47	-0.26	-0.15
<i>purM</i>	UE von Phosphoribosylformylglycinamid Ligase	-0.27	-0.73	-0.40	-0.43	-0.44	-0.58	-0.39	-0.63
<i>purE</i>	N5-Carboxyaminoimidazol Ribonukleotid Mutase UE	-0.19	-0.63	-0.14	-0.41	-0.33	-0.18	-0.26	-0.52
<i>pyrG</i>	CTP Synthetase	-0.32	-0.39	-0.26	-0.50	-0.73	-0.71	-0.44	-0.14



### 3.3.3.6 Purine und Pyrimidine („Salvage Pathway“)

Vier Gene, die für Enzyme des „Salvage Pathways“ der Purin- und Pyrimidin-Synthese kodieren, wurden im Vergleich zur Referenz herunterreguliert. Die Gene *udp* und *deoA* hingegen wurden hochreguliert (Tab. 3.11).

**Tab. 3.11: Purine und Pyrimidine („Salvage Pathway“).** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme des Salvage Pathways kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>cdd</i>	Cytidin Desaminase	0.09	-0.14	0.01	-0.36	-0.12	-0.20	-0.23	-0.61
<i>cmk</i>	Cytidilat Kinase	-0.02	-0.72	-0.41	-0.68	-0.77	-0.85	-0.40	-0.29
<i>hpt</i>	Guanin Phosphoribosyltransferase	-0.02	-0.19	-0.16	-0.54	-0.38	-0.02	-0.39	-0.22
<i>codA</i>	Cytosin Desaminase	-0.15	-0.67	-0.44	-0.84	-0.86	-0.14	-0.75	-0.74
<i>udp</i>	UE von Uridin Pphosphorylase	0.22	0.18	0.22	0.39	0.33	0.04	0.11	0.13
<i>deoA</i>	Thymidine Phosphorylase / Uracil Phosphorylase	0.01	-0.04	-0.06	-0.04	0.09	0.51	-0.05	0.20

### 3.3.3.7 Glykogen- und Trehalose-Biosynthese

*E. coli* vermag bei ausreichenden Glukosekonzentrationen im Medium Glykogen zu synthetisieren. Es wird angenommen, dass Glykogen in *E. coli* als Speicher für Glukose dient (Preiss et al. 1983). Drei Enzyme sind für die Glykogen-Synthese notwendig: die Glukose-1-phosphat-adenyltransferase (*glgC*), die Glykogen-Synthase (*glgB*) sowie das Glykogen verzweigende Enzym (*glgA*) (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)). Das Gen der Glykogen-Synthase wurde in T3 signifikant herunterreguliert, das Gen des Glykogen verzweigenden Enzyms (*glgA*) wurde in T6 signifikant herunterreguliert.

Neben der Glykogen-Biosynthese war die Biosynthese des Disaccharids Trehalose auf Transkriptomebene reguliert. Das Trehalose Biosynthese-Gen *otsB* war zum Zeitpunkt T2 signifikant hochreguliert identifiziert worden (Tab. 3.12). Dieses kodiert für die Trehalose-6-phosphat Phosphatase und katalysiert zusammen mit der Trehalose-6-phosphat Synthase (*otsA*) die Umsetzung von Glukose-6-phosphat und UDP-Glukose zu Trehalose (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)). Diese Gene werden bei osmotischem Stress (Giaever et al. 1988) sowie beim Eintritt in die stationäre Phase (Hengge-Aronis et al. 1991) induziert.

### 3. Ergebnisse

---

**Tab. 3.12: Glykogen- und Trehalose Biosynthese.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme der Glykogen- und Trehalose Biosynthese. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>glgB</i>	Glycogen branching Enzyme	-0.22	-0.23	-0.30	0.03	-0.36	-0.22	-0.09	-0.04
<i>otsB</i>	Trehalose-6-Phosphat Phosphatase	0.00	0.30	0.06	-0.04	0.23	0.15	0.32	0.22
<i>glgA</i>	UE von Glycogen Synthase	0.03	0.33	0.01	0.07	0.04	-0.65	0.00	0.21

#### 3.3.3.8 Coenzyme, Prothetische Gruppen und Elektronenüberträger

Zur Aufnahme und Weiterreichung von Substratbausteinen wie z.B. Wasserstoff, Methylgruppen oder auch Aminogruppen verwenden Enzyme niedermolekulare Verbindungen, die Coenzyme und Prothetischen Gruppen. Coenzyme übernehmen Substratbruchstücke und dissoziieren daraufhin wieder vom Protein ab, wohingegen Prothetische Gruppen beim Übertragen der Bruchstücke fest mit dem Enzym verbunden bleiben (Schlegel 1992). Signifikant herunterreguliert im Vergleich zur Referenz konnten Biosynthese-Gene u.a. der Coenzyme und Prothetischen Gruppen FMN, FAD, NAD, Biotin und Formyl-Tetrahydrofolat gefunden werden.

Ubichinon-Biosynthesegene wurden sowohl hoch- als auch herunterreguliert (Tab. 3.13). Ubichinone sind elektronenübertragende Komponenten der Atmungskette (Schlegel 1992).

**Tab. 3.13: Coenzyme, Prothetische Gruppen und Elektronenüberträger.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Coenzyme, Prothetische Gruppen und Elektronenüberträger kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ygbB</i>	2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphat Synthase	0.18	-0.08	-0.25	0.06	-0.07	-0.65	0.18	-0.05
<i>folC</i>	Dihydrofolsäure Synthetase	0.01	0.08	0.50	-0.05	0.10	-0.75	0.15	0.15
<i>ribA</i>	GTP Cyclohydrolase II	-0.02	0.01	0.02	-0.63	0.02	0.44	-0.24	-0.12
<i>pabC</i>	Para-Aminobenzoat Synthase	0.07	-0.33	-0.01	-1.26	0.06	-0.07	-0.20	-0.04
<i>hemG</i>	Protoporphyrinogen Oxidase	0.04	-0.32	-0.42	0.03	-0.14	-0.26	-0.28	-0.13
<i>dfp</i>	Ligase/Decarboxylase	0.14	-0.22	-0.31	-0.33	-0.04	-0.31	-0.07	-0.31
<i>nadA</i>	UE von Chinolon Synthetase	-0.18	0.02	-0.41	-0.18	-0.11	-0.39	-0.15	-0.15
<i>entB</i>	UE von apo-EntB, Enterobactin Biosynthese	-0.17	-0.18	-0.42	-0.30	-0.38	-0.40	-0.06	-0.25
<i>bioF</i>	UE von 8-Amino-7-Oxononanoat Synthase	-0.04	-0.16	-0.04	-0.36	-0.18	-0.33	-0.23	-0.10
<i>mioC</i>	Flavoprotein	-0.01	-0.28	-0.12	-0.39	-0.20	-0.36	-0.21	-0.21
<i>glyA</i>	Glycin Hydroxymethyltransferase	-0.07	-0.35	-0.42	-0.48	-0.40	-0.26	-0.27	-0.39
<i>accB</i>	Biotin Carboxyl Transporter Protein	0.19	-0.53	-0.69	-0.72	-1.25	-0.98	-1.17	-1.00
<i>ygbP</i>	4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol Synthase	0.04	-0.26	-0.39	-0.21	-0.49	-0.66	-0.41	-0.40
<i>gshA</i>	Glutamat-Cystein Ligase	-0.10	-0.47	-0.45	-0.53	-0.78	-0.90	-0.49	-0.43
<i>gcvT</i>	UE von gcv System	0.46	-0.33	-0.23	-0.44	-0.54	-0.70	-0.47	-0.31
<i>gcvH</i>	UE von gcv System	0.46	-0.56	-0.46	-0.70	-0.79	-0.57	-0.54	-0.65
<i>acpP</i>	Acyl Transporter Protein	0.06	-0.55	-0.35	-0.37	-0.34	-0.49	-0.29	-0.27
<i>metF</i>	5,10-Methylen tetrahydrofolat Reduktase	-0.29	-0.18	-0.24	-0.42	-0.51	-0.27	-0.29	-0.12
<i>thiF</i>	ThiF Protein, Thiamin Biosynthese	-0.08	0.07	-0.35	-0.12	-0.23	0.06	-0.01	-0.08
<i>ribD</i>	Pyrimidin Reduktase	-0.08	-0.10	-0.62	-0.31	-0.07	-0.10	0.09	0.07
<i>ubiC</i>	Chorisminsäure Pyruvat Lyase	0.44	0.81	0.79	1.06	0.75	0.71	0.54	0.86
<i>goaG</i>	4-Aminobutyrat Aminotransferase	-0.09	0.13	0.73	0.24	0.05	0.30	0.08	0.28
<i>mgsA</i>	Methylglyoxal Synthase	0.37	0.22	-0.02	0.32	0.19	-0.06	0.07	-0.10
<i>ribH</i>	Riboflavin Synthase	-0.09	-0.04	-0.17	-0.03	0.04	0.69	0.14	0.08
<i>hemL</i>	Glutamat-1-Semialdehyd Aminotransferase UE	-0.08	-0.01	-0.16	-0.23	-0.27	1.45	-0.18	-0.13
<i>ubiX</i>	3-Octaprenyl-4-hydroxybenzoat Decarboxylase 2	-0.14	0.10	0.10	0.03	-0.09	0.36	0.14	0.29

### 3.3.4 Katabolismus

Der Katabolismus umfaßt Stoffwechsel-Reaktionen, die dem Abbau von Zellbestandteilen zum Zweck des Stoffumbaus oder der Energiegewinnung dienen.

51 Gene wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz als „signifikant differentiell exprimiert“ identifiziert. Diese kodierten für Enzyme, welche Kohlenhydrate, Aminosäuren und Proteine, Fettsäuren sowie Nucleinsäuren und Nucleotide abbauen.

33 dieser Gene wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz hochreguliert. Die katabolen Gene sind, geordnet nach Syntheseprodukt, nachfolgend im Zeitverlauf tabellarisch dargestellt (siehe Tab. 3.14 bis Tab. 3.17).

#### 3.3.4.1 Kohlenhydrat-Abbau

Neben Glukose können von *E. coli* noch zahlreiche weitere Kohlenhydrate verstoffwechselt werden. Diese Kohlenhydrate werden zu Glukose ab- oder umgebaut und der Glykolyse zugeführt. Die nachfolgende Verstoffwechslung wurde bereits in Kapitel 3.3.2, „Zentraler

### 3. Ergebnisse

Kohlenstoffwechsel (Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, Tricarbonsäure-Zyklus, Glyoxylat-Zyklus und Atmung)“ betrachtet. Die Kohlenhydrate werden entweder endogen synthetisiert oder aus der Umgebung aufgenommen. Selbst unter Kohlenhydrat-Abwesenheit werden bei Glukose-Mangel Kohlenhydrat-katabole Enzyme cAMP/CRP abhängig induziert.

Gene für Kohlenhydrat-abbauende Enzyme wurden im Vergleich zur Referenz überwiegend hochreguliert. Speziell die Gene, die für Enzyme des Galaktitol-Abbaus (*gatZYD*) kodieren, waren über den gesamten Zeitpunkt hochreguliert (Tab. 3.14).

**Tab. 3.14: Kohlenhydrat-Abbau.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für kohlenhydratabbauende Enzyme kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yadF</i>	Carboanhydrase	0.05	-0.43	-0.67	-0.62	-0.63	-0.39	-0.33	-0.40
<i>uxaB</i>	Altronat Oxidoreduktase	-0.24	-0.18	-0.54	-0.17	-0.10	-0.40	-0.11	-0.13
<i>treA</i>	Trehalase II	-0.12	-0.02	-0.36	-0.01	0.02	0.03	0.07	-0.01
<i>araA</i>	L-arabinose isomerase UE	0.19	-0.07	0.02	0.42	0.40	-0.07	0.02	-0.16
<i>uidA</i>	beta-Glucuronidase	-0.01	0.09	-0.42	0.18	-0.16	0.79	-0.13	-0.19
<i>xylB</i>	Xylulokinase	-0.14	0.11	-0.22	0.29	0.09	0.48	0.20	0.31
<i>yhaE</i>	Tartronat Semialdehyd Reduktase	-0.08	0.11	0.05	-0.06	0.16	0.39	0.17	0.01
<i>gcd</i>	Glucose Dehydrogenase	-0.01	0.06	0.04	0.12	0.16	0.69	0.07	-0.01
<i>yhfQ</i>	Fructoselysin 6-Kinase	-0.13	-0.12	1.89	0.04	-0.02	0.09	0.13	-0.19
<i>agaZ</i>	Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase 1	0.08	-0.03	0.40	0.09	0.25	0.24	-0.07	-0.06
<i>glgP</i>	Glycogen Phosphorylase UE	0.04	0.11	0.30	0.46	0.19	0.17	0.22	0.11
<i>gatD</i>	Galactitol-1-Phosphat Dehydrogenase	0.71	1.44	1.42	1.50	1.40	1.09	1.40	1.68
<i>gatZ</i>	UE von Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase 2	0.86	1.41	1.18	1.59	1.08	1.48	1.40	1.49
<i>gatY</i>	UE von Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase 2	1.08	1.23	1.04	1.31	1.07	1.06	1.19	1.55
<i>uxaC</i>	D-Glucuronat Isomerase	-0.08	0.21	0.53	0.42	0.46	0.10	0.51	0.59
<i>glcB</i>	Malat Synthase D	-0.27	0.83	0.49	0.60	0.37	0.26	0.56	0.13
<i>glpK</i>	UE von Glycerolkinase	0.04	0.58	0.29	0.44	0.46	0.34	0.22	0.16
<i>dgoK</i>	2-Dehydro-3-Desoxygalactono Kinase	0.05	0.19	0.43	-0.20	0.05	0.18	0.11	0.29
<i>kduI</i>	5-Keto 4-Deoxyuronat Isomerase	0.03	0.11	0.47	0.13	0.18	0.11	0.14	0.23
<i>dgoA</i>	2-Dehydro-3-Desoxyphosphogalactonat Aldolase	0.08	0.13	0.58	0.02	0.19	0.14	0.20	0.31
<i>yhaF</i>	α-Dehydro-β-deoxy-D-Glucarat Aldolase	-0.21	0.28	0.10	0.38	0.26	0.17	0.14	-0.14

#### 3.3.4.2 Protein-, Peptid- und Aminosäureabbau

Neben der Entfernung falsch gefalteter Proteine dient der Abbau von Proteinen der Versorgung der Zelle mit Aminosäuren bei Aminosäure-Mangel. Durch den Abbau von Aminosäuren hingegen gewinnt die Zelle Kohlenstoffgerüste zur Oxidation bzw. Energiegewinnung sowie Stickstoff in Form von Ammonium (Schlegel 1992).

Im Vergleich zur Referenz waren verschiedene Protease- und Peptidasegene (*ompT*, *clpX*, *ptr*) sowie einzelne Gene, die für Aminosäure-abbauende Enzyme kodieren (*tnaA*, *pflB*), signifikant verändert (Tab. 3.15). Die Proteasekomponente ClpX beispielsweise, eine Untereinheit des Proteasekomplexes ClpXP, war zum Zeitpunkt T6 differentiell

herunterreguliert. Dieser Proteasekomplex degradiert  $\sigma^S$  in der exponentiellen Phase RssB-abhängig (Schweder et al. 1996; Zhou et al. 2001). Weiterhin war eine Serin Protease, lokalisiert an der Membranoberfläche (kodiert durch *ompT*), von Zeitpunkt T2 bis T8 signifikant herunterreguliert. OmpT spielt eine Rolle bei der bakteriellen Virulenz (McCarter et al. 2004).

Auffällig war ferner die deutliche Hochregulation des Gens für das Protein TnaA (*tnaA*). TnaA stellt eine Untereinheit der L-Cystein Desulphydrase sowie der Tryptophanase dar. Diese Enzyme katalysieren neben anderen den Abbau von Cystein und Tryptophan (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)).

**Tab. 3.15: Protein-, Peptid- und Aminosäureabbau.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme des Protein-, Peptid- und Aminosäureabbaus kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>hflK</i>	Regulator der FtsH Protease	0.02	0.15	-0.16	0.05	0.10	-0.52	-0.10	-0.02
<i>caiC</i>	Carnitin-CoA Ligase / Crotonobetaine-CoA Ligase	0.07	-0.32	0.04	0.06	-0.33	-0.83	-0.14	0.02
<i>pepP</i>	Prolin Aminopeptidase P II	0.04	0.04	-0.03	0.06	-0.10	-0.57	-0.15	0.11
<i>clpX</i>	ClpA ATP-abhängiger Proteasekomponente UE	-0.03	0.00	0.04	-0.04	-0.28	-0.69	-0.26	-0.09
<i>pepA</i>	Aminopeptidase A/I	-0.01	-0.04	0.05	0.17	0.09	-0.49	-0.20	0.05
<i>pflB</i>	UE von Pyruvat Lyase	0.06	-0.10	-0.40	-0.07	-0.43	-0.42	-0.61	-0.21
<i>ompT</i>	Protease VII	-0.14	-1.01	-0.95	-1.25	-0.89	-0.98	-1.56	-0.64
<i>hflC</i>	Regulator der FtsH Protease	0.11	-0.06	-0.17	0.41	0.21	-0.17	0.12	-0.17
<i>clpA</i>	ClpA ATP-abhängige Proteasekomponente UE	0.03	0.17	0.15	0.37	0.16	-0.08	-0.07	-0.08
<i>tnaA</i>	L-Cystein Desulphydrase UE	1.10	2.73	3.20	2.82	2.79	2.79	2.34	2.72
<i>ptr</i>	Protease III	0.12	0.20	0.23	0.22	0.11	0.60	0.16	0.32
<i>dadA</i>	D-Aminosäure Dehydrogenase, kleine UE	0.16	0.34	0.39	0.09	0.24	0.47	0.04	0.11

### 3.3.4.3 Fettsäureabbau

Fettsäuren spielen im Energiestoffwechsel eine entscheidende Rolle, da sie in einem hoch reduzierten Zustand vorliegen. Dadurch liefern sie im Verhältnis zu anderen Energiespeichernden Molekülen wie z.B. Glykogen oder auch Proteinen mehr als das Doppelte an Energie bei ihrer Oxidation (Stryer 1996). DiRusso und Nyström schlagen vor, dass *E. coli* unter Limitierung Fettsäuren aus der Membran freisetzt, die der Zelle als endogene Reserve dienen und Kohlenstoff sowie Energie zur Aufrechterhaltung des Erhaltungsstoffwechsels zur Verfügung stellen (DiRusso und Nystrom 1998).

Bereits 20 min unter Glukose-Limitierung wurden Gene des Fettsäureabbaus im Vergleich zur Referenz überwiegend signifikant hochreguliert (siehe Tab. 3.16).

Der Fettsäureoxidationskomplex bestehend aus b2342 (FadI) und b2341 (FadJ) setzt  $\beta$ -Ketoacyl-CoA zu Acyl-CoA und Acetyl-CoA um. Die Acetyl-CoA Synthetase (Acs) kann

### 3. Ergebnisse

Propionat zur Einschleusung in den Methylcitrat Zyklus zu Propionyl-CoA sowie Acetat zur Verstoffwechslung in Acetyl-CoA umsetzen.

**Tab. 3.16: Fettsäureabbau.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für fettsäureabbauende Enzyme kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>prpB</i>	UE von 2-Methylisocitrat Lyase	-0.06	0.15	-0.37	-0.06	-0.19	-0.55	-0.02	0.17
<i>mhpD</i>	UE von 2-Keto-4-Pentenoat Hydratase	0.00	0.15	-0.42	-0.11	0.06	-0.65	-0.05	-0.25
<i>mhpF</i>	Acetaldehyd Dehydrogenase 2	-0.02	0.01	-0.06	-0.21	0.25	0.59	0.20	-0.12
<i>mhpE</i>	4-Hydroxy-2-Ketovalerat Aldolase	0.25	0.51	0.17	0.10	0.04	0.06	0.13	0.18
<i>b2342</i>	FadI Monomer, Fettsr. Oxidation	0.13	0.42	0.45	0.07	0.13	0.28	0.20	0.34
<i>acs</i>	Acetyl-CoA Synthetase	0.42	0.78	1.12	0.90	1.11	0.49	1.16	1.24
<i>b2341</i>	FadJ Monomer; Fettsr. Oxidation	0.35	1.14	0.96	1.32	1.10	0.85	0.75	0.89
<i>prpC</i>	UE von 2-Methylisocitrat Lyase	0.17	0.21	0.11	-0.05	0.04	0.50	-0.09	0.26

#### 3.3.4.4 Nukleinsäure- und Nukleotid-abbauende Enzyme

Gene von Enzymen, die den Abbau von Nukleinsäuren (RNA: *mnc*, *mnt*, DNA: *sbcC*, *recJ* sowie *mcrB*) oder Nukleotiden (*ybeK*, *cpdB* sowie *deoC*) katalysieren, wurden signifikant differentiell reguliert (siehe Tab. 3.17).

**Tab. 3.17: Nukleinsäure- und Nukleotid-abbauende Enzyme.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme des Nucleinsäure- und Nukleotid-Abbaus kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ybeK</i>	Ribonukleosid Hydrolase 1	0.52	0.48	0.39	0.58	0.21	0.24	0.19	0.36
<i>cpdB</i>	2',3'-zyklische Nukleotid 2'-Phosphodiesterase	0.03	0.41	0.16	0.29	0.27	0.17	0.22	0.20
<i>deoC</i>	Desoxyribosephosphat Aldolase	0.22	0.20	-0.09	0.06	0.21	0.47	-0.03	-0.10
<i>sbcD</i>	ATP-abhängige dsDNA Exonuklease UE	-0.05	-0.17	-0.08	-0.37	-0.27	-0.19	-0.13	-0.29
<i>mnc</i>	RNase III	-0.11	-0.34	-0.23	-0.20	-0.46	-0.50	-0.28	-0.43
<i>mnt</i>	RNase T	-0.11	-0.41	-0.14	0.00	-0.04	0.09	0.02	0.39
<i>sbcC</i>	ATP-abhängige dsDNA Exonuklease UE	-0.02	0.04	0.08	-0.17	-0.17	0.43	-0.09	0.14
<i>mcrB</i>	McrBC Restriktionsendonuklease UE	-0.04	0.00	0.02	-0.30	-0.25	0.54	0.03	-0.04
<i>recJ</i>	5' --> 3' Exonuklease Aktivität, DNA Degradation	-0.11	-0.08	0.03	-0.54	-0.16	0.09	0.06	-0.03

### 3.3.5 Proteinbiosynthese

#### 3.3.5.1 Ribosom

Das Ribosom, der Ort der Proteinbiosynthese in der Zelle, wird unter Glukose-Limitierung stringent reguliert (Magnusson et al. 2005). 78% der Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz „als signifikant herunterreguliert“ gefunden. Lediglich eine Komponente des Ribosoms (*rpsV*), welche in der stationären Phase vermehrt gebildet wird (Izutsu et al. 2001b), wurde hochreguliert gefunden (Tab. 3.18). Die Koeffizienten von *rpsV* nehmen von 0,28 (T2) auf 1,59 (T8) zu. Insgesamt nimmt die Intensität der Herunterregulation über die Zeit bis T7 zu, zum Zeitpunkt T8 werden einzelne Gene im Vergleich zur Referenz wieder weniger intensiv herunterreguliert. Zu Beginn der Glukose-Limitierung (T1 im Vergleich zur Referenz) sind noch keine signifikanten Veränderungen festzustellen, die Änderungen setzen jedoch schon vor der vollständigen Kohlenhydrat-Limitierung in T2 ein.



### 3. Ergebnisse

**Tab. 3.18: Ribosom.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für ribosomale Proteine kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>rpsV</i>	UE von 30S Ribosom S22	0.28	0.59	0.51	0.66	1.15	1.13	1.38	1.59
<i>rpsT</i>	UE von 30S Ribosom S20	-0.14	-0.48	-0.08	-0.18	-0.16	0.45	0.05	-0.11
<i>rplS</i>	UE von 50S Ribosom L19	-0.29	-0.37	-0.28	-0.61	-0.87	-0.17	-0.36	-0.06
<i>rplI</i>	UE von 50S Ribosom L9	0.02	-0.52	-0.43	-0.65	-0.70	-0.24	-0.33	-0.32
<i>rpsU</i>	UE von 30S Ribosom S21	-0.18	-0.50	-0.35	-0.34	-0.29	-0.32	-0.11	-0.22
<i>rpsQ</i>	UE von 30S Ribosom S17	0.05	-0.55	-0.44	-0.09	-0.18	-0.84	-0.36	-0.40
<i>rplD</i>	UE von 50S Ribosom L4	-0.01	-0.34	-0.14	-0.20	-0.32	-1.04	-0.58	-0.76
<i>rpsG</i>	UE von 30S Ribosom S7	-0.17	-0.29	-0.20	-0.70	-0.94	-0.70	-0.66	-0.28
<i>rplB</i>	UE von 50S Ribosom L2	0.01	-0.27	-0.25	-0.08	-0.44	-0.57	-0.32	-0.36
<i>rpmE</i>	UE von 50S Ribosom L31	0.02	-0.43	-0.44	-0.31	-0.56	-0.60	-0.21	-0.51
<i>rplC</i>	UE von 50S Ribosom L3	0.00	-0.27	-0.40	-0.43	-0.54	-0.67	-0.31	-0.61
<i>rplV</i>	UE von 50S Ribosom L22	-0.21	-0.41	-0.01	-0.45	-0.52	-0.66	-0.40	-0.31
<i>rpsN</i>	UE von 30S Ribosom S14	-0.21	-0.66	-0.54	-0.68	-0.80	-1.19	-0.76	-0.74
<i>rplP</i>	UE von 50S Ribosom L16	-0.07	-0.47	-0.35	-0.44	-0.77	-0.59	-0.62	-0.50
<i>rplA</i>	UE von 50S Ribosom L1	-0.15	-0.86	-0.52	-0.87	-1.38	-1.35	-1.18	-0.96
<i>rpsJ</i>	UE von 30S Ribosom S10	-0.07	-0.75	-0.39	-0.97	-1.47	-1.26	-0.98	-0.61
<i>rpsM</i>	UE von 30S Ribosom S13	-0.03	-0.49	-0.50	-0.96	-1.24	-1.35	-1.07	-0.65
<i>rpsK</i>	UE von 30S Ribosom S11	-0.12	-0.52	-0.42	-0.79	-1.08	-1.14	-1.15	-0.64
<i>rpsF</i>	UE von 30S Ribosom S6	-0.22	-0.42	-0.19	-0.32	-0.71	-0.68	-0.39	-0.27
<i>rpmH</i>	UE von 50S Ribosom L34	-0.15	-0.44	-0.37	-0.45	-0.82	-0.73	-0.35	-0.39
<i>rplW</i>	UE von 50S Ribosom L23	-0.28	-1.10	-0.67	-0.85	-1.47	-1.53	-0.96	-0.88
<i>rpmD</i>	UE von 50S Ribosom L30	0.00	-0.80	-0.28	-0.64	-0.94	-1.29	-0.98	-0.47
<i>rplN</i>	UE von 50S Ribosom L14	-0.08	-0.79	-0.34	-0.39	-0.75	-1.17	-0.64	-0.21
<i>rpsE</i>	UE von 30S Ribosom S5	-0.05	-0.61	-0.35	-0.41	-0.80	-1.32	-0.61	-0.52
<i>rplX</i>	UE von 50S Ribosom L24	-0.10	-0.68	-0.24	-0.25	-0.79	-1.03	-0.51	-0.41
<i>rpsD</i>	UE von 30S Ribosom S4	-0.27	-0.70	-0.47	-0.83	-1.31	-1.78	-1.08	-0.56
<i>rplL</i>	UE von 50S Ribosom L7/L12	-0.18	-0.55	-0.56	-0.51	-1.13	-1.20	-0.78	-0.26
<i>rpsL</i>	UE von 30S Ribosom S12	-0.07	-0.52	-0.03	-0.52	-0.93	-0.97	-0.60	-0.43
<i>rpmC</i>	UE von 50S Ribosom L29	-0.07	-0.35	-0.14	-0.41	-0.86	-0.82	-0.37	-0.54
<i>rpmA</i>	UE von 50S Ribosom L27	-0.06	-0.53	-0.10	-0.25	-0.59	-0.59	-0.36	-0.27
<i>rplM</i>	UE von 50S Ribosom L13	-0.22	-0.69	-0.96	-0.70	-0.95	-0.67	-0.63	-0.61
<i>rpsP</i>	UE von 30S Ribosom S16	-0.09	-0.83	-0.96	-0.88	-1.04	-0.97	-0.64	-0.69
<i>rplK</i>	UE von 50S Ribosom L11	-0.06	-0.84	-0.86	-0.76	-0.88	-0.76	-0.71	-0.55
<i>rplY</i>	UE von 50S Ribosom L25	-0.04	-0.82	-0.53	-0.49	-0.57	-0.57	-0.34	-0.49
<i>rpsS</i>	UE von 30S Ribosom S19	-0.09	-1.17	-0.68	-0.85	-1.21	-1.21	-0.52	-0.91
<i>rpmB</i>	UE von 50S Ribosom L28	0.00	-0.80	-0.37	-0.77	-0.89	-0.74	-0.56	-0.57
<i>rpsB</i>	UE von 30S Ribosom S2	0.06	-0.84	-0.64	-0.56	-0.90	-1.12	-0.74	-0.61
<i>rplR</i>	UE von 50S Ribosom L18	-0.09	-0.88	-0.81	-0.44	-0.94	-1.01	-0.78	-0.48
<i>rplF</i>	UE von 50S Ribosom L6	-0.05	-1.00	-0.47	-0.66	-0.84	-0.90	-0.82	-0.37
<i>rplE</i>	UE von 50S Ribosom L5	0.01	-0.75	-0.63	-0.78	-0.79	-0.84	-0.93	-0.54
<i>rpsH</i>	UE von 30S Ribosom S8	0.00	-0.39	-0.36	-0.56	-0.65	-0.74	-0.45	-0.05
<i>rpmJ</i>	UE von 50S Ribosom X	-0.03	-0.21	-0.46	-0.63	-0.57	-0.85	-0.67	-0.25
<i>rplU</i>	UE von 50S Ribosom L21	-0.01	-0.51	-0.33	-0.27	-0.38	-0.61	-0.76	-0.59
<i>rpmF</i>	UE von 50S Ribosom L32	0.17	-0.34	-0.45	-0.15	-0.22	-0.34	-0.16	-0.29
<i>rpsR</i>	UE von 30S Ribosom S18	0.03	-0.34	-0.20	-0.15	-0.29	-0.01	-0.28	-0.22
<i>rpsC</i>	UE von 30S Ribosom S3	-0.07	-0.32	-0.04	-0.11	-0.22	-0.14	-0.08	-0.26



### 3.3.5.2 Ribosomen-Aufbau

Gene, die für Enzyme bzw. Proteine kodieren, welche die Zusammensetzung der ribosomalen Untereinheiten sowie des Ribosoms selbst beeinflussen, wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz überwiegend signifikant hochreguliert (Tab. 3.19). Speziell das Gen des Proteins YfiA (*yfiA*), eines Enzyms, welches die Translation in der stationären Phase hemmt und die Ribosomen stabilisiert, sowie der „Ribosome modulation factor“ (*rmf*) zeigten eine starke Hochregulation im Vergleich zur Referenz. *YfiA* ist in den Zeitpunkten T2 bis T5 signifikant erhöht, *rmf* sogar im gesamten untersuchten Zeitraum. Zu Beginn der Glukose-Limitierung (T1 im Vergleich zur Referenz) sind noch keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

**Tab. 3.19: Ribosomen-Aufbau.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Proteine kodieren, welche die Ribosomen-Aufbau beeinflussen. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>srmB</i>	DEAD-box RNA Helicase	0.07	-0.22	-0.19	-0.05	-0.28	-0.06	0.09	-0.74
<i>dbpA</i>	RNA Helikase/RNA-abhängige ATPase	0.00	0.06	0.19	0.37	0.17	-0.09	0.14	0.06
<i>yfiA</i>	StationärePhase Translations Inhibitor	0.55	1.09	0.82	1.06	0.73	0.29	0.55	0.46
<i>rmf</i>	Ribosome Modulation Faktor (Chaperon)	0.32	1.61	1.43	1.49	1.67	2.72	2.32	2.16

### 3.3.5.3 Translation und Proteinreifung

Um eine Translation durchführen zu können, exprimiert *E. coli* drei Initiationsfaktoren, mehrere Elongationsfaktoren sowie drei Release-Faktoren. Gene für Initiationsfaktoren (*infA*), Elongationsfaktoren (*tufA* und *fusA*) sowie Release-Faktoren (*prfB*) wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz signifikant herunterreguliert (siehe auch Tab. 3.20). Eine Tendenz zur Herunterregulation zeigte sich mit Ausnahme von T1 über den gesamten betrachteten Zeitraum. Signifikant wurden die Änderungen von *tufA* (Elongationsfaktor Tu), *fusA* (Elongationsfaktor G) und *prfB* (Release-Faktor 2) erst nach der vollständigen Kohlenhydrat-Limitierung in T3. Die an der Proteinreifung beteiligten Peptidasen *lepB* (Signal Peptidase I) und *map* (Methionin Aminopeptidase) waren nur in einem kurzen Zeitraum und bereits nach Glukose-Limitierung signifikant herunterreguliert (T2: *lepB*; T2 und T3: *map*).

### 3. Ergebnisse

**Tab. 3.20: Translation und Proteinreifung.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Proteine der Translation kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>lepB</i>	Signal Peptidase I	-0.07	-0.32	0.04	-0.01	0.17	-0.05	0.05	0.01
<i>map</i>	Methionin Aminopeptidase	0.05	-0.35	-0.51	-0.30	-0.40	-0.18	-0.26	-0.32
<i>infA</i>	Initiationsfaktor IF-1	-0.09	-0.56	-0.58	-0.54	-0.58	-0.17	-0.34	-0.27
<i>tufA</i>	Elongationsfaktor Tu	0.06	-0.37	-0.46	-0.40	-0.38	-0.69	-0.51	-0.32
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	-0.06	-0.20	-0.26	-0.41	-0.64	-0.60	-1.03	-0.42
<i>prfB</i>	Peptid freisetzender Faktor RF-2	-0.04	-0.33	-0.38	-0.55	-1.07	-0.78	-0.76	-0.80

#### 3.3.5.4 RNA-Polymerase

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert die Transkription und besteht in Prokaryoten aus vier Untereinheiten:  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ . Weiterhin existiert die Omega-Untereinheit, die nur für den Zusammenbau der RNA-Polymerase von Bedeutung zu sein scheint (Neidhardt et al. 1996). Jüngst wurde der Omega-Untereinheit jedoch auch eine Beteiligung an der RNA-Polymerase-Funktionalität zugesprochen. Weiterhin scheint diese Untereinheit eine Rolle bezüglich der ppGpp- und DksA-Funktion zu spielen (Vrentas et al. 2005). Die Untereinheiten Alpha, Beta und Omega der RNA-Polymerase (*rpoABZ*) wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz signifikant herunterreguliert (Tab. 3.21). Die signifikanten Änderungen waren erst 20 min nach Glukose-Limitierung zu detektieren und die Expression befand sich zum Zeitpunkt T8 für alle betrachteten Untereinheiten wieder auf dem Ausgangsniveau. Lediglich die Untereinheit Beta` wurde auf Transkriptomebene nicht signifikant reguliert.

Weiterhin konnten zwei Sigma-Faktoren,  $\sigma^{28}$  und  $\sigma^E$ , identifiziert werden (Tab. 3.21). Sigma-Faktoren werden zur Transkriptionsinitiation benötigt und weisen somit eine regulatorische Aktivität auf.  $\sigma^{28}$  (*rpoF / fliA*) war zu den Zeitpunkten T7 und T8 signifikant herunterreguliert, zeigte aber im gesamten Zeitverlauf tendenziell eine herabgesetzte Expression im Vergleich zur Referenz. Dieser Sigma-Faktor reguliert die Expression von Proteinen für den Bewegungsapparat (Chilcott und Hughes 2000).  $\sigma^E$  hingegen ermöglicht der Zelle die Transkription von Chaperonen und weiteren Proteinen, die u.a. falsch gefaltete Proteine in der Zellmembran reparieren oder beseitigen können (Dartigalongue et al. 2001). Das Gen von  $\sigma^E$  (*rpoE*) wies ab dem vierten Zeitpunkt (T4) eine erhöhte Transkription auf. Die übrigen Sigma-Faktoren wurden nicht differentiell exprimiert unter den gegebenen Bedingungen.

**Tab. 3.21: RNA-Polymerase.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für RNA-Polymerase Untereinheiten kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>rpoA</i>	RNA-Polymerase Alpha UE	-0.20	-0.47	-0.42	-0.46	-0.75	-0.54	-0.49	-0.10
<i>rpoB</i>	RNA Polymerase Beta UE	-0.10	-0.26	-0.52	-0.29	-0.32	-0.61	-0.41	-0.18
<i>rpoZ</i>	RNA-Polymerase Omega UE	-0.01	-0.46	-0.47	-0.10	-0.51	-0.60	-0.32	-0.34
<i>fliA</i>	Sigma 28	0.10	-0.26	-0.29	-0.64	-0.55	-0.68	-1.00	-2.42
<i>rpoE</i>	Sigma E	0.22	0.09	0.23	0.65	0.79	0.52	0.95	0.83

### 3.3.5.5 RNA-Modifikation

RNA wird über zahlreiche Enzyme modifiziert, um die entsprechende Funktion in der Zelle ausüben zu können (Dunin-Horkawicz et al. 2006). In *E. coli* sind 11 modifizierte Nukleotide der 16S rRNA und 23 modifizierte Nukleotide der 23S rRNA bekannt. Die größte strukturelle Diversität weisen hingegen tRNAs auf (The RNA Modification Database - <http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/> - Stand Februar 2006 (Crain und McCloskey 1996)). Gene, die für Enzyme kodieren, welche tRNAs zur Funktionalisierung modifizieren (dies waren *yggH*, *trmD*, *truB*, *spoU*, *rnb* und *ycfB*) bzw. rRNAs (dies waren *yjfH*, *yjfA* und *ygcA*), wurden sowohl signifikant hochreguliert als auch herunterreguliert. Signifikante Veränderungen spielten sich vermehrt zwischen den Zeiträumen T2 und T6 ab (siehe Tab. 3.22).

**Tab. 3.22: RNA-Modifikation.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Enzyme kodieren, die RNA modifizieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yjfH</i>	23S rRNA Methyltransferase Monomer	-0.14	0.05	-0.41	-0.06	0.05	-0.01	-0.15	0.29
<i>ksgA</i>	Dimethyltransferase	-0.10	-0.48	-0.25	0.11	-0.08	-0.19	-0.13	-0.14
<i>yajK</i>	Thil Protein, RNA Modification	-0.19	-0.38	-0.41	-0.25	-0.56	0.04	-0.32	-0.26
<i>queA</i>	Ribosyltransferase-Isomerase	-0.03	-0.51	-0.40	-0.57	-0.47	-0.06	-0.35	-0.26
<i>yjfA</i>	16S rRNA Prozessierung	0.09	-0.64	-0.53	-0.88	-0.22	-0.46	-0.73	-0.50
<i>yggH</i>	tRNA (m7G46) Methyltransferase	0.01	-0.02	-0.46	-0.40	-0.52	-0.43	-0.58	-0.50
<i>trmD</i>	tRNA (Guanin-1-)Methyltransferase	-0.08	-0.72	-0.39	-0.79	-1.09	-1.02	-0.92	-0.78
<i>truB</i>	tRNA Pseudouridin 55 Synthase	-0.14	-0.21	-0.06	-0.31	-0.25	0.12	0.03	0.11
<i>spoU</i>	tRNA (Gm18) 2'-O-Methyltransferase	-0.14	-0.06	-0.14	0.12	0.02	0.70	-0.13	-0.04
<i>yhgJ</i>	RNA 3'-terminale Phosphatzyklase	0.04	0.26	0.43	0.06	0.12	0.09	0.12	0.20
<i>ygcA</i>	Methyltransferase	0.22	0.33	0.26	0.32	0.36	0.09	0.28	0.26
<i>rnb</i>	tRNA Exoribonuklease BN	0.06	0.27	0.10	0.33	0.19	0.45	0.21	0.20
<i>ycfB</i>	2-Thiouridin Modifikation der tRNA	-0.03	0.16	0.15	-0.03	-0.03	-0.42	0.21	0.15

### 3.3.5.6 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren die Beladung der entsprechenden tRNA mit der spezifischen Aminosäure abhängig von der Anticodon-Sequenz der tRNA. Dabei entstehen aminoacylierte tRNAs (Stryer 1996). *E. coli* besitzt für jede Aminosäure eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase und darüber hinaus eine zweite Synthetase für Lysyl-tRNA. Zum Teil bestehen die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus mehreren Untereinheiten (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)). Sechs Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bzw. deren Untereinheiten wurden über die Microarray-Analyse „als signifikant herunterreguliert“ in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz identifiziert. Es handelte sich um Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der aminoacylierten tRNAs Seryl-tRNA, Asparagyl-tRNA, Alanyl-tRNA, Phenylalanyl-tRNA sowie der Isoleucyl-tRNA (Tab. 3.23). Die intensivste Regulation wies die Alanyl-tRNA Synthetase (*alaS*) auf. Sie war von T2 bis T8 im Vergleich zur Referenz signifikant herunterreguliert. Insgesamt setzte eine signifikante Herunterregulation erst 20 min nach der Glukose-Limitierung (in T2) ein.

**Tab. 3.23: tRNA-Synthetasen.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für tRNA-Synthetasen bzw deren Untereinheiten kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>serS</i>	UE von Seryl-tRNA Synthetase	-0.07	0.18	0.32	-0.38	-0.28	-0.30	-0.23	-0.03
<i>mesJ</i>	tRNA <sup>Ala</sup> -lysidine Synthetase	-0.02	-0.17	0.10	0.13	0.00	-0.52	0.06	-0.01
<i>asnS</i>	Asparaginyl-tRNA Synthetase	-0.02	-0.63	-0.65	0.08	-0.13	-0.37	0.09	-0.20
<i>pheS</i>	UE von Phenylalanyl-tRNA Synthetase	-0.10	-0.28	-0.39	-0.33	-0.64	-0.20	-0.63	-0.27
<i>alaS</i>	Alanyl-tRNA Synthetase	-0.02	-0.91	-0.69	-0.97	-1.11	-1.28	-1.16	-1.07
<i>lysS</i>	Lysyl-tRNA Synthetase	0.04	0.01	-0.34	0.05	-0.23	-0.54	-0.31	-0.19
<i>ileS</i>	Isoleucyl-tRNA Synthetase	-0.05	-0.08	-0.40	-0.16	-0.15	-0.51	-0.08	-0.11

### 3.3.6 Stressantwort

Fallen Nährstoffkonzentrationen unter eine bestimmte Konzentration, antwortet die Zelle darauf, indem sie spezifische Enzyme zur Antwort auf den Mangel induziert (hochaffine Transporter, katabole Enzyme). Ist der Nährstoff jedoch so weit limitiert, dass eine Aufnahme in die Zelle nicht mehr möglich ist, tritt sie in die stationäre Phase ein. Diese wird durch eine Stressantwort begleitet, die der Zelle eine erhöhte Toleranz gegenüber zahlreichen Stressfaktoren ermöglicht, die nicht nur den auslösenden Stimulus (Nährstoff-Limitierung) betreffen (Hengge-Aronis 1993).

33 Gene wurden signifikant differentiell exprimiert, die für Proteine kodieren, welche normalerweise als Antwort auf verschiedenste Stressoren wie Hitzeschock, Kälteschock oder oxidativen Stress gebildet werden. Hitzeschockproteine konnten sowohl hochreguliert (z.B. *ybeV*) als auch herunterreguliert (z.B. *hslJ*, *dnaJ*) gefunden werden, genauso wie weitere Chaperone (z.B. *yabH*, *narJ*). Kälteschockproteine wie z.B. *cspF* und *cspI* hingegen waren nur hochreguliert gefunden worden. Des Weiteren waren Enzyme zur Entgiftung von Ethanol und Metallen sowie die Superoxiddismutase (*sodA*) hochreguliert. Die stärkste Stressantwort war während des dritten Zeitpunkts (T3) mit 16 signifikant differentiell exprimierten Genen im Vergleich zur Referenz zu beobachten (siehe Tab. 3.24).

**Tab. 3.24: Stressantwort.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Stressantwort-Proteine kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>degS</i>	Serin Protease, innere Membran	-0.73	-0.07	-0.12	0.06	-0.07	-0.30	-0.17	-0.09
<i>ppiA</i>	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A (Chaperon)	-0.25	0.01	0.07	0.11	-0.28	-0.56	0.15	-0.04
<i>narJ</i>	Chaperon für NarG	0.03	-0.02	-0.77	-0.04	-0.17	0.21	0.13	0.03
<i>hslJ</i>	Hitzeschockprotein	0.07	-0.15	-0.58	-0.09	0.15	-0.27	0.01	-0.22
<i>hdeA</i>	Säurefestes Protein	0.55	0.11	-0.38	-0.25	-0.34	-0.30	-0.35	-0.37
<i>yabH</i>	Chaperon	0.07	-0.20	-0.07	-0.21	-0.57	-0.04	0.13	-0.53
<i>bcp</i>	Thiol Peroxidase	0.19	-0.17	-0.53	-0.23	-0.42	-0.32	-0.04	-0.55
<i>stpA</i>	DNA-binde Protein, Chaperonaktivität	-0.04	-0.58	-0.40	-0.31	-0.29	-0.31	0.01	-0.72
<i>ydaA</i>	Universales Stressprotein	0.00	-0.16	-0.39	-0.37	-0.22	-0.33	-0.14	-0.14
<i>hslV</i>	Peptidase Komponente der HslVU Protease (HS)	0.08	-0.13	-0.19	-0.40	-0.20	-0.28	-0.33	-0.29
<i>recF</i>	UE von recfor-cplx	0.09	-0.27	-0.17	-0.45	-0.14	-0.31	-0.27	-0.17
<i>yebJ</i>	Osmoregulation	-0.15	0.04	-0.53	-0.04	-0.27	-0.19	-0.24	-0.28
<i>dnaJ</i>	UE von DnaJ/DnaK/GrpE (HS)	0.05	-0.39	-0.31	-0.05	-0.11	-0.12	-0.63	0.10
<i>cspF</i>	Kälteschock Protein	-0.01	-0.02	0.12	0.04	-0.07	0.69	-0.04	0.06
<i>phoH</i>	ATP-binding pho Regulon Komponente	0.09	-0.02	0.06	-0.07	-0.20	0.53	-0.01	0.16
<i>b0245</i>	Toxin des YkfI-YafW Toxin-Antitoxin Paares	-0.08	0.16	0.22	-0.21	-0.08	0.51	0.07	0.04
<i>b1631</i>	Teil des SoxR Reduktionskomplexes	0.04	0.06	0.04	-0.07	0.05	0.36	0.04	-0.03
<i>uvrB</i>	UE von UvrABC Komplex (Mismatch Reperatur)	0.19	-0.07	0.94	0.07	-0.11	-0.06	-0.01	-0.24
<i>ydeB</i>	Inneres Membranprotein	0.00	-0.03	0.49	-0.10	-0.04	-0.04	0.02	0.13
<i>msrA</i>	Methioninsulfoxid Reduktase A (Chaperon)	0.13	0.23	0.41	0.09	0.00	0.11	0.05	0.13
<i>yhiO</i>	Alkoholtoleranzprotein	0.05	0.15	0.62	-0.13	0.01	0.34	0.08	0.35
<i>sodA</i>	UE von Superoxid Dismutase (Mn)	-0.05	-0.07	0.24	0.00	0.04	0.17	0.01	0.07
<i>cspI</i>	Kälteschock Protein	-0.06	0.47	0.36	0.36	0.15	0.47	0.33	0.33
<i>ybeV</i>	Hsc56 Chaperon (HS)	0.00	0.43	0.55	0.17	0.26	0.43	0.16	0.28
<i>ahpC</i>	Alkylhydroperoxidreduktase (Entgiftung)	0.17	0.44	0.60	0.61	0.33	0.27	0.32	0.49
<i>yeaA</i>	Methioninsulfoxid Reduktase B	0.29	0.45	0.69	0.64	0.47	0.44	0.66	0.93
<i>cutC</i>	Kupfer Homöostase Protein (Entgiftung)	0.18	0.08	0.33	0.44	0.50	0.25	0.55	0.74
<i>ydgO</i>	Protein des SoxR-reducing Komplex	0.03	0.28	0.25	0.03	0.04	-0.04	0.02	0.01
<i>yedU</i>	UE von Hsp31 Homodimer (HS)	0.10	0.49	0.27	0.51	0.06	-0.17	0.27	0.16
<i>mutL</i>	UE von MutHLS Komplex	0.02	-0.02	0.18	0.22	0.03	-0.41	0.43	1.04
<i>ymdD</i>	Succinyl Modifikation/Osmoregulation	0.03	0.27	0.11	0.04	-0.16	0.14	-0.13	0.55
<i>mutH</i>	UE von MutHLS Komplex (DNA Reparatur)	-0.01	0.06	0.03	0.48	0.11	-0.28	0.13	-0.23
<i>sbmC</i>	DNA Gyrase Inhibitor	0.02	-0.01	0.09	0.22	0.43	0.16	0.03	-0.15

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.7 Zellteilung

26 Gene, die für an der Zellteilung beteiligte Proteine kodieren, werden in der Datenbank EcoCyc (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005, (Keseler et al. 2005)) aufgeführt. 16 Zellteilungs-Gene wurden signifikant reguliert im Vergleich zur Referenz gefunden (siehe Tab. 3.25). Signifikant herunterreguliert in mindestens einem Zeitpunkt waren Enzyme, welche die Zellteilung fördern (z.B. *ftsAZ*, *tig*, *seqA*), signifikant hochreguliert gegenüber der Referenz waren Enzyme, welche die Zellteilung hemmen (*minCD* und *cspD*).

**Tab. 3.25: Zellteilung.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für an der Zellteilung beteiligte Proteine kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ftsZ</i>	essentielles Zellteilungsprotein	-0.01	-0.03	-0.52	-0.44	-0.22	-0.10	0.00	0.07
<i>dcm</i>	DNA Cytosin Methylase	-0.10	0.08	-0.45	-0.19	0.15	-0.15	-0.12	-0.06
<i>topB</i>	DNA Topoisomerase III	-0.12	0.02	-0.56	0.10	-0.01	-0.22	0.04	0.03
<i>tig</i>	Chaperon beteiligt an Zellteilung	-0.11	-0.07	-0.40	-0.15	-0.21	-0.20	-0.26	-0.05
<i>seqA</i>	SeqA, moduliert Initiation der Replikation neg.	0.03	-0.03	-0.99	-0.02	-0.38	-0.44	-0.27	-0.35
<i>xerC</i>	Sequenzspezifische Rekombinase	-0.08	-0.21	-0.34	-0.16	-0.53	0.07	0.06	-0.08
<i>holC</i>	UE der DNA Polymerase III	0.09	0.02	-0.20	-0.21	-0.42	-0.59	-0.31	-0.15
<i>ftsA</i>	essentielles Zellteilungsprotein	0.07	-0.05	-0.09	0.01	-0.45	-0.32	-0.18	0.03
<i>priB</i>	Primosomen Replikationsprotein	-0.25	-0.58	-0.37	-0.64	-1.00	-0.64	-0.73	-0.54
<i>dnaB</i>	UE von replikativer DNA Helikase	-0.12	-0.39	-0.20	-0.56	-0.78	-0.81	-0.38	-0.33
<i>dnaX</i>	Gamma UE von DNA Polymerase III	0.05	-0.16	-0.29	-0.31	-0.37	-0.32	0.02	-0.27
<i>xerD</i>	Sequenzspezifische Rekombinase	-0.09	-0.44	-0.15	0.11	-0.21	-0.29	-0.39	-0.50
<i>minD</i>	Membran ATPase des MinC-MinD-MinE System	0.31	0.38	0.11	0.53	-0.20	-0.07	-0.24	-0.19
<i>minC</i>	Zellzyklusinhibitor von MinCDE und DicB-MinC	0.56	0.57	0.37	0.42	0.33	0.14	0.24	0.29
<i>cspD</i>	UE von CspD (Hemmung der Replikation)	0.61	1.28	1.58	1.74	1.75	1.69	1.52	1.49
<i>yraO</i>	DiaA Protein	0.05	0.07	0.10	0.07	-0.12	0.45	0.11	0.14

#### 3.3.8 Flagellen- und Chemotaxis System

Über 50 Gene, aufgeteilt auf mindestens 17 Operone, werden für die Synthese und Funktion des Flagellen- und Chemotaxis Systems benötigt. Innerhalb dieses Regulons werden die Operone in drei zeitlich regulierte, hierarchisch transkriptionale Klassen eingeteilt: die Klassen der frühen, mittleren und späten Gene. Diese Einteilung erfolgte, da die Gene der vorhergehenden Klasse zunächst exprimiert sein müssen, um die Transkription der Gene der nachfolgenden Klasse zu ermöglichen. So wird der Flagellenaufbau reguliert und nur die notwendigen Komponenten synthetisiert (Chilcott und Hughes 2000). Die Klasse der frühen Gene umfaßt ein Operon mit zwei Genen: *flhD* und *flhC*. Diese kodieren für Transkriptionsaktivatoren der Gene der mittleren Klasse. Die Gene der mittleren Klasse kodieren für Proteine, die für die Struktur und Zusammensetzung des Basal-Körper Hakens benötigt werden. Ferner kodieren sie für eine Komponente, die an der Flagellen



Zusammensetzung beteiligt ist sowie die Regulatoren FlgM und  $\sigma^{28}$ .  $\sigma^{28}$  ist der Sigma-Faktor, der für die Transkription der Gene der späten Klasse verwendet wird. Einige Gene des Regulons werden jedoch sowohl von FlhDC als auch von  $\sigma^{28}$  positiv reguliert (Chilcott und Hughes 2000).

Mit Hilfe der Microarray-Analyse konnten 17 Gene identifiziert werden, die gegenüber der Referenz in mindestens einem Zeitpunkt signifikant herunterreguliert wurden. Betroffen waren Gene der mittleren (*flgA*, *flgBCDEGHJK*, *fliDS*, *fliE* und *fliM*) sowie der späten (*motA* und *cheR*) Klasse. *fliDS* und *flgK* zählen sowohl zur Klasse der mittleren als auch zur Klasse der späten Gene. Die Gene kodierten für Proteine, die für den Aufbau des Motorkomplexes sowie der Flagellen benötigt werden sowie eine Komponente des chemotaktischen Signaltransduktionssystems. Details sind Tab. 3.26 zu entnehmen. Darüberhinaus wurde auch ein Gen der frühen Klasse, *flhD* (eine Komponente des Aktivators der Klasse der mittleren Gene) sowie *fliA*, welches für  $\sigma^{28}$  kodiert, zum Zeitpunkt T7 und T8 (*fliA*) bzw. zum Zeitpunkt T8 (*flhD*) signifikant herunterreguliert (bezüglich *flhD* siehe auch 3.3.9 „Regulatoren“; bezüglich *fliA* siehe auch 3.3.5 „Proteinbiosynthese“).

**Tab. 3.26: Bewegung.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für Struktureenzyme des Bewegungsapparates sowie des Signaltransduktionssystems kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ycgR</i>	Flagellum Biosynthese	0.08	0.02	-0.74	0.15	0.06	0.06	0.22	0.05
<i>fliA</i>	Flagellum Biosynthese	0.03	0.06	0.07	0.47	0.08	0.31	0.21	0.12
<i>motA</i>	UE von Flagellum Motor Komplex	-0.20	-0.19	-0.62	-0.22	-0.21	-0.83	-0.23	-0.27
<i>flgH</i>	Flagellum L-ring Protein FlgH	-0.09	-0.40	-0.48	-0.03	0.33	-0.03	-0.17	-0.59
<i>flgK</i>	Flagellum Biosynthese	-0.08	-0.44	-0.64	0.06	-0.04	-0.31	-0.39	-0.77
<i>flgG</i>	UE von Flagellum Motor Komplex	-0.09	-0.43	-0.95	-0.36	-0.02	-0.41	-0.41	-0.98
<i>fliM</i>	UE von Flagellum Motor Komplex	-0.01	-0.32	-0.54	-0.49	-0.33	0.18	-0.29	-1.04
<i>fliE</i>	Flagellum Basalkörper Protein FliE	-0.36	-0.81	-0.51	-0.84	-0.47	-0.24	-0.39	-1.20
<i>flgJ</i>	Flagellum-spezifische Muramidase	-0.03	-0.45	-0.63	-0.52	-0.08	-0.08	-0.30	-0.61
<i>fliS</i>	Flagellum Biosynthese Protein FliS	-0.04	-0.24	-0.59	-0.63	-0.34	-0.30	-0.63	-0.90
<i>fliD</i>	Flagellum Cap Protein FliD	0.09	-0.08	-0.39	-0.25	-0.14	-0.15	-0.24	-0.25
<i>flgB</i>	UE von Flagellum Motor Komplex	0.07	-0.10	-0.40	-0.29	0.07	-0.20	-0.45	-1.32
<i>flgD</i>	Flagellum Biosynthese	-0.22	-0.25	-0.35	-0.59	-0.41	-0.54	-0.98	-1.44
<i>flgE</i>	Flagellum Biosynthese	0.20	-0.56	-0.68	-0.52	-0.27	-0.58	-0.87	-1.96
<i>flgC</i>	UE von Flagellum Motor Komplex	-0.09	-0.47	-0.40	-0.35	-0.50	-0.63	-0.99	-2.04
<i>flgA</i>	Flagellum Biosynthese	-0.08	-0.12	0.03	-0.31	0.09	0.36	-0.05	-0.71
<i>cheR</i>	Chemotaxis Protein Methyltransferase	0.09	-0.05	0.42	-0.40	-0.20	0.12	-0.02	0.11

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.3.9 Regulatoren

Um die Zellphysiologie den umgebenden Bedingungen anzupassen, verfügt die Zelle über eine Vielzahl von Regulatoren. Dies sind DNA-bindende Proteine, welche die Transkription von Genen aktivieren oder inhibieren können. Unter Umständen sind hierfür weitere Komponenten erforderlich (Schlegel 1992).

Unter Kohlenhydrat-Limitierung waren 44 Regulatoren auf Ebene des Transkriptom betroffen (siehe Tab. 3.27). 27 dieser Regulatoren wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz signifikant hochreguliert. 17 hingegen wurden in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz herunterreguliert. Der für die Katabolit Repression entscheidende Regulator CRP wurde nicht auf Transkriptomebene reguliert. Das Gen der Adenylatzyklase (*cya*) hingegen war zum Zeitpunkt T3 signifikant verstärkt abgeschrieben worden. Weiterhin wurden Gene von Regulatoren, welche durch cAMP/CRP positiv reguliert werden, verstärkt abgeschrieben: *gutM*, ein Aktivator des Glukitol Katabolismus (T2), *srlR*, ein Repressor des Glukitol Katabolismus (T2 und T4), *araC*, ein dualer Regulator des Transports und Katabolismus von Arabinose (T1) sowie *malT*, ein Regulator des Maltose Katabolismus (T1-5, T7 und T8). Ferner war auch ein Protein betroffen, das neben seiner regulatorischen Aktivität auch an der Zusammenpackung der DNA beteiligt ist: *hupB* (T3 und T4). Dieses Protein ist eine Untereinheit des Proteins HU. Die zweite Untereinheit, kodiert durch *hupA*, war zu diesen Zeitpunkten nicht differentiell reguliert, wurde jedoch zum Zeitpunkt T8 signifikant vermindert abgeschrieben.

Unter Kohlenhydrat-Limitierung waren weiterhin Zwei-Komponenten Systeme differentiell reguliert. Zwei-Komponenten Systeme bestehen aus einem Sensor-Überträger- und einem Antwort-Regulator-Protein. Der Sensor ist in der Regel membrangebunden und wird an einem konservierten Histidin Rest phosphoryliert. Die Phosphatgruppe wird auf den Antwort-Regulator übertragen (auf einen Aspartatrest), welcher dadurch zum Transkriptionsaktivator wird. Bei *E. coli* sind 30 Zwei-Komponentensysteme bekannt (Wick und Egli 2004). Das DcuRS- Zwei-Komponenten System wurde verstärkt transkribiert (*yjdG* - T2; *yjdH* - T2, T4 und T8). Dieses System reguliert die Gene der anaeroben Fumarat Atmung (Zientz et al. 1998). Daneben wurde eine Komponente des ZraSR Systems reguliert, *ZraS* (*hydH*) war zum Zeitpunkt T6 signifikant herunterreguliert. Dieses ist an der Metalltoleranz von *E. coli* beteiligt (Leonhartsberger et al. 2001). Ferner war eine Komponente des Zwei-Komponenten Systems TorRS signifikant herunterreguliert: *torS* zum Zeitpunkt T2. Dieses reguliert ein anaerobes Atmungssystem, das Trimethylamin-N-oxid anaerobe Atmungssystem (Ansaldi et al. 1999).

Interessant war ebenfalls die Regulation des dualen Regulators H-NS (signifikante Hochregulation zu den Zeitpunkten T4 und T6). Dieser Regulator ist ein Nukleoid-assoziiertes Protein, welches an gekrümmte DNA binden kann und fast ausschließlich als



Repressor fungiert (Yamada et al. 1990). H-NS beeinflusst durch Interaktion mit der DNA die Aktivität weiterer Regulatoren.

**Tab. 3.27: Regulatoren.** Tabellarische Auflistung differentiell exprimierter Gene, die für regulatorische Proteine kodieren. Zeitpunkte, zu denen eine signifikante Hochregulation des betreffenden Gens beobachtet werden konnten, sind rot unterlegt, Zeitpunkte zu denen eine signifikante Herunterregulation beobachtet werden konnte, sind grün unterlegt. Dargestellt sind die Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichungen siehe Tab. 7.9; UE: Untereinheit

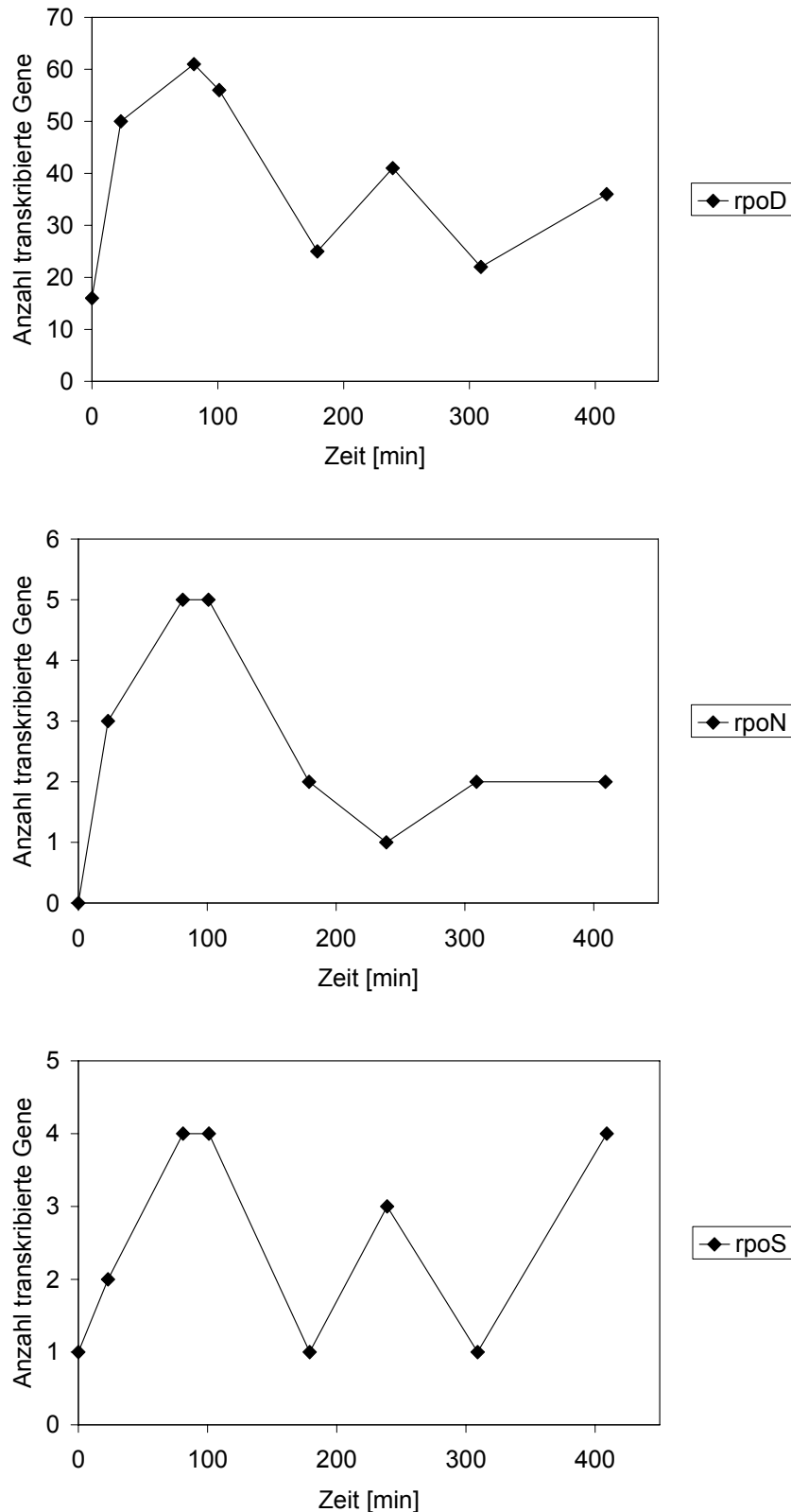
Gen	Protein/Enzym/Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yccV</i>	Hemimethyliertes DNA-Bindeprotein	-0.02	-0.71	-0.15	0.19	0.15	-0.16	0.04	-0.25
<i>torS</i>	Zwei Komponenten Regulatorsystem	-0.08	-0.44	0.03	0.00	0.26	0.12	0.05	-0.12
<i>sspA</i>	Transkriptionsregulator, Stringent Starvation Protein A	-0.21	-0.41	-0.03	-0.02	-0.15	-0.13	-0.08	-0.11
<i>nusG</i>	Transkriptionsterminationsfaktor	-0.16	-0.31	-0.07	-0.40	-0.45	-0.05	-0.29	-0.19
<i>hha</i>	Hämolyysin Expression modulierendes Protein	-0.05	0.01	0.02	-0.31	-0.53	-0.14	-0.16	0.00
<i>hydH</i>	ZraSR	0.12	0.11	0.17	0.13	0.01	-0.59	-0.04	-0.04
<i>oxyR</i>	OxyR Transkriptionsregulator	0.07	-0.28	-0.22	-0.31	-0.35	-0.21	-0.16	-0.09
<i>csrA</i>	UE von CsrA Komplex	0.02	-0.48	-0.29	-0.31	-0.50	-0.49	-0.07	-0.15
<i>yhiX</i>	GadX Transkriptionsaktivator	0.08	-0.15	-0.33	-0.08	-0.12	-0.25	-0.18	-0.09
<i>exuR</i>	ExuR Transkriptionsrepressor	-0.04	-0.19	-0.71	-0.24	-0.33	-0.04	-0.15	-0.04
<i>hupA</i>	DNA-binde Protein HU-alpha (HU-2)	0.24	0.00	-0.13	0.13	0.04	-0.26	-0.23	-0.50
<i>yhiW</i>	GadW Transkriptionsrepressor	-0.09	-0.03	-0.51	-0.04	0.07	-0.24	-0.05	-0.34
<i>ada</i>	O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase	-0.08	-0.07	-0.57	-0.12	-0.03	-0.27	-0.04	-0.13
<i>bolA</i>	Transkriptionsregulator	0.21	0.02	-0.65	-0.01	-0.03	-0.08	-0.05	-0.61
<i>rseC</i>	RseC: "regulator of sigma E"	0.02	-0.17	0.06	-0.13	-0.26	-0.20	-0.17	-0.50
<i>flhD</i>	FlhC Transkriptionsaktivator des Flagellum Operons	0.18	-0.20	-0.39	-0.05	-0.12	-0.33	-0.37	-0.50
<i>hipA</i>	HipA Transkriptionsaktivator	0.10	-0.29	-0.28	-0.20	-0.06	-0.26	-0.10	-0.61
<i>fliZ</i>	möglicher Regulator von SigmaF	-0.15	-0.33	-0.66	-0.35	-0.31	-0.56	-0.29	-1.05
<i>himD</i>	IHF Transkriptionsregulator	0.02	0.20	0.07	0.50	0.22	0.10	-0.01	-0.21
<i>cyaA</i>	Adenylat Zyklastase	-0.19	0.10	0.33	-0.05	0.04	0.23	0.01	0.20
<i>yeiL</i>	yeiL Transkriptionsaktivator	0.00	0.18	0.42	0.15	0.14	0.23	-0.02	0.27
<i>alpA</i>	AlpA Transkriptionsaktivator	-0.09	0.29	0.32	0.16	0.01	0.15	0.03	0.33
<i>tdcR</i>	Transkriptionsaktivator	-0.08	-0.02	0.21	0.08	-0.02	0.56	0.08	0.15
<i>hns</i>	H-NS Transkriptionsregulator	0.13	0.32	0.42	0.63	0.09	1.21	0.28	0.06
<i>chaC</i>	Kationentransport Regulator	0.00	0.03	0.18	0.22	0.09	0.47	0.16	0.18
<i>cysB</i>	UE von CysB Transkriptionsregulator	-0.02	0.00	0.34	0.04	0.14	0.37	0.18	0.20
<i>yjdG</i>	DcuR Transkriptionsaktivator	0.11	0.40	0.37	0.14	0.30	0.34	0.00	0.24
<i>b1399</i>	PaaX Transkriptionsregulator	0.11	0.33	0.33	0.23	0.30	0.47	0.11	0.19
<i>ygaE</i>	CsiR Transkriptionsrepressor	0.13	0.27	0.10	0.07	0.11	0.47	0.02	0.14
<i>gutM</i>	GutM Transkriptionsaktivator	0.15	0.38	0.20	0.20	-0.07	0.34	0.06	0.03
<i>lrhA</i>	LrhA Transkriptionsrepressor	-0.07	0.09	0.36	0.31	0.16	0.32	0.42	0.33
<i>cspE</i>	CspE Transkriptionsrepressor	0.21	0.21	0.60	0.81	0.74	0.69	0.78	0.73
<i>b1420</i>	Regulatorisches Peptid	-0.08	0.08	0.43	0.62	0.94	0.66	0.85	0.92
<i>hupB</i>	DNA-binde Protein HU-beta NS1 (HU-1)	0.34	0.37	1.08	0.72	0.28	0.18	0.52	0.45
<i>malT</i>	Transkriptionsaktivator für Maltosegene	0.62	1.08	1.06	1.27	0.72	0.22	0.52	0.55
<i>htgA</i>	DNA-binde Regulator für Sigma 32 Promotoren	0.27	0.23	0.40	0.39	0.24	0.14	0.29	0.16
<i>hcaR</i>	Transkriptionsaktivator	0.45	0.58	0.72	0.72	0.63	0.26	0.36	0.86
<i>glcC</i>	Transkriptionsfaktor	0.40	0.33	0.67	0.32	0.48	0.06	0.36	0.52
<i>yjdH</i>	DcuS	0.24	0.47	0.30	0.44	0.44	0.38	0.40	0.53
<i>mhpR</i>	MhpR Transkriptionsregulator	0.30	0.60	0.64	0.72	0.60	0.66	0.50	0.37
<i>lldR</i>	LctR Transkriptionsrepressor	0.31	0.27	0.55	0.15	0.29	0.20	0.17	0.23
<i>srlR</i>	GutR Transkriptionsrepressor	0.23	0.27	0.28	0.32	0.09	0.26	0.11	0.13
<i>araC</i>	AraC Transkriptionsregulator	0.80	0.41	0.18	0.38	0.40	0.10	0.58	0.26
<i>fadR</i>	FadR Transkriptionsregulator	-0.02	0.06	0.11	0.39	0.05	0.14	0.02	0.18
<i>nac</i>	Nac Transkriptionsaktivator	0.07	0.04	0.51	0.09	-0.24	0.17	0.26	0.39
<i>fecR</i>	Regulator des fec Operon	0.10	0.06	1.59	-0.26	-0.16	-0.99	0.07	0.02

#### **3.4 Regulator-Analyse**

Eine Neubildung oder Ausverdünnung von Proteinen erlaubt der Zelle nur ein langsames Einstellen auf Umweltveränderungen. Daher werden Enzyme unter veränderten Umweltbedingungen oft auf posttranskriptionaler oder posttranslationaler Ebene reguliert (Schlegel 1992). Dies gilt auch für viele Regulatoren. Veränderungen dieser Regulatoren können daher nicht über die Microarray-Technologie detektiert werden. Betrachtet man hingegen die differentiell regulierten Gene, so kann indirekt auf die regulatorische Aktivität der sie regulierenden Aktivatoren und Repressoren geschlossen werden. Um also Aussagen über aktive Regulatoren unter Kohlenhydrat-Limitierung zu machen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die im Vergleich zur Referenz in mindestens einem Zeitpunkt als „differentiell exprimiert identifizierten“ Gene bezüglich ihrer Operone und der sie regulierenden Aktivatoren, Repressoren sowie deren Sigma-Faktoren untersucht (siehe auch 2.2.11 „Regulator-Analyse“). Gene wurden dann in die Analyse mit einbezogen, wenn 50% oder mehr der Gene des betreffenden Operons über die Zeit als „differentiell exprimiert“ identifiziert werden konnten. 353 Gene waren hiervon betroffen.

Zwischen Sigma-Faktoren und Regulatoren wurde unterschieden, da Sigma-Faktoren eine übergeordnete Rolle in der Regulationshierarchie einnehmen. Assoziiert an die RNA-Polymerase erlauben sie die Transkription spezifischer Gene. Diese Transkription wird darüber hinaus oft durch die Aktivität verschiedener Regulatoren beeinflusst. Die „alternativen Sigma-Faktoren“ geben der Zelle die Möglichkeit, Stress-Situationen zu bewältigen (durch die Expression entsprechender Enzyme, die vor dem Stress schützen). Eine entscheidende Rolle hierbei soll das unter Limitierung gebildete Nukleotid-Derivat ppGpp spielen. Dieses wechselwirkt mit der RNA-Polymerase und soll so die Affinität der Sigma-Faktoren für diesen Enzymkomplex verändern.

Mit Hilfe der Regulator-Analyse konnte die potentielle regulatorische Aktivität verschiedener Sigma-Faktoren nachgewiesen werden. Gene konnten durch die Sigma-Faktoren  $\sigma^{70}$  (*rpoD*),  $\sigma^{32}$  (*rpoH*),  $\sigma^{19}$  (*fecI*),  $\sigma^{24}$  (*rpoE*),  $\sigma^{54}$  (*rpoN*) sowie  $\sigma^{38}$  (*rpoS*) beschrieben werden (Aktivitätsverlauf siehe Abb. 3.23 Teil 1 und Teil2).  $\sigma^{28}$  (*rpoF*, *fliA*) war als einziger Sigma-Faktor nicht als „aktiv“ identifiziert worden und war neben *rpoE* ebenfalls über die Microarray-Analyse detektiert worden (siehe auch 3.3.5 „Proteinbiosynthese“).



**Abb. 3.23: Aktive Sigma-Faktoren, identifiziert über die Regulator-Analyse.** Für die einzelnen Zeitpunkte T1 - T8 ist die Anzahl der potentiell regulierten Gene aus 353 Genen angegeben. Diese wurden von Operonen transkribiert, die durch die Microarray-Analyse zu 50% oder mehr als „differenziell exprimiert“ gegenüber der Referenz identifiziert wurden. In der Grafik ist die Zeit nach Einsetzen der Glukose-Limitierung angegeben (T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3

### 3. Ergebnisse

entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min nach Limitierung). Gene konnten durch die Sigma-Faktoren  $\sigma^{70}$  (*rpoD*),  $\sigma^{54}$  (*rpoN*),  $\sigma^{38}$  (*rpoS*),  $\sigma^{24}$  (*rpoE*),  $\sigma^{32}$  (*rpoH*) und  $\sigma^{19}$  (*fecI*) transkribiert werden.

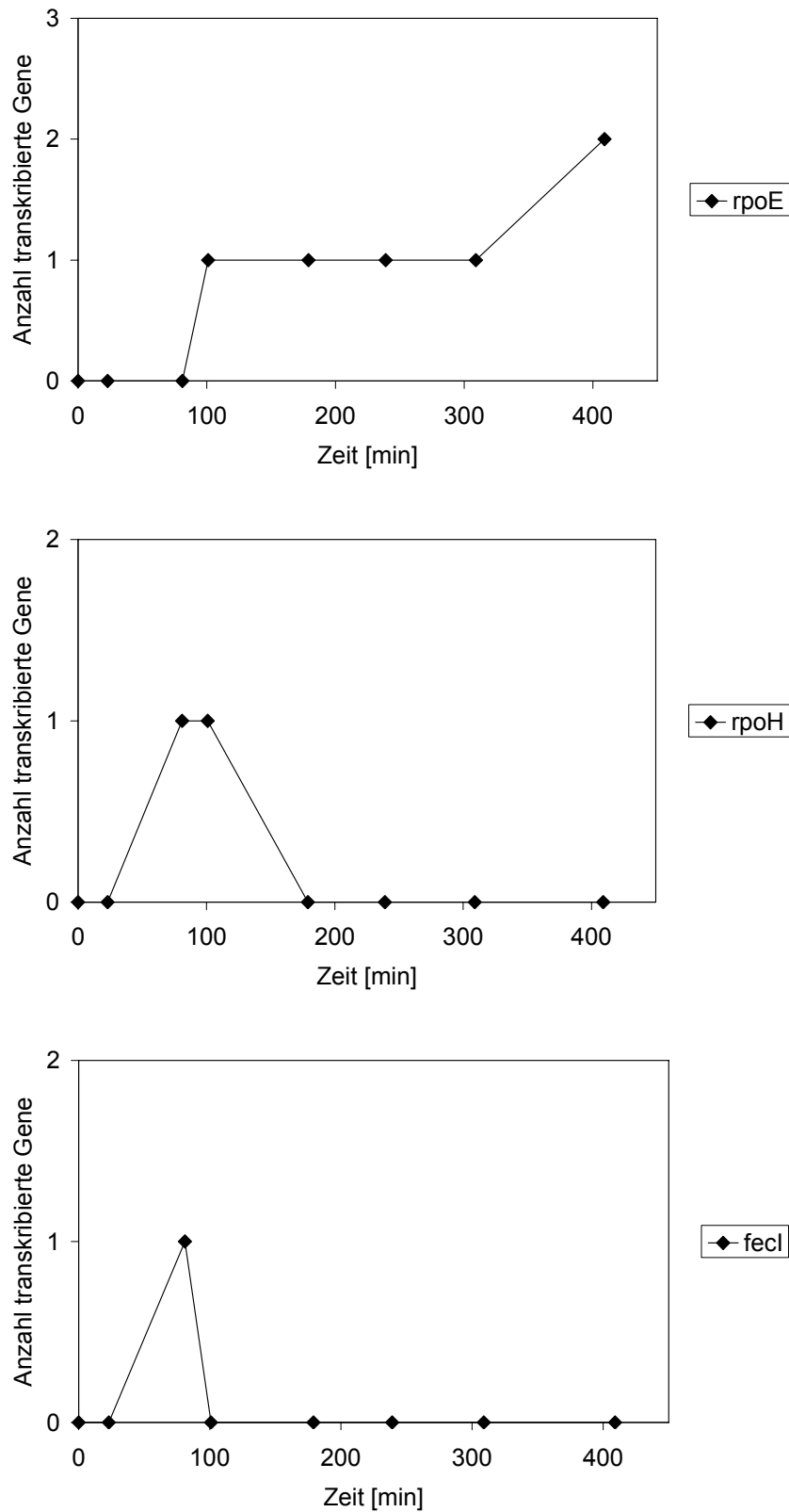


Abb. 3.23 Fortsetzung: Aktive Sigma-Faktoren, identifiziert über die Regulator-Analyse.

Neben den Sigma-Faktoren konnten für die 353 Gene weiterhin 28 Regulatoren als „aktiv“ identifiziert werden (Tab. 3.28). Sieben der über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifizierten Regulatoren konnten auch über die Microarray-Analyse „als signifikant hochreguliert“ gegenüber der Referenz gefunden werden (Aktivitätsverlauf dieser sieben Regulatoren siehe Abb. 3.24 bis Abb. 3.30). Eine graphische Darstellung des Aktivitätsverlaufes der übrigen 21 Regulatoren sowie eine detaillierte Beschreibung der Funktion aller 28 Regulatoren ist dem Anhang zu entnehmen (Abb. 7.1, Tab. 7.12).

Kein Regulator, der über die Microarray-Analyse in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz „als signifikant herunterreguliert“ gefunden wurde, wurde über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert.

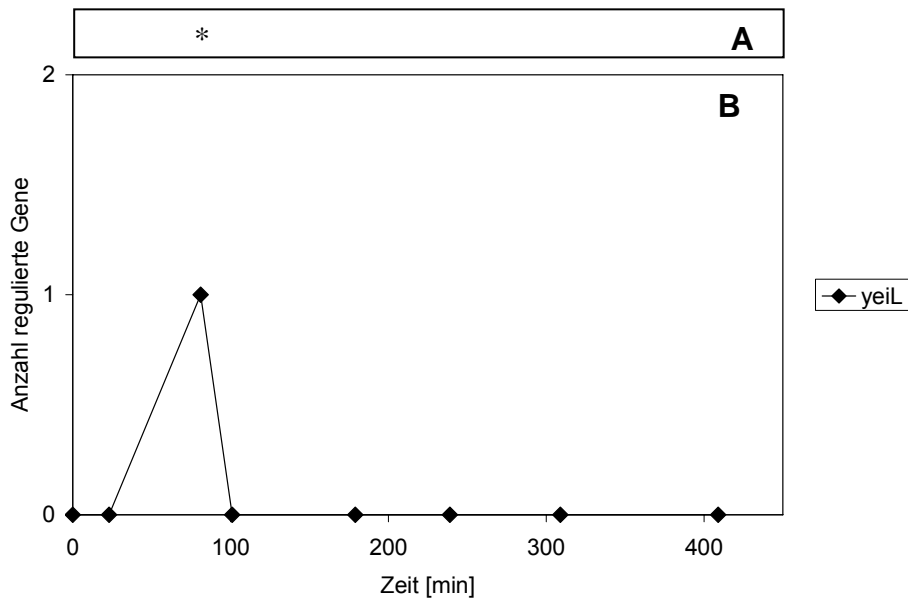
### 3. Ergebnisse

**Tab. 3.28: Regulatoren, die über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert wurden.** Angegeben sind Gen und Funktion. Fett-gedruckte Regulatoren (*yeiL*, *hns*, *gutM*, *lrhA*, *malT*, *glcC* und *fadR*) wurden sowohl über die Microarray-Analyse als auch über die Regulator-Analyse identifiziert. Die Informationen sind der EcoCyc Datenbank ([www.EcoCyc.org](http://www.EcoCyc.org) - Stand: Dezember 2005) entnommen.

<b>Regulator</b>	<b>Funktion</b>
<i>argR</i>	Regulator der Arginin Biosynthese
<i>crp</i>	Regulator Katabolit-sensitiver Operone
<b><i>fadR</i></b>	Regulator des Fettsäuremetabolismus
<i>fnr</i>	Regulator vieler an der fermentativen und anaeroben Atmung beteiligter Gene
<i>fruR = cra</i>	Regulator einer Vielzahl von Operonen des Zentralen Kohlenstoffwechsels
<i>fur</i>	Negativer Regulator des Eisentransports
<i>gcvA</i>	Regulator des Glycin Abbaus
<i>gcvR</i>	Regulator des Glycin Abbaus
<b><i>glcC</i></b>	Aktivator der Glycolatverwertung
<b><i>gutM</i></b>	Aktivator der Glucitolverwertung
<b><i>hns</i></b>	Nukleoid-assoziiertes, DNA bindendes Protein, vorwiegend reprimierend
<i>ihf</i>	Induziert Knicke in der DNA und wird bei der sequenzspezifischen Rekombination, Replikation, Transkriptions- und Translationskontrolle benötigt
<b><i>lrhA</i></b>	Regulator der NADH Dehydrogenase Gene
<b><i>malT</i></b>	Regulator der Maltoseverwertung
<i>melR</i>	Regulator einiger Gene des Melbiosekatabolismus
<i>narL</i>	Regulator von Genen der fermentativen und anaeroben Energiegewinnung, Bestandteil eines Zwei-Komponenten Systems
<i>ntrC</i>	Regulator einiger Gene, welche bei der Stickstoff-Assimilation eine Rolle spielen, Bestandteil des Zwei-Komponenten Systems NtrB/NtrC
<i>pdhR</i>	Regulator der Strukturgene des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes.
<i>purR</i>	Regulator der <i>de novo</i> Biosynthese der Purin-Nukleotide
<i>rscB</i>	Positiver Regulator für die Kapselsynthese und Zellteilung, Bestandteil eines Zwei-Komponenten Systems
<i>rtcR</i>	Regulator der Strukturgene der RNA Phosphat Zyklase
<i>sdiA</i>	Regulator einiger Zellteilungsgene
<i>trpR</i>	Regulator der Tryptophan-Biosynthese
<i>tyrR</i>	Regulator einiger Biosynthese- und Transportgene aromatischer Aminosäuren
<i>uidR</i>	UidR kontrolliert die Expression des <i>uidRABC</i> Operons zusammen mit UxuR
<i>ulaR</i>	Repressor des <i>sga</i> Operons sowie von <i>yjfR</i> .
<i>xylR</i>	Regulator der Xylose-Verwertung
<b><i>yeiL</i></b>	Positiver Regulator des Nukleosidmetabolismus

### 3.4.1 Über die Microarray-Analyse sowie die Regulator-Analyse identifizierte Regulatoren

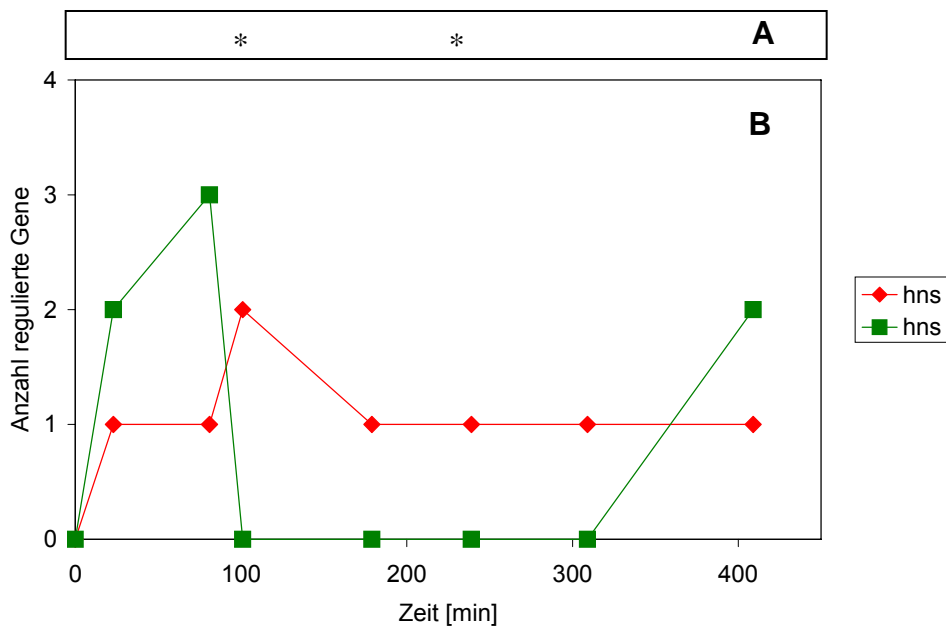
Sieben Regulatoren, kodiert durch die Gene *yeiL*, *hns*, *gutM*, *lrhA*, *malT*, *glcC* sowie *fadR*, wurden sowohl über die Microarray-Analyse als auch über die Regulator-Analyse identifiziert. Abb. 3.24 bis Abb. 3.30 zeigen den Verlauf der regulatorischen Aktivität bzw. der mRNA-Konzentrationen. Signifikante Änderungen gegenüber der Referenz sind in den Abbildungen mit einem \* gekennzeichnet (Werte für die doppelte Standardabweichung sind dem Anhang zu entnehmen Tab. 7.9). Der Regulator YeiL war in Zeitpunkt 3 signifikant gegenüber der Referenz erhöht exprimiert und wies in diesem Zeitpunkt eine regulatorische Aktivität auf (Abb. 3.24). YeiL kann seine eigene Synthese positiv regulieren und ist auch über IHF, der ebenfalls eine regulatorische Aktivität aufwies, positiv reguliert (Abb. 7.1).



**Abb. 3.24: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators YeiL.** YeiL war zum Zeitpunkt T3 (entspricht der 81. min nach Glukose-Limitierung bzw. 30 min nach der kompletten Kohlenhydrat-Limitierung) signifikant erhöht exprimiert und regulierte ein Gen positiv

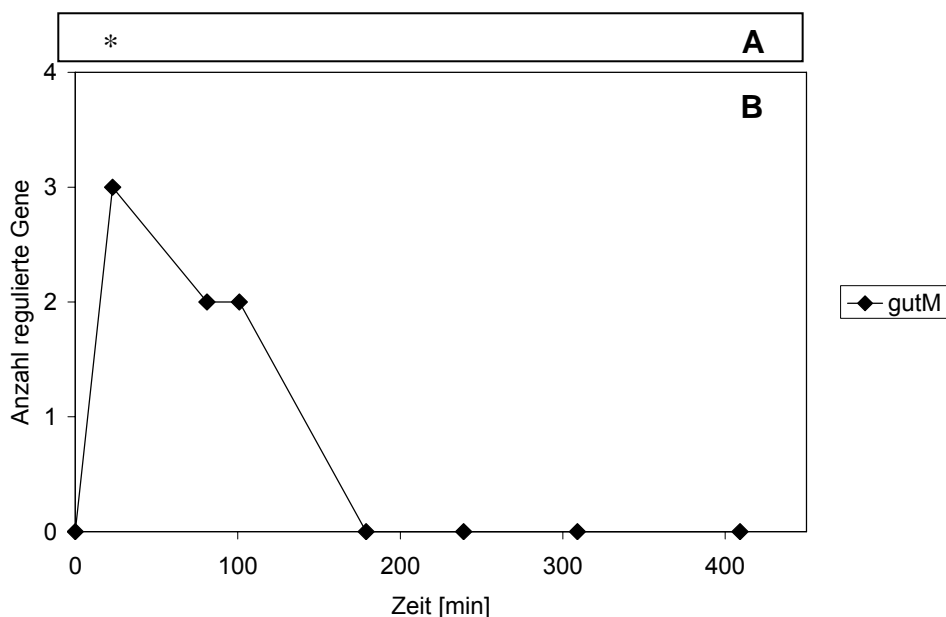
Der Regulator H-NS wies zu den Zeitpunkten T4 und T6 eine erhöhte Expression gegenüber der Referenz auf. Als positiver Regulator wies H-NS eine regulatorische Aktivität zu den Zeitpunkten T2 bis T8 auf, als negativer Regulator zu den Zeitpunkten T2, T3 und T8 (Abb. 3.25 A und B).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.25: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators H-NS.** H-NS wirkt als Aktivator (rote Kurve) und als Repressor (grüne Kurve) und war zu den Zeitpunkten T4 und T6 signifikant erhöht exprimiert. H-NS wies eine Aktivität als Aktivator zu den Zeitpunkten T2 - T8 sowie als Repressor zu den Zeitpunkten T2, T3 und T8 auf. T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min nach Einsetzen der Limitierung

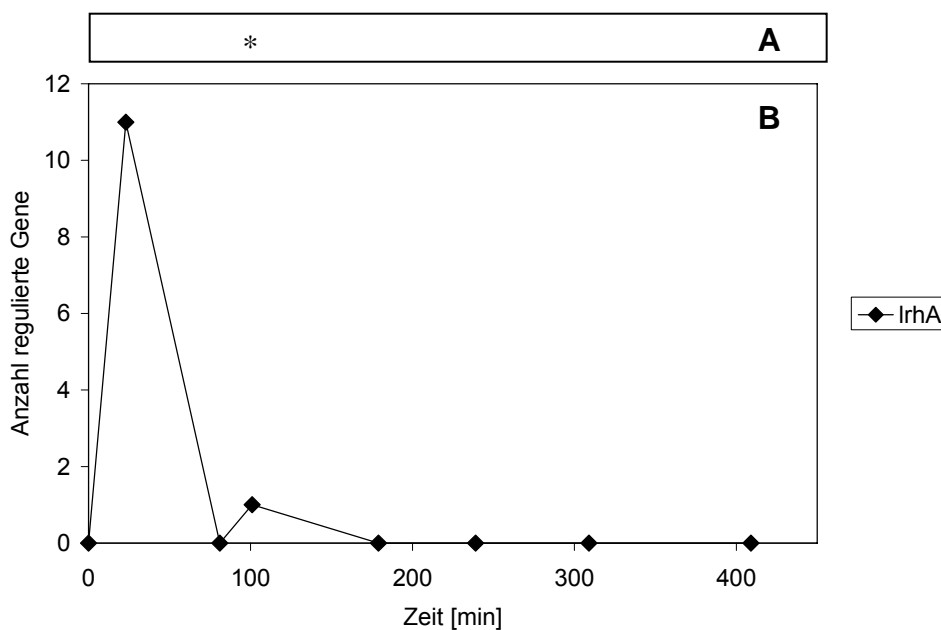
Der Regulator GutM wies eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Referenz sowie die maximale regulatorische Aktivität zum Zeitpunkt T2 auf (Abb. 3.26 A und B).





**Abb. 3.26: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators GutM.** GutM war zum Zeitpunkt T2 signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zur Referenz und regulierte Gene zu den Zeitpunkten T2, T3 und T4 positiv. T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min unter Limitierung

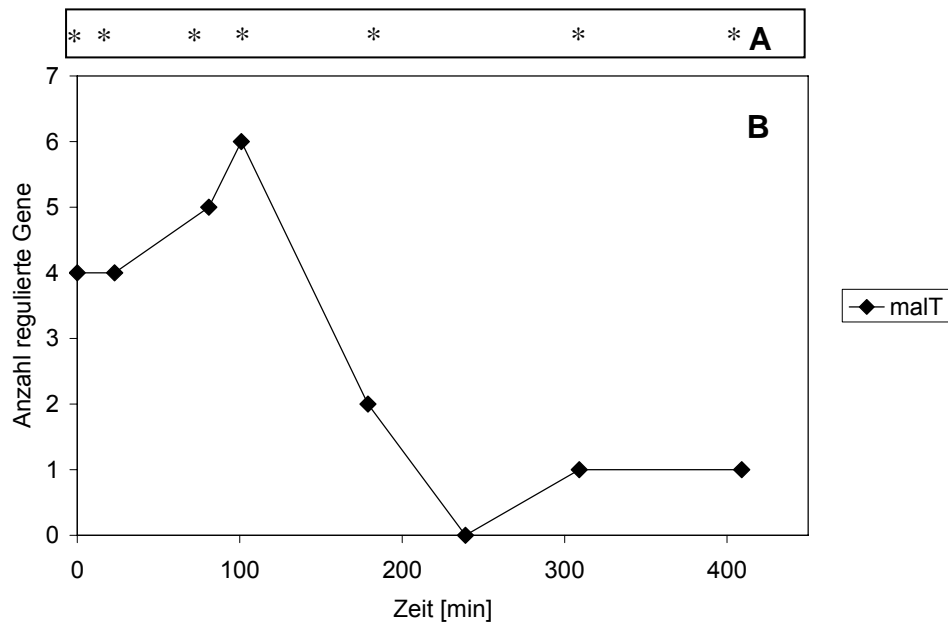
Der Aktivator LrhA wies eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Referenz zum Zeitpunkt T4 auf. Eine Tendenz zur Hochregulation im Vergleich zur Referenz ist über den gesamten betrachteten Zeitraum zu erkennen. Eine regulatorische Aktivität wies LrhA zu den Zeitpunkten T2 und T4 auf (Abb. 3.27 A und B).



**Abb. 3.27: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators LrhA.** LrhA war zum Zeitpunkt T4 signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zur Referenz und regulierte Gene zu den Zeitpunkten T2 und T4 positiv. T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min unter Limitierung.

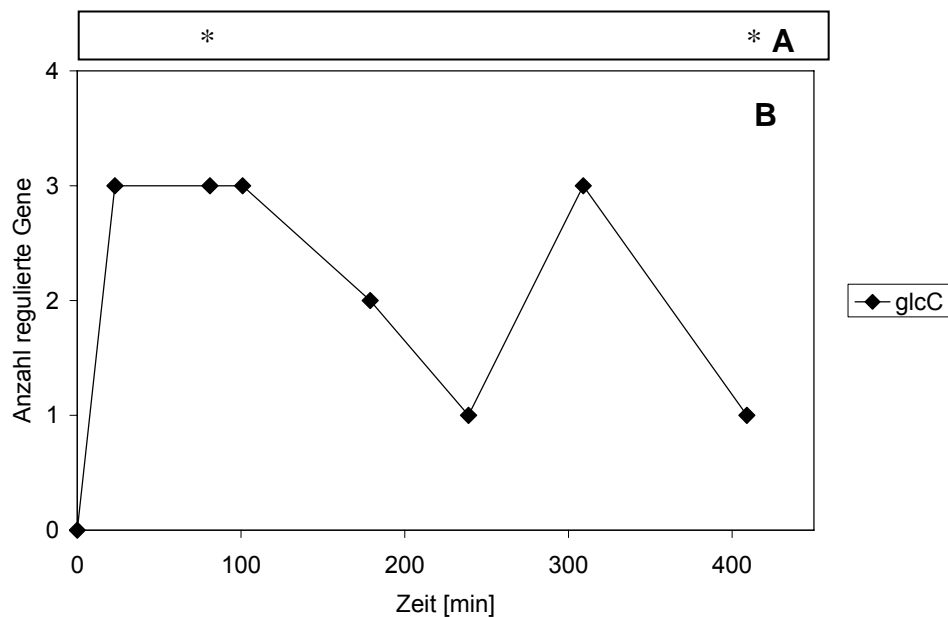
Der Aktivator MalT wies eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Referenz zu den Zeitpunkten T1 - T5 sowie T7 und T8 auf. Lediglich zum Zeitpunkt T6 war keine erhöhte Expression festzustellen. Die regulatorische Aktivität hatte einen identischen Verlauf (Abb. 3.28 A und B).

### 3. Ergebnisse



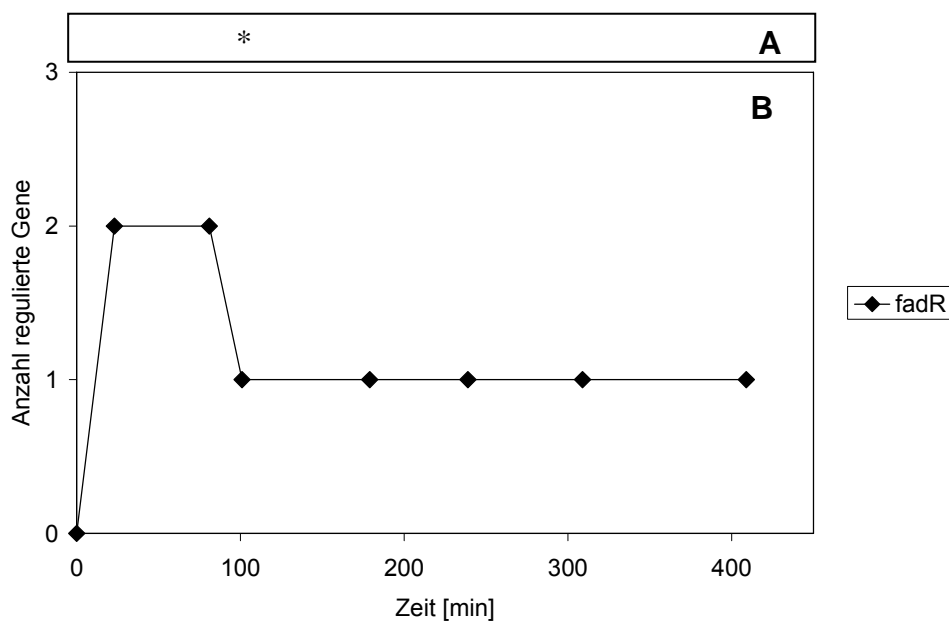
**Abb. 3.28: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators MalT.** MalT war zu den Zeitpunkten T1 - T5 sowie T7 und T8 signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zur Referenz und regulierte Gene zu den gleichen Zeitpunkten positiv. T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min nach Limitierung

Der Aktivator GlcC wies eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Referenz zu den Zeitpunkten T3 und T8 auf. Eine regulatorische Aktivität war über den gesamten Zeitverlauf mit Ausnahme von T1 zu verzeichnen (Abb. 3.29 A und B).



**Abb. 3.29: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators GlcC.** GlcC war zu den Zeitpunkten T3 und T8 signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zur Referenz und regulierte Gene zu allen Zeitpunkten mit Ausnahme von T1 positiv. T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min nach Limitierung

Der Aktivator FadR wies eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Referenz zum Zeitpunkt T4 auf, eine regulatorische Aktivität war hingegen zu allen Zeitpunkten mit Ausnahme von T1 zu verzeichnen (Abb. 3.30 A und B).



**Abb. 3.30: Signifikante Änderungen, detektiert über die Microarray-Analyse (A) und die Aktivität (B) des Regulators FadR.** FadR war zum Zeitpunkt T4 signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zur Referenz und regulierte Gene zu allen Zeitpunkten mit Ausnahme von T1 positiv. T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min unter Limitierung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Gesamtgenomische Microarrays und experimentelles Design

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die experimentelle Untersuchung der physiologischen Antwort von *E. coli* K12 (W3110) auf eine Glukose-Limitierung auf der Ebene des Transkriptoms. Zur Transkriptanalyse wurden gesamtgenomische *E. coli* K12 Microarrays hergestellt und über ein „Common Reference Design“ mit markierter cDNA hybridisiert. Um physiologische Veränderungen des Bakteriums *E. coli* im zeitlichen Verlauf zu analysieren, wurden aus drei Fermentationen Proben entnommen. Die Fermentationen wurden am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart als gekoppelte Batch/Fed-Batch-Fermentationen mit einer konstanten Zulauftrate durchgeführt (Keller 2005). Die Kulturproben für die Transkriptom-Analysen wurden über mehrere Stunden nach Beginn der Glukose-Limitierung zu jeweils vergleichbaren Umweltbedingungen entnommen. Eine Probe aus der exponentiellen Wachstumsphase der Batch-Fermentation, diente als „nicht Glukose-limitierte“ Referenzprobe zum Vergleich mit den unter Limitierung entnommenen Proben. Das verwendete „Common Reference Design“ erlaubte die Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Proben unter Limitierung und der Referenzprobe. Wie nachfolgend diskutiert wird, konnten viele Ergebnisse klassischer experimenteller Arbeiten mit der hier verwendeten Technik bestätigt werden. Darüberhinaus konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden (zusammenfassend in 4.2.1 „Überblick der physiologischen Antwort unter Kohlenhydrat-Limitierung“ dargestellt). Die gewählte Strategie einer gesteuerten, limitierenden Glukosezufuhr mittels Fed-Batch sowie die Verwendung des „Common Reference Designs“ erwiesen sich somit als geeignet zur Analyse und Charakterisierung der physiologischen Antwort von *E. coli* K12 (W3110) auf Kohlenhydrat-Limitierung.

Die Reproduzierbarkeit von Microarray Experimenten wird durch biologische sowie technische Faktoren (Extraktion, Markierung und Hybridisierung der Proben) beeinflusst. Weitere Fehler ergeben sich beim nachfolgenden Prozess der Bildgenerierung und Analyse (z.B. Staub auf dem Microarray, unterschiedliche Lasereinstellungen des Scanners beim Auslesen der Fluoreszenz-Signalintensitäten usw.) (Churchill 2002).

In der vorliegenden Studie wurde die biologische Variabilität durch Fermentationen von drei unter identischen Bedingungen aus Einzelkolonien angezogen Kulturen berücksichtigt. Erfahrungsgemäß lässt sich diese Variabilität in Microarray-Experimenten im Allgemeinen bereits anhand von drei biologischen Replikaten ausreichend genau kontrollieren

(Bioconductor Mailingliste - <http://www.bioconductor.org/docs/mailList.html>). Grundsätzlich lässt sich über die Anzahl der Freiheitsgrade angeben, ob die notwendige Anzahl biologischer Replikate verwendet wurde (Churchill 2002). Die Anzahl der Freiheitsgrade berechnet sich aus der Anzahl unterschiedlicher Einheiten abzüglich der Anzahl unterschiedlicher Behandlungen. Die Anzahl unterschiedlicher Einheiten (also die Anzahl der biologischen Replikate/Fermentationen) entspricht im vorliegenden Experiment der Zahl drei für die Zeitpunkte T1 bis T4 bzw. zwei für die Zeitpunkte T5 bis T8 und die Anzahl der unterschiedlichen Behandlungen (also die Limitierung zum gegebenen Zeitpunkt) für jeden Zeitpunkt entspricht der Zahl eins. Damit ergeben sich ein Freiheitsgrad bzw. zwei Freiheitsgrade für die untersuchten Zeitpunkte. Liegt die Anzahl der Freiheitsgrade über Null, so ist eine Aussage über die biologische Varianz möglich (Churchill 2002). Andernfalls werden nur technische Unterschiede berücksichtigt. Fünf Freiheitsgrade gelten für höhere Organismen als optimal. Finanzielle und zeitliche Limitierungen ließen im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Analysen weiterer Fermentationen und eine damit verbundene Erhöhung der Freiheitsgrade nicht zu. Eine Erhöhung der Anzahl der biologischen Replikate würde unter Umständen die Identifizierung weiterer, in dieser Studie nicht erfasster Veränderungen ermöglichen (Winter 2006).

Technische Fehlerquellen wurden durch die Durchführung von Dye-Swap Experimenten minimiert. Darüber hinaus wurde, um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der Microarray-Experimente zu erreichen, eine fermentationsbasierte Kultivierungsstrategie anstelle von Experimenten im Schüttelkolben gewählt, da hierfür bessere Reproduzierbarkeiten für bakterielle Transkriptomanalysen zu erwarten waren, wie von Chang und Kollegen beschrieben wurde (Chang et al. 2002). Es wurde durchweg eine gute Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Fermentationen mit hohen Pearsonschen Korrelationswerten für die Dye-Swap Experimente und die biologischen Replikate erzielt. Die Werte lagen bezüglich der Reproduzierbarkeit im Rahmen allgemein angegebener Grenzparameter (Chang et al. 2002; Churchill 2002) und erlaubten Aussagen bezüglich der Kohlenhydrat-Limitierung in *Escherichia coli* auf gesamtgenomischer Ebene (siehe nachfolgende Diskussion).

### **4.2 Differentiell exprimierte Gene und Regulatoranalyse**

Ziel der vorliegenden Studie war eine genauere Charakterisierung der physiologischen Antwort von *E. coli* K12 (W3110) auf Kohlenhydrat-Limitierung. Zu verschiedenen Zeitpunkten unter Kohlenhydrat-Limitierung konnten umfassende Änderungen der mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur unlimitierten Phase nachgewiesen werden. Im Folgenden wird zunächst ein Überblick der physiologischen Antwort von *E. coli* K12 (W3110) auf die Kohlenhydrat-Limitierung gegeben. Daraufhin werden im Detail die Glukoseaufnahme und der veränderte Glukose- und Kohlenhydrat-Katabolismus sowie die ppGpp-vermittelte Antwort der Stringenten Kontrolle diskutiert. Die Ergebnisse der Regulator- sowie der Sigma-Faktor Analyse werden in die Diskussion mit einbezogen.

#### 4.2.1 Überblick der physiologischen Antwort unter Kohlenhydrat-Limitierung

*E. coli* verfügt über zahlreiche Mechanismen, sich verändernden Umweltparametern anzupassen. Unter hohen Glukose-Konzentrationen, wie sie bei der Referenzprobe vorlagen, wurde im Rahmen des „metabolic overflows“ Acetat gebildet und exkretiert (Xu et al. 1999b). Nach Verbrauch der Glukose wurde Acetat aus dem Medium wieder in die Zelle aufgenommen und verstoffwechselt. Auf die darauf folgenden limitierenden Bedingungen reagierte die *E. coli* Kultur mit einer Hungerantwort, denn mit fallender Wachstumsrate induzierten die Zellen eine cAMP/CRP- sowie Cra-vermittelte Zellantwort. Diese war durch die Bildung hoch affiner Glukose-Transportsysteme sowie eine Enzyymbildung zur Verstoffwechslung von Acetyl-CoA, synthetisiert aus Acetat und dem Abbau von Fettsäuren, charakterisiert (siehe auch 4.2.3 „Zentraler Kohlenstoffwechsel“). Acetyl-CoA diente bis zum Ende der Fermentation als zusätzliche Kohlenstoff-Quelle. Die Glukose-Konzentration sank über den Fermentationsverlauf kontinuierlich ab. Nach einigen Stunden unter Limitierung wurden die hochaffinen Transportsysteme zum Teil wieder herunterreguliert. Als Ursache kann höchstwahrscheinlich eine herabgesetzte cAMP-Konzentration angesehen werden. Diese ließe sich durch die Messung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen erfassen. Da dies jedoch mit einem hohen experimentellen Aufwand verbunden ist, war die Messung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen in der experimentellen Konzeption nicht vorgesehen. Das PTS-System war vermutlich über den gesamten betrachteten Zeitraum, wenn auch vermindert, aktiv.

In der Hungerphase wurde ferner trotz ausreichender Ammoniumkonzentrationen im Medium ein physiologischer Zustand beobachtet, der einer Stickstoff-Limitierung ähnelt. Die drei unter Stickstoff-Limitierung aktiven Systeme in *E. coli* (NtrC-, Nac- sowie  $\sigma^N$ -vermittelte Reaktionen) wurden aktiviert (siehe auch 4.2.3 „Zentraler Kohlenstoffwechsel“).

Die hier beobachtete Stickstoff-Stressantwort bewirkte die Transkription von Genen verschiedener Aminosäure-Transporter bzw. versetzte die Zelle in die Lage, Transportproteine für Aminosäuren zu induzieren. Da die Kohlenstoffgerüste zahlreicher Aminosäuren zur Energiegewinnung oxidiert werden können (McFall und Newman 1996), stellt diese Reaktion möglicherweise neben der cAMP/CRP-vermittelten Antwort eine weitere Möglichkeit für *E. coli* dar, Kohlenstoffquellen zu erschließen.

Die ersten Stunden unter Glukose-Limitierung zeichneten sich also durch ein verstärktes Bestreben der Zelle aus, Kohlenhydrate zu akquirieren und eventuell weiterhin vorhandene Kohlenstoffquellen zu verwerten.

Diese sogenannte Hungerphase ging in eine Phase über, die noch nicht eindeutig der „Starvation“ zuzuordnen war. Charakteristisch hierfür waren Veränderungen der Transportaktivitäten, ursächlich in der vermutlich reduzierten cAMP-Konzentration in der Zelle. Das Wachstum war zwar deutlich herabgesetzt aber noch nicht eingestellt. Unter den gegebenen Limitierungs-Bedingungen war noch keine akute Stressantwort zu verzeichnen. Dies äußerte sich in einer nicht vollständig ausgeprägten  $\sigma^S$ -Antwort. Durch welches Stress-System diese veränderte Stressantwort vermittelt wurde, kann hier nicht eindeutig bestimmt werden. Neben den Genen, die einer physiologischen Funktion zugeordnet werden konnten, kodierten über ein Drittel aller differentiell exprimierten Gene für Proteine mit noch unbekannter Funktion. Es ist durchaus denkbar, dass Vermittler einer solchen, hier beobachteten Stressantwort, bisher noch nicht identifiziert wurden.

Die ribosomale Biosynthese war über den gesamten Limitierungszeitraum stringent kontrolliert, wie die ppGpp Synthese und die herabgesetzte Ribosomen Biosynthese beweisen (siehe auch 4.2.4 „Die Stringente Kontrolle“). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ferner, dass das Bild der Stringenten Kontrolle bezüglich der Aminosäure Biosynthese sowie der  $\sigma^S$ -Antwort angepasst werden sollte. Unter Kohlenhydrat-Limitierung konnte eine herabgesetzte Synthese der mRNA für Enzyme der Aminosäurebiosynthese nachgewiesen werden. Ob dies tatsächlich eine herabgesetzte Aminosäurekonzentration widerspiegelt, lässt sich nur vermuten. Aminosäure-Konzentrationsmessungen könnten solche Hypothesen verifizieren. Weiterhin war die Stringente Kontrolle nicht an eine Regulation der Physiologie durch  $\sigma^S$  (*rpoS*) gekoppelt. Wie die vorliegenden Ergebnisse vermuten lassen, spielte die  $\sigma^S$ -vermittelte Stressantwort lediglich eine untergeordnete Rolle. Sichere Aussagen jedoch ließen sich beispielsweise mit *rpoS* Deletionsmutanten machen. Diese sollten unter gegebenen experimentellen Bedingungen eine ähnliche physiologische Antwort wie der Wildtyp aufweisen.

Um eine Zuordnung der physiologischen Effekte zur Stringenten Kontrolle zu ergänzen, bietet sich ein Vergleich der Ergebnisse mit Experimenten an, die unter identischen Bedingungen mit ppGpp<sup>0</sup>-Mutanten durchgeführt werden müssten.

## 4. Diskussion

---

Die Untersuchung mehrerer Zeitpunkte unter Limitierung deckte darüber hinaus interessante Effekte der Glukose-Limitierung auf:

Zu einem späteren Zeitpunkt unter Limitierung wurde trotz ausreichender Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung eine Anaerobiosis wahrgenommen und mit der entsprechenden mRNA-Synthese anaerober Enzyme beantwortet (siehe auch 4.2.3.4 „Atmung“). Vermittelt wurde diese Antwort durch das Fermentations/Atmungs-Umschaltprotein (FrsA). Dieses reagiert auf einen veränderten Glukose-Transport (Koo et al. 2004). Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf ein Umschalten des Proteins nicht nur zwischen aerober Atmung und Fermentation sondern auch zwischen aerober Atmung und anaerober Atmung schließen.

Die Transkriptom-Analyse ergab weiterhin Hinweise auf die Regulation verschiedener Proteine unter Kohlenhydrat-Limitierung, die bisher als nicht reguliert galten bzw. entgegen der erwarteten Regulation reguliert wurden:

- Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gapA*) wurde früh unter Limitierung (T2 und T3) herunterreguliert, sollte aber durch cAMP/CRP aktiviert werden (siehe auch 4.2.3.1 „Glykolyse“). Arbeiten von Shimada und Kollegen legen eine Regulation durch Cra nahe (Shimada et al. 2005). Eine Regulation durch Cra würde zu der hier beobachteten Herunterregulation führen.
- Die Pyruvat Dehydrogenase Komponente LpdA wurde nicht differentiell exprimiert, obwohl eine verminderte Transkription bedingt durch die Repression durch cAMP/CRP zu erwarten gewesen wäre (siehe auch 4.2.3.1 „Glykolyse“). Hier muss von einem weiteren Regulationsmechanismus ausgegangen werden.
- Die Ribose-5-Phosphat Isomerase (*rpiA*) wurde signifikant hochreguliert, gilt aber als konstitutiv exprimiert (Skinner und Cooper 1971). Die erhöhte Expression unter den gegebenen Bedingungen erscheint sinnvoll und lässt auf eine Regulation des Enzyms unter Glukose-Limitierung schließen (siehe auch 4.2.3.3 „Pentosephosphat-Weg“).
- Bei sinkender Wachstumsrate wurde im vorliegenden Experiment eine herabgesetzte mRNA-Synthese von fünf Komponenten der ATP-Synthase beobachtet (siehe auch 4.2.3.4 „Atmung“). Für die Aktivität benötigt die ATP-Synthase insgesamt acht verschiedene Untereinheiten. Die Regulation der ATP-Synthase ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Arbeiten von Kasimoglu und Kollegen mit *atpI-lacZ*-Fusions-Experimenten weisen auf eine erhöhte Transkription bei sinkender Wachstumsrate hin (Kasimoglu et al. 1996). Diese Beobachtung konnte mit dem vorliegenden Experiment nicht bestätigt werden.



Weitere Erkenntnisse bezüglich der Regulation der genannten Enzyme könnten durch klassische molekularbiologische Studien wie Reportergergen Analysen (Luciferase Assay oder  $\beta$ -Galaktosidase Assay), die Erzeugung und Analyse von Mutanten oder auch Computer-gestützte Analysen der Transkriptionsfaktor-Bindestellen in den „up- und downstream“ DNA Elementen der betreffenden, regulierten Kandidaten erbracht werden.

Folgende Erkenntnisse konnten also über das vorliegende Microarray-Experiment gewonnen werden: Die Ergebnisse geben einen Überblick über die physiologische Antwort von *E. coli* unter Glukose-Limitierung über einen Zeitraum von etwa sieben Stunden auf Transkriptom-Ebene, sofern die betrachteten mRNA-Konzentrationsveränderungen sich im Rahmen der Detektions- und Diskriminierungsfähigkeit der Microarray-Analysen bewegten. Der Einfluss verschiedener regulatorischer Proteine sowie der Sigma-Faktoren konnte abgeleitet werden. Weiterhin wurden Hinweise auf Regulationsmechanismen bei Proteinen gefunden, die bisher als „nicht reguliert“ galten.

Eine eindeutige Zuordnung der verschiedenen Reaktionen des biologischen Systems *E. coli* unter Glukose-Limitierung zu verschiedenen Stressantwort-Systemen ist mit der Microarray-Analyse jedoch nicht zu leisten. Als unabdingbar für eine klare Zuordnung sind daher Microarray-Analysen unter identischen Bedingungen mit verschiedenen Mutanten (*relA/spoT*; *cya*; *cra*, *rpoS*) zu nennen.

Neben der Microarray-Analyse bietet sich eine weitere Technik, basierend auf der Microarray-Technologie, zur getrennten Analyse der verschiedenen physiologischen Systeme an. Diese als ROMA (Run-Off transcription/Microarray Analysis) bezeichnete Analyse kombiniert eine *in vitro* Transkription des gesamten Genoms mit Hilfe einer rekombinant exprimierten RNA-Polymerase. Die Transkription kann *in vitro* mit dem gewünschten Sigma-Faktor sowie wahlweise mit verschiedenen Alarmonen wie z.B. cAMP durchgeführt werden (Cao et al. 2002; Zheng et al. 2004). Die hierbei erzeugte RNA kann in cDNA umgeschrieben und dabei markiert werden. Identisch wie bei einem herkömmlichen Microarray-Experiment können verschieden markierte cDNA-Proben auf dem Microarray hybridisiert werden. Ein Vergleich der „*in vitro*-Transkriptome“ erlaubt dann eine Zuordnung. Getrennte Experimente mit den Sigma-Faktoren  $\sigma^S$  und  $\sigma^{70}$  unter Anwesenheit und Abwesenheit von ppGpp könnten beispielsweise eine genaue Zuordnung der potentiell durch die Sigma-Faktoren sowie ppGpp regulierten Gene *in vitro* geben. Ergänzende Studien *in vivo*, analysiert über klassische Microarray-Analysen könnten dazu beitragen, diejenigen Gene zu identifizieren, auf die weitere Faktoren einen Einfluss *in vivo* ausüben.

Um eindeutige Aussagen über die tatsächliche regulatorische Aktivität beteiligter Regulatoren beispielsweise an der Stringenten Kontrolle, der Hungerantwort oder der  $\sigma^S$ -vermittelten Stressantwort zu erhalten, sollten Microarrays mit den entsprechenden

## 4. Diskussion

---

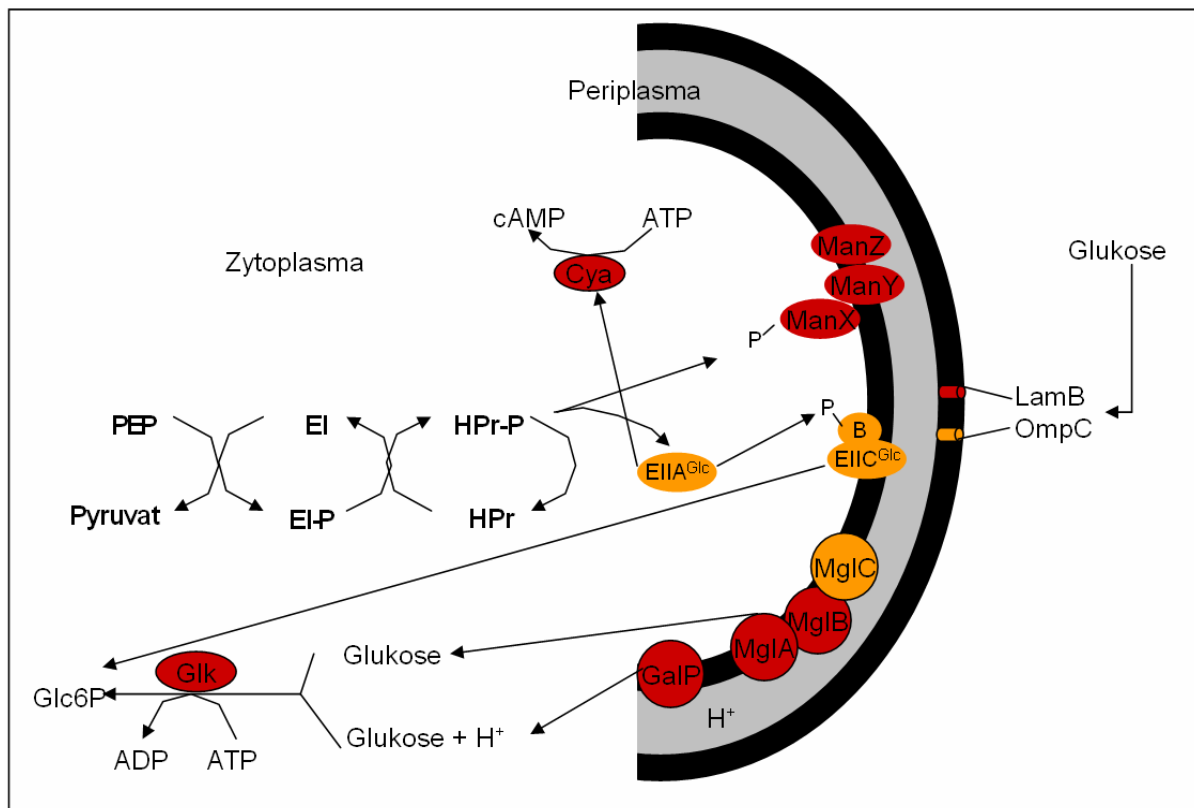
Promotor-DNA-Abschnitten hergestellt werden. Diese können Regulatoren aus Zelllysaten, welche zu verschiedenen Zeitpunkten unter Kohlenhydrat-Limitierung gewonnen werden, binden. Über markierte Antikörper gegen verschiedene Transkriptionsfaktoren können so aktive Regulatoren identifiziert werden. Diese Technik wird für die Aufklärung der eukaryotischen Transkriptionsfaktor-Regulation von der Firma Eppendorf bereits eingesetzt (Renard et al. 2001).

Über die Microarray-Analyse können nur semiquantitative Daten bezüglich veränderter mRNA Konzentrationen erhalten werden. Quantitative Aussagen ließen sich nur über weitere Methoden, beispielsweise eine quantitative Real-Time PCR machen. Ob die entsprechenden Enzyme und Proteine auch wirklich exprimiert wurden, lässt sich nur durch ergänzende Proteom- bzw. Metabolomanalysen abschließend klären.

### 4.2.2 Der Glukose-Transport

Zur Aufnahme verschiedenster extrazellulärer Nährstoffe besitzen Bakterien viele spezifische und unspezifische Transportsysteme, welche aufgrund des variierenden Angebotes einer ständigen Anpassung und damit komplexen Regulation bedürfen (Lengeler 1993). Die Glukoseaufnahme in *E. coli* erfolgt zunächst über die äußere Membran in den periplasmatischen Raum und daraufhin über die innere Membran in das Zytoplasma (Ferenci 1996).

Unter Kohlenhydrat-Limitierung wurden unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen verschiedene Glukosetransport Systeme verwendet. Abb. 4.1 zeigt schematisch die Systeme, die innerhalb der ersten 100 min unter Kohlenhydrat-Limitierung aktiv waren:



**Abb. 4.1: Glukoseaufnahmesysteme in *E. coli* unter Kohlenhydratlimitierung bis etwa 1,7 h unter Limitierung (Glukosekonz. < 0,05 g/L).** Glukose wurde über die Porine LamB und OmpC aus dem extrazellulären Raum ins Periplasma und aus dem Periplasma über den Galaktose-ABC-Transporter (MglABC), das Glukose-PTS (EIIA<sup>Glc</sup>, EIIC<sup>Glc</sup>) und das Mannose-PTS (ManXYZ) sowie über den galP/H<sup>+</sup>-Symporter ins Zytoplasma aufgenommen. Die herabgesetzte Glukosekonzentration führte zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (Cya) und der damit verbundenen cAMP-Synthese. Rot: über die Microarray-Analyse hochreguliert, gelb: nicht reguliert

Der Glukosetransport über die äußere Membran wird durch Porine bewerkstelligt. Bei millimolaren Konzentrationen von Glukose herrscht das Porin OmpC vor. Bei Glukosekonzentrationen im submillimolaren Bereich wird zusätzlich das Porin LamB cAMP/CRP-abhängig induziert (Ferenci 1996; Liu und Ferenci 2001). Die Transkription von LamB wird ferner durch den Regulator MalT aktiviert. LamB weist eine höhere Glukose-Transportkapazität als das Porin OmpC auf, da es über eine Zuckerbindestelle verfügt (Ferenci 1996). Es ist mit Teilen des Maltose-ABC-Transporters auf einem Operon (*malK-lamB-malM*) kodiert. Während der hier untersuchten Fermentation wurde Glukose mit Einsetzen der Limitierung bis etwa zum vierten Zeitpunkt über das Porin LamB transportiert, dessen mRNA-Konzentration signifikant erhöht war. Für MalT wurde eine erhöhte Expression über den gesamten betrachteten Zeitraum sowie eine regulatorische Aktivität über die Regulator-Analyse nachgewiesen. MalT verändert seine Konformation durch die Bindung von Maltotriose und wird so aktiviert. Maltotriose wird in *E. coli* durch endogene

#### 4. Diskussion

---

Induktorsynthese bei niedrigen Glukose-Konzentrationen gebildet (Ferenci 1996). Weiterhin wurde der Maltose ABC-Transporter, der ebenfalls durch MalT und cAMP/CRP positiv reguliert ist und auf zwei Operonen (dem oben genannten und *malEFG*) kodiert ist, innerhalb der ersten vier Zeitpunkte (100 min) unter Limitierung mit Ausnahme von *malG* hochreguliert. Eine erhöhte MalT-Transkription kam durch das Absondern des Repressors Mlc durch PtsG sowie die Transkriptionsaktivierung durch cAMP/CRP zustande (dieser Sachverhalt wird weiter unten näher erläutert, siehe auch Abb. 4.2). Im submikromolaren Glukose-Konzentrationsbereich soll kurzfristig ein weiteres Porin, OmpF, verstärkt transkribiert werden (Liu und Ferenci 1998). Dies konnte im vorliegenden Experiment nicht bestätigt werden. Hier wäre eine differentielle Expression von OmpF nach T4 zu erwarten gewesen. Möglicherweise wurde durch die Wahl von einstündigen Abständen der Probenahme gerade das Zeitfenster für die erhöhte Expression des Porins verfehlt.

Hochaffine Glukose-Transportsysteme werden nur in der Hungerphase, also dem Übergang zwischen exponentiellem Wachstum und „Starvation“ exprimiert. Diese Hungerphase wird in gewöhnlichen Batch-Fermentationen nur kurz durchlaufen. Daher wurden für Transporter-Studien unter Kohlenhydrat-Limitierung kontinuierliche Fermentationen mit unterschiedlichen Verdünnungsraten verwendet (Ferenci 1996). Über die kontinuierliche Fermentation kann eine definierte Wachstumsrate eingestellt und die Hungerphase somit über einen verlängerten Zeitraum betrachtet werden. Die Experimente zeigten die maximale Expression des LamB Porins im mikromolaren Glukose-Konzentrationsbereich. Extrazelluläre Glukose-Konzentrationen im millimolaren Bereich führten nicht zu einer detektierbaren Expression von LamB. Ferner wurde bei Glukose-Konzentrationen unter  $10^{-7}$  M (18 µg/L) über ein Abfallen der Expression auf das Ausgangsniveau berichtet. Über die hier verwendete Fed-Batch-Fermentation mit limitierter Glukosezufütterung wurden Glukose-Konzentrationen kleiner als  $10^{-4}$  M (18 mg/L) im Vergleich zur Referenz mit Glukose-Konzentrationen größer als  $10^{-3}$  M (180 mg/L) erreicht. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Glukosemessung war für Konzentrationen kleiner als  $10^{-4}$  M (18 mg/L) nicht sensitiv genug. Glukosemessungen in diesem Konzentrationsbereich machen einen hohen apparativen und methodischen Aufwand notwendig. Diese Geräte standen für die Analysen nicht zur Verfügung. Durch die kontrollierte Glukosezufütterungs-Strategie in der Fed-Batch-Fermentation kann aber von einer kontinuierlich weiter abnehmenden Glukose-Konzentration ausgegangen werden. Die mRNA-Konzentration für LamB ging unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen nach drei Stunden wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Das Zurückgehen auf das Ausgangsniveau wird für Verdünnungsraten von 0,6 1/h in der Literatur beschrieben (Ferenci 1996). Simulationsexperimente am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart (IBVT) lassen Abschätzungen über die Glukose-Konzentrationen in dem von der Meßtechnik nicht erfaßten Bereich zu und zeigen, dass die Verminderung der mRNA-

Konzentration des LamB Proteins in einen mit den Literaturangaben vergleichbaren Glukose-Konzentrationsbereich fällt (Hardimann 2006).

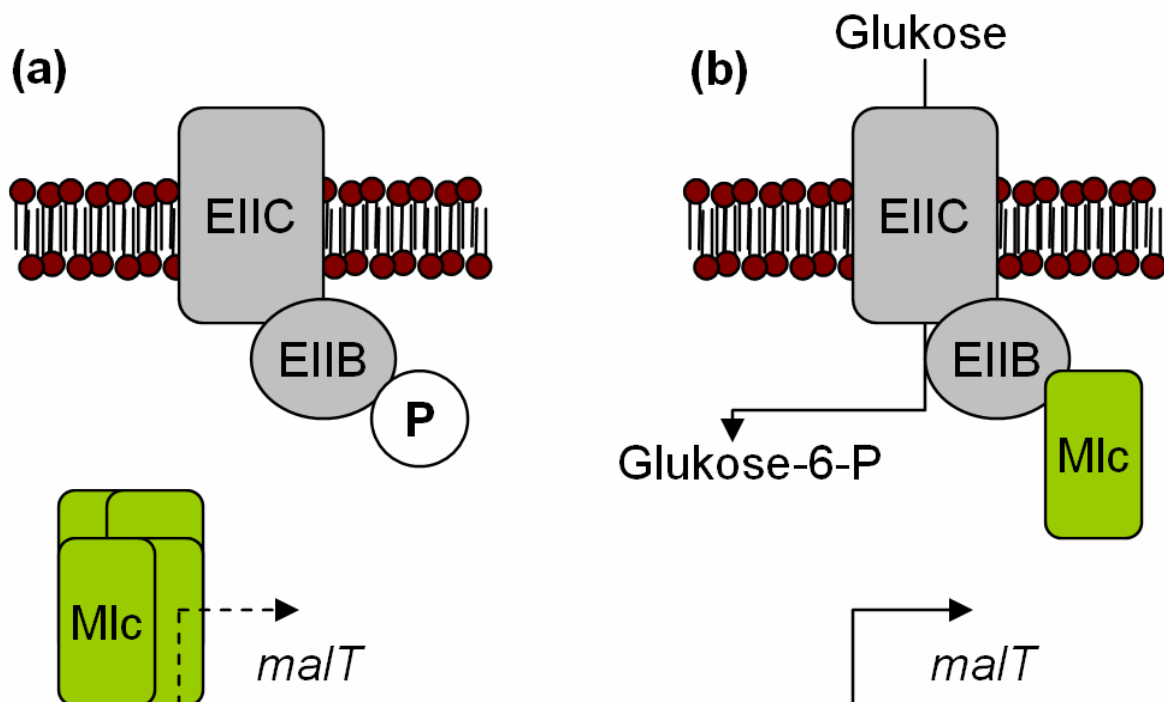
Transporter der zytoplasmatischen Membran, welche Glukose in die Zelle transportieren, weisen je nach Typ verschiedene Affinitäten für ihr Substrat auf (Lengeler 1993). ABC-Transporter ( $K_M$ : 0,1-10  $\mu$ M;  $V_{max}$ : 10-50 nmol/min\*mg (Lengeler 1993)) transportieren das Substrat aktiv unter Energieverbrauch durch ATP-Hydrolyse und sind in der Lage, entgegen großer Konzentrationsgradienten zu transportieren. Weiterhin sind hochaffine periplasmatische Bindeproteine Teile dieses Transporter-Typs. Diese ermöglichen den Transport bei mikromolaren Substratkonzentrationen im Periplasma. Unter Limitierung wurde Glukose durch den Galaktose-ABC-Transporter (*mgIBAC*) mit hoher Affinität transportiert. Der Transporter wurde durch cAMP/CRP induziert. Hierfür ist jedoch Galaktose notwendig. Durch endogene Induktorsynthese wird in *E. coli* bei niedrigen Glukose-Konzentrationen Galaktose gebildet. Galaktose bindet an den Repressor des *mgIBAC* Operons (GalS) und bedingt die cAMP/CRP-abhängige Transkription (Ferenci 1996). Die Studien von Ferenci belegen deutlich, dass der Galaktose-ABC-Transporter bei höheren, millimolaren Glukosekonzentrationen nicht gebildet wird, was die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Hochregulation unter Glukose-Limitierung erklärt. Die mRNA-Konzentration einer Untereinheit des Galaktosetransporters (*mgIA*) ging nach drei Stunden wieder auf das Ursprungsniveau zurück. Es ist also davon auszugehen, dass Glukose innerhalb der ersten 100 min, möglicherweise aber auch innerhalb der ersten drei Stunden unter Glukose-Limitierung verstärkt über den genannten ABC-Transporter ins Zytoplasma transportiert wurde.

PTS-System Transporter weisen eine moderate Affinität für ihr Substrat auf und transportieren bei mikromolaren bis millimolaren Konzentrationen ( $K_M$ : 0,1-10  $\mu$ M;  $V_{max}$ : 10-50 nmol/min\*mg (Lengeler 1993)). Sie werden bei allen Glukosekonzentrationen exprimiert, sind aber nicht immer aktiv (Ferenci 1999a). Laut Microarray-Analyse wurden verschiedene PTS-Transportsysteme verstärkt gebildet, nicht aber das für Glukose spezifische System (*ptsG* - EIICB). Die Signale der PTS-Komponenten waren auf dem Microarray detektiert worden. Die mRNA-Konzentrationen waren jedoch nicht signifikant verändert. Das Glukose-PTS System war bei den über die Fermentationen erreichten Glukose-Konzentrationen noch vollständig aktiv und transportierte unter diesen Konzentrationen weiterhin Glukose, denn der  $K_M$ -Wert des Enzyms wird mit 0,1-1  $\mu$ M angegeben.

Das Glukose-PTS System wird komplex reguliert. Sowohl Transkription als auch posttranskriptionale und posttranslationale Effekte spielen eine Rolle. *ptsG* wird unter Glukosemangel durch Mlc und  $\sigma^S$  reprimiert sowie durch cAMP/CRP aktiviert (Kim et al.

#### 4. Diskussion

1999; Seeto et al. 2004). Die Glukose-Konzentration war jedoch noch nicht ausreichend weit abgefallen, um eine Repression durch Mlc zu bewirken, der bei Glukose-Transport durch dephosphoryliertes EIIB sequestriert wird. Dadurch wird der Repressor von der DNA abgelöst und erlaubt die Translation Mlc-abhängiger Gene wie beispielsweise die des Regulators MalT (siehe Abb. 4.2) (Bohm und Boos 2004), welcher auch über die Microarray-Analyse hochreguliert gefunden wurde (siehe 3.4.1, „Über die Microarray-Analyse sowie die Regulator-Analyse identifizierte Regulatoren“). Mlc wurde unter den betrachteten experimentellen Bedingungen über die Regulator-Analyse nicht als „aktiv“ identifiziert.



**Abb. 4.2: Modell für die Absonderung des Regulators Mlc von der DNA.** Wird keine Glukose transportiert, so reprimiert Mlc die Expression der Gene (*malT* als Beispiel), die er reguliert (a). Wird Glukose über EIIBC transportiert, kann EIIB im dephosphorylierten Zustand den Regulator Mlc binden (b). Dadurch verliert sich die reprimierende Wirkung. P: Phosphat; (modifiziert nach (Bohm und Boos 2004))

Alternativ könnte die mRNA-Konzentration von EIICB posttranskriptional kontrolliert worden sein. Eine mRNA-Synthese und anschließende Degradation kann nicht ausgeschlossen werden. Die Kontrolle der *ptsG*-mRNA über RNase E in *pgi*- oder *pfkA*-Mutanten ist beschrieben worden (Kimata et al. 2001). Diese Mutanten weisen einen herabgesetzten glykolytischen Fluß auf. Der Fluß durch die Glykolyse war unter Glukose-Limitierung ebenfalls herabgesetzt.

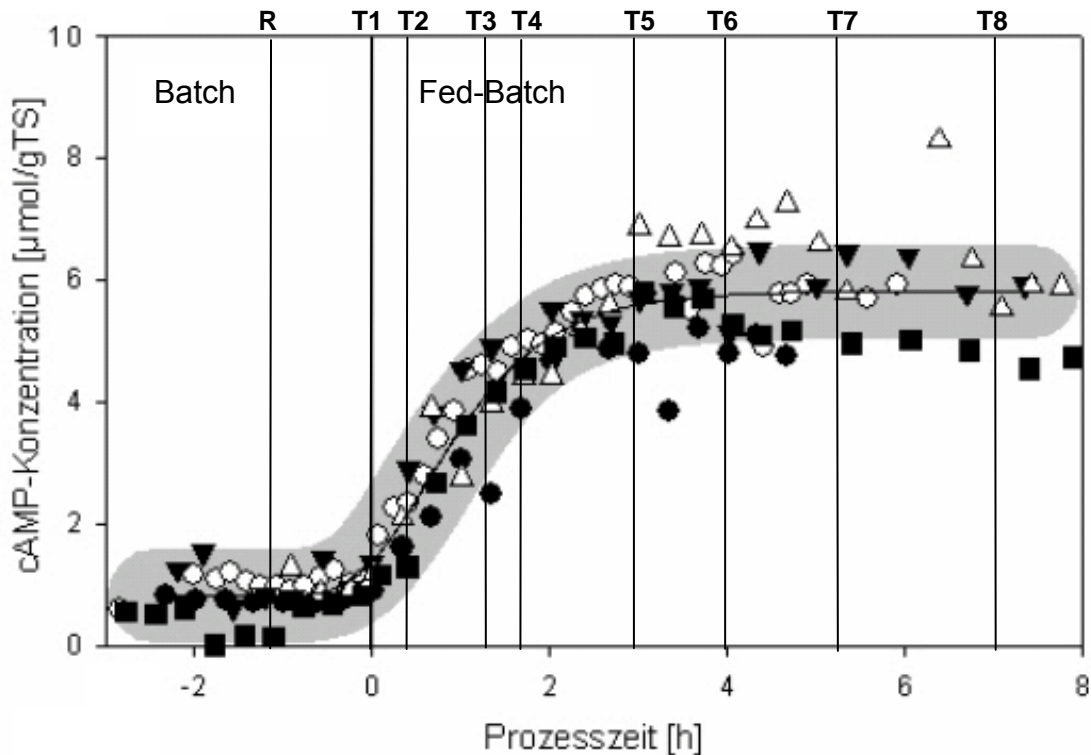
Unter Kohlenhydrat-Limitierung wurde Glukose also vorraussichtlich neben dem Transport durch die oben genannten Transporter auch weiterhin durch das glukosespezifische PTS-

System transportiert. Zusätzlich wurde Glukose auch durch das unter Limitierung induzierte Mannose-PTS System transportiert. Hierbei erfolgte die Phosphorylierung beim Transport, anders als bei dem oben genannten ABC-Transporter oder auch einem Glukose/H<sup>+</sup>-Symporter, der ebenfalls hochreguliert gefunden wurde. Nicht phosphorylierte Glukose wurde über die Glukokinase phosphoryliert und so in die Glykolyse eingeschleust (siehe 4.2.3.1, „Glykolyse“).

Die Änderungen der mRNA-Konzentrationen der unter Glukose-Limitierung innerhalb der ersten drei Stunden verwendeten Glukose-Transporter spiegeln die Hungerphase wider. Die Hungerphase wird vorwiegend durch das cAMP/CRP Regulatorsystem vermittelt. cAMP wird aus ATP unter Glukose-Limitierung durch das Enzym Adenylatzyklase gebildet. Die Adenylatzyklase wird über die Wechselwirkung mit phosphoryliertem EIIA<sup>Glc</sup> aktiviert. Phosphoryliertes EIIA<sup>Glc</sup> liegt vor, wenn das PTS-System nicht mit maximaler Kapazität transportiert. Die Adenylatzyklase war nach Beendigung der Acetat-Wiederaufnahme (T3) in der Zelle signifikant hochreguliert, eine ansteigende Tendenz war jedoch bereits zu Beginn der Limitierung zu verzeichnen.

Am IBVT wurde der zeitliche Verlauf der cAMP-Konzentration über HPLC-Nukleotidmessungen bestimmt (Keller 2005). Die verwendete Messmethodik erlaubte allerdings keine getrennte Messung der intrazellulären und extrazellulären cAMP-Konzentrationen (cAMP Konzentrationsverlauf siehe Abb. 4.3). cAMP wird gebildet und in den Extrazellularraum exkretiert (Saier, Jr. et al. 1975). Versuche bezüglich des cAMP-Transports von Goldenbaum und Kollegen aus dem Jahr 1979 ergaben, dass die cAMP-Wiederaufnahme der Zelle nur eine untergeordnete Rolle spielt und hohe extrazelluläre, physiologisch jedoch nie erreichte cAMP-Konzentrationen nötig wären, um eine Wiederaufnahme zu bewirken (Goldenbaum und Hall 1979). Es kann also angenommen werden, dass die zunächst angestiegenen cAMP-Konzentrationen der hier untersuchten Proben durch die Ausschleusung des cAMP intrazellulär wieder herabgesetzt wurden. Ferner konnte CRP, einem Vermittler der Katabolit Repression, über die Regulator-Analyse eine regulatorische Aktivität zugewiesen werden. Eine verminderte CRP-Aktivität wurde etwa nach drei Stunden unter Glukose-Limitierung festgestellt. Die 3',5'-Adenosinmonophosphat Phosphodiesterase, ein cAMP-abbauendes Enzym kodiert durch *cpdA* (Imamura et al. 1996), wurde nicht differentiell exprimiert. Die Regulation dieses Enzyms ist bisher noch nicht aufgeklärt. Deshalb kann nicht sicher gesagt werden, ob ein cAMP-Abbau über dieses Enzym erfolgte.

Die erhöhte regulatorische Aktivität von CRP speziell zu den ersten vier Zeitpunkten korreliert mit der Hochregulation vieler weiterer Transportsysteme.



**Abb. 4.3: Gesamt-cAMP-Konzentrationsverlauf (intra- und extrazellulär).** Die cAMP-Konzentrationen von fünf Fermentationen (entsprechen den Kreisen bzw. Dreiecken bzw. Quadraten in der Abbildung) zu verschiedenen Zeitpunkten wurde bestimmt. Zu sehen ist der cAMP-Anstieg unter Glukose-Limitierung (T1) bis etwa drei Stunden nach Einsetzen der Limitierung (T5). Über die Microarray-Analyse untersuchte Zeitpunkte T1-T8 sind durch senkrechte Striche markiert. R: Referenz, Quelle: (Keller 2005)

#### 4.2.3 Zentraler Kohlenstoffwechsel

Der Abbau von Glukose erfolgt unter aeroben Bedingungen über die Glykolyse, den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, den Pentosephosphat-Weg, den Tricarbonsäure-Zyklus sowie die Atmungskette (Schlegel 1992). Der Glyoxylat-Zyklus ermöglicht der Zelle die Verstoffwechslung von Acetat. Acetat kann aus der Umgebung aufgenommen werden, oder endogen gebildet werden. Dies geschieht im Rahmen der NADH-neutralen Überflussreaktion der Glykolyse (Metabolic Overflow) (Xu et al. 1999b) und einer nachfolgenden Wiederaufnahme unter Glukose-Limitierung sowie über die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren (Schlegel 1992).

Die Glykolyse, der Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg, der Pentosephosphat-Weg, der TCA sowie der Glyoxylat-Zyklus wiesen unter Glukose-Limitierung im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase Veränderungen auf. Glukose und Acetat (gebildet in der exponentiellen Phase) waren die primären Kohlenstoffquellen, die der Zelle zur Verfügung standen.





#### 4. Diskussion

---

bedingt durch den herabgesetzten Bedarf an Reduktionsäquivalenten (NADPH) für die Biosynthese.

Der Pyruvat Dehydrogenase Komplex setzte Pyruvat zu Acetyl-CoA um. Acetyl-CoA wird bei Glukoseüberschuss durch die Phosphat Acetyl-Transferase (*pta*) zu Acetylphosphat und weiterhin durch die Acetat Kinase (*ack*) zu Acetat umgesetzt (Xu et al. 1999a). Auch für die vorliegende Arbeit kann eine Acetat-Synthese über die beiden genannten Stoffwechsellenzyme angenommen werden. Acetat wurde unter Glukoseüberschuss ausgeschieden. Unter limitierenden Glukose-Konzentrationen (Konz. der Glukose < 0,05 g/L), wurde zuvor ausgeschiedenes Acetat wieder aufgenommen und zu Acetyl-CoA umgesetzt. Dies kann über zwei Stoffwechselwege erfolgen (Brown et al. 1977). Zum einen kann Acetat über die Acetyl-CoA Synthetase (*acs*) zu Acetyl-CoA umgesetzt werden, und im TCA sowie dem Glyoxylat-Zyklus verstoffwechselt werden. Die Acetyl-CoA Synthetase war mit Ausnahme von T1 über den gesamten betrachteten Zeitraum hochreguliert. Zum anderen kann Acetat über die Acetat Kinase (*ack*) zu Acetylphosphat phosphoryliert werden und daraufhin durch die Acetyltransferase (*pta*) zu Acetyl-CoA für die Einschleusung in den TCA sowie den Glyoxylat-Zyklus umgesetzt werden. Die genannten Enzyme des zweiten Weges waren nicht differentiell reguliert. Sie katalysieren aber auch die Acetat-Synthese (s.o.). Da Acetat bereits zum Zeitpunkt der Entnahme der Referenzprobe gebildet wurde, waren die Enzyme demnach schon voll induziert. Acetat wurde also im vorliegenden Experiment unter Glukose-Limitierung über die Acetyl-CoA Synthetase und zusätzlich über Acetat Kinase sowie die Acetyltransferase zu Acetyl-CoA umgesetzt. Proteomanalysen von *E. coli* unter Glukose-Limitierung unterstützen diese Theorie (Nystrom 1994).

Nach Beendigung der Acetat-Wiederaufnahme befand sich die Kultur in der vollständigen Kohlenhydrat-Limitierung, konnte aber über die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren C2-Körper mittels des TCA und des Glyoxylat-Zyklus in den Stoffwechsel einführen. Dies korreliert vollständig mit den Transkriptionsdaten der Gene von Teilen des TCA, des Glyoxylat-Zyklus sowie der Fettsäureoxidation, deren Expression unter Limitierung über nahezu den gesamten betrachteten Zeitraum hochreguliert war.

Unter Kohlenhydrat-Limitierung, nach der abgeschlossenen Acetat Wiederaufnahme, war trotz ausreichender Ammoniumkonzentrationen im Medium ein physiologischer Zustand beobachtet worden, der sich zum Teil auch unter Stickstoff-Limitierung einstellt. Die drei unter Stickstoff-Limitierung benötigten Systeme in *E. coli* (NtrC-, Nac- sowie  $\sigma^N$ -vermittelte Reaktionen) wurden aktiviert.

Stickstoff kann in Form von Ammonium über zwei verschiedene Wege in den Stoffwechsel eingeführt werden. Bei hohen Ammoniumkonzentrationen im Medium katalysiert die Glutamat Dehydrogenase die Synthese von Glutamat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Ammonium.

Unter Stickstoff-Limitierung wird Glutamat über zwei Enzyme, die Glutamin Synthetase sowie die Glutamat Synthase gebildet. Glutamat dient als Ammoniumdonor für die meisten Ammonium-benötigenden Stoffwechselwege (Aminosäure Biosynthese, Nukleotid Biosynthese etc.) (Reitzer und Schneider 2001).

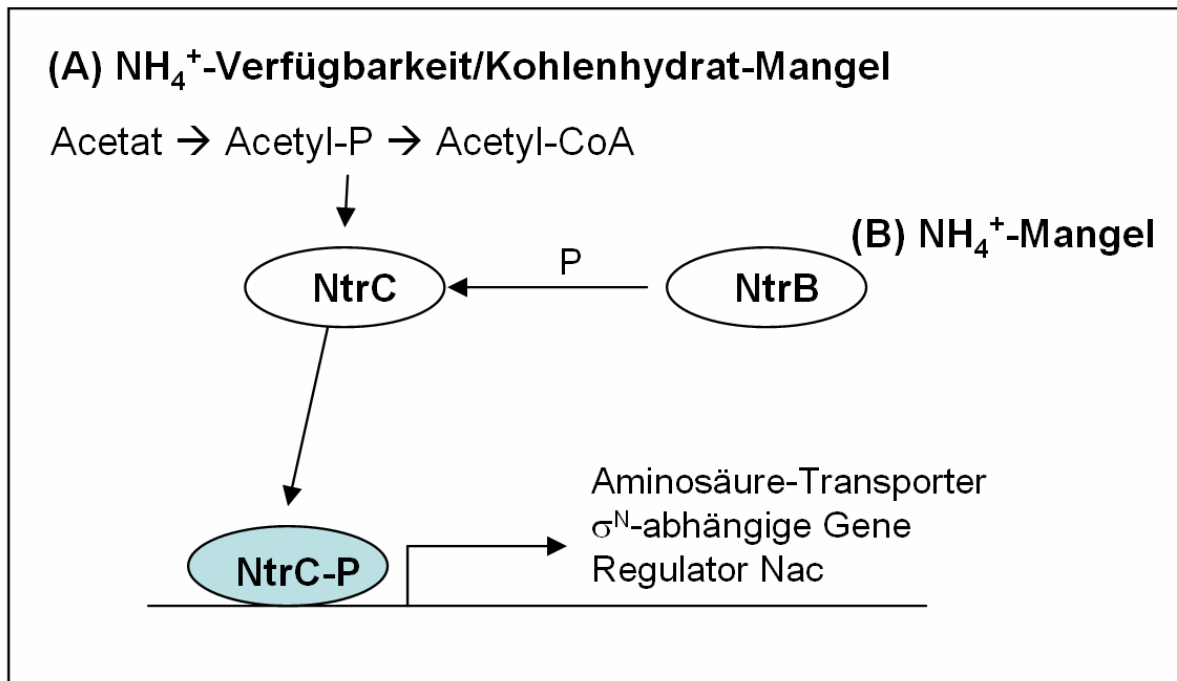
Unter Kohlenhydrat-Limitierung wird bevorzugt die Glutamat Dehydrogenase für die Glutamat Synthase verwendet (Helling 1994). Dies kann über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn die Gene der Glutamat Dehydrogenase wurden nicht reguliert, wohl aber die Gene des zweitgenannten Ammonium-Assimilations Weges. Diese Gene wurden herunterreguliert, die Glutamin Synthetase sowie die Glutamat Synthase wurden demnach nicht für die Ammonium Assimilation verwendet. Die Glutamin Synthetase weist ferner eine höhere Affinität für Ammonium auf (Reitzer und Schneider 2001). Dies stellt einen weiteren Grund dar, weshalb sie unter den hohen Ammoniumkonzentrationen nicht verwendet wurde. Trotzdem waren die Stickstoff-Stress-Systeme angeschaltet.

NtrC ist ein Mitglied des Zwei-Komponenten NtrB/NtrC-Regulationssystems und kontrolliert als Aktivator die Expression einiger Gene, welche bei der Stickstoff-Assimilation eine Rolle spielen. Es aktiviert  $\sigma^N$ -Promotoren und das *nac*-Gen (s.u.). Weiterhin bewirkt es die Expression von Transportproteinen für alternative Stickstoffquellen (Reitzer und Schneider 2001).

Unter Stickstoff-Limitierung wird die Phosphorylierung von NtrC durch NtrB forciert. NtrC ist aktiv und bewirkt die Transkription der genannten Gene. Unter Stickstoff-Überschuss hingegen kann NtrC nicht über diesen Weg aktiviert werden.

Ein weiterer Weg zur NtrC Aktivierung ist von Feng und Kollegen beschrieben worden (Feng et al. 1992): Sie konnten durch Verwendung von NtrB-Mutanten zeigen, dass eine NtrC vermittelte Antwort bei Stickstoff-Verfügbarkeit im Medium NtrB unabhängig ausgelöst wird. Acetylphosphat wurde als Auslöser der NtrC-Aktivierung nachgewiesen (zur Veranschaulichung siehe auch Abb. 4.5).

Die hier beobachteten Ergebnisse in Zusammenhang mit den von Feng und Kollegen gemachten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass auch in dem hier durchgeführten Experiment eine NtrC-Antwort bei Stickstoff-Verfügbarkeit im Medium durch Acetylphosphat ausgelöst wurde. Zum Zeitpunkt T3 war Acetat aus dem Medium vollständig aufgenommen und über Acetylphosphat zu Acetyl-CoA verstoffwechselt worden. Das Intermediat Acetylphosphat könnte also als Phosphorylgruppen-Donor für NtrC fungiert und die oben genannte Antwort ausgelöst haben.



**Abb. 4.5: Vereinfachte Darstellung der NtrC-vermittelten Transkription.** Der Regulator NtrC bewirkt in der phosphorylierten Form (NtrC-P) die Transkription verschiedener Gene, die *E. coli* eine Stressantwort bei Stickstoffmangel ermöglichen. Die Phosphorylierung wird bei  $\text{NH}_4^+$ -Mangel durch NtrB ermöglicht (B). Feng und Kollegen legen die Vermutung nahe, dass bei  $\text{NH}_4^+$ -Verfügbarkeit auch Acetyl-Phosphat (Acetyl-P) als Phosphorylgruppen-Donor fungieren kann (Feng et al. 1992). Die NtrC-P bedingte Transkription konnte im vorliegenden Experiment unter Kohlenhydrat-Limitierung beobachtet werden und lässt vermuten, dass die Zelle den Transport von Aminosäuren forciert, um Kohlenstoff-Quellen zu akquirieren.

NtrC bewirkt die Transkription  $\sigma^{\text{N}}$ -regulierter Gene.  $\sigma^{\text{N}}$ -Konzentrationen bleiben über die Zeit konstant und benötigen zusätzlich regulatorische Enhancer. Auch der genannte Regulator NtrC wirkt als Enhancer (Reitzer und Schneider 2001). Weiterhin sind unter Umständen „DNA-knickende“ Regulatoren notwendig. IHF und ArgR konnten unter Limitierung nachgewiesen werden. Aufgrund seiner konstitutiven Expression änderten sich die mRNA-Konzentrationen des Sigma-Faktors  $\sigma^{\text{N}}$  nicht signifikant unter Kohlenhydrat-Limitierung.

Ferner wurde das Gen des Regulators Nac zum Zeitpunkt T3 verstärkt transkribiert. Nac soll zahlreiche Gene für Aminosäure-Transporter positiv regulieren. Die *nac* Transkription wird durch NtrC aktiviert und durch Nac selbst inhibiert (Reitzer und Schneider 2001). Dies konnte auch im vorliegenden Experiment beobachtet werden.

Die hier beobachtete Stickstoff-Stressantwort führte zur Expression und Aktivierung regulatorischer Komponenten, die vorwiegend die Transkription von Genen verschiedener Aminosäure-Transporter aus dem umgebenden Medium ermöglichen. Die Zelle wurde also in die Lage versetzt, eine der Stickstoff-Limitierung vergleichbare Zellantwort auszulösen.

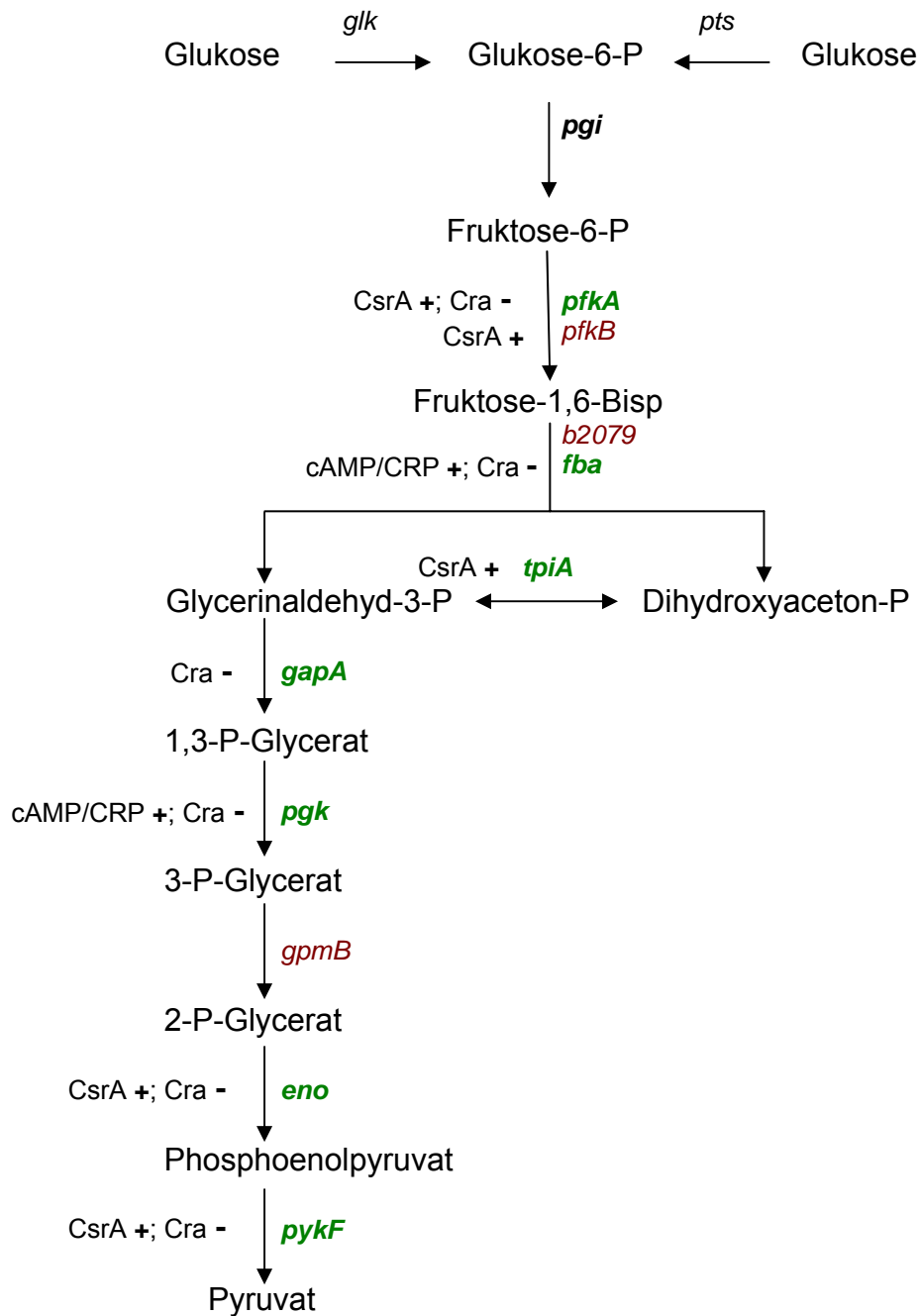
Möglicherweise stellt diese Reaktion eine weitere Möglichkeit für *E. coli* dar, Kohlenstoffquellen zu akquirieren. Die Kohlenstoffgerüste zahlreicher Aminosäuren können zur Energiegewinnung oxidiert werden (McFall und Newman 1996).

Im Folgenden werden die einzelnen Teilaspekte des Zentralen Kohlenstoffwechsels im Detail diskutiert.

#### 4.2.3.1 Glykolyse

Die überwiegende Herunterregulation der glykolytischen Enzyme kann durch das Zusammenspiel der Regulatoren Cra, cAMP/CRP und CsrA erklärt werden (<http://www.ecocyc.org/> - Stand: Dezember 2005 (Keseler et al. 2005); (Ramseier et al. 1993; Ramseier et al. 1995; Sabnis et al. 1995)). Darüber hinaus ist bekannt, dass allosterische Regulationen die Aktivität der Enzyme beeinflussen (Schlegel 1992). 20 min nach dem Beginn der Glukoselimitierung zeigte sich bereits eine verminderte Expression glykolytischer Enzyme. Glukose stand für die Glykolyse nur noch begrenzt zur Verfügung. Die Zelle induzierte schon bei einsetzender Glukose-Limitierung mit abnehmender Wachstumsrate hoch affine Glukoseaufnahmesysteme wie das Glukose-PTS-System, den Galaktose/Glukose ABC-Transporter (*mgIABC*) sowie den Galaktose/H<sup>+</sup>-Symporter (*galP*) (Ferenci 1996). Dieser Transport wurde bereits unter 4.2.2 „Der Glukose-Transport“ diskutiert.

Glukose, die nicht über PTS-Transporter aufgenommen wurde, musste zunächst phosphoryliert werden. Hierfür induziert die Zelle ein spezielles Enzym, die Glukokinase (Kawai et al. 2005). Erhöhte mRNA-Konzentrationen der Glukokinase unter Limitierung konnten in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung durch die Glukokinase ermöglichte der Glukose den Eintritt in die Glykolyse. Die Herunterregulation der Glykolyse-Enzyme wurde zum einem durch die erhöhte regulatorische Aktivität des reprimierenden Regulators Cra, nachgewiesen durch die Regulator-Analyse, zum anderen durch die Verminderung der aktivierenden Eigenschaft eines zweiten Regulators, CsrA, bewirkt. CsrA war zum Zeitpunkt T2 sowie T6 signifikant herunterreguliert. Einen Überblick über die Regulation der Glykolyse unter Kohlenhydrat-Limitierung gibt Abb. 4.6.



**Abb. 4.6: Glykolyse.** Dargestellt sind unter Kohlenhydrat-Limitierung in *E. coli* regulierte Gene der Glykolyse sowie deren Regulatoren. Grün: herunterreguliert, rot: hochreguliert. +: Aktivierung durch den Regulator, -: Hemmung durch den Regulator. Isoenzyme sind nicht fett gedruckt. Cra wurde unter Kohlenhydrat-Limitierung nicht reguliert, CsrA hingegen wurde herunterreguliert und verliert so seine aktivierende Wirkung. *glk*: Glukokinase, *pts*: stellvertretend für Glukose-PTS-Transportsystem, *pgi*: Phosphoglukose Isomerase, *pfkA*: Phosphofruktokinase 1, *pfkB*: Phosphofruktokinase 2, *tpiA*: Triosephosphat Isomerase, *fba*: Fruktosebisphosphat Aldolase, *b2079*: Fruktosebisphosphat Aldolase, *gapA*: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogease, *pgk*: Phosphoglycerat Kinase, *gpmB*: Phosphoglycerat Mutase 2, *eno*: Enolase, *pykF*: Pyruvatkinase 1

Die Phosphoglucose Isomerase (*pgi*) war als einziges Enzym der Glykolyse nicht differentiell reguliert. Ihre konstante Transkription verdankt sie ausschließlich der  $\sigma^{70}$ -abhängigen Regulation ohne Beteiligung der oben genannten Regulatoren.

Die 6-Phosphofruktokinase 1 (*pfkA*) wurde durch Cra gehemmt und durch CsrA aktiviert. Die katalysierte Reaktion der 6-Phosphofruktokinase ist neben den Reaktionen der Glukokinase und der Pyruvatkinase 1 irreversibel und wird zusätzlich allosterisch reguliert. Die 6-Phosphofruktokinase 1 wird durch PEP inhibiert und durch ADP, AMP und GDP aktiviert. Die verminderte Glukose-Aufnahme durch das PTS Transportsystem mangels Glukose im Medium resultierte folgerichtig in einem herabgesetzten PEP-Verbrauch. Dies könnte zur Hemmung der PfkA-Aktivität beigetragen haben.

Die Fruktosebisphosphat Aldolase (*fba*) sowie die Phosphoglycerat Kinase (*pgk*) werden durch Cra gehemmt, durch cAMP/CRP hingegen aktiviert. Der hemmende Einfluss von Cra war offensichtlich stärker als der aktivierende Einfluss des cAMP/CRP-Komplexes, für den in dieser Studie ebenfalls eine regulatorische Aktivität nach Einsetzen der Glukose-Limitierung nachgewiesen werden konnte (siehe 4.2.2, „Der Glukose-Transport“).

Die Triosephosphat Isomerase (*tpiA*) und die Enolase (*eno*) werden durch CsrA aktiviert (Sabnis et al. 1995). Die herabgesetzte Expression dieses Regulators bewirkte also ebenfalls eine Herunterregulation der genannten Enzyme.

Interessant ist die Herunterregulation der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gapA*), die durch cAMP/CRP aktiviert wird. Shimada und Kollegen bestimmten 2005 eine Konsensus Bindesequenz für Cra „upstream“ des *gapA* Gens (Shimada et al. 2005). Dieses könnte also durch Cra herunterreguliert werden. Die vorliegenden Ergebnisse bekräftigen diese Hypothese.

Der dritte irreversible Schritt der Glykolyse wird durch die Pyruvatkinase 1 (*pykF*) katalysiert. Auch PykF wurde durch die verminderte Expression von CsrA sowie die Reprimierung durch Cra herunterreguliert. Da der Kohlenstoff-Fluss durch die Glykolyse herabgesetzt war (Keller 2005), kann auch auf Proteinebene von der Aufhebung einer allosterischen Aktivierung durch eine verminderte Bildung von Fruktose-1,6-Bisphosphat und somit einer Aktivitätssteigerung ausgegangen werden.

Die Isoenzyme der Phosphofruktokinase (Phosphofruktokinase 2, *pfkB*), der Fruktosebisphosphat Aldolase (Fruktosebisphosphat Aldolase 2, *b2097*) sowie der Phosphoglycerat Mutase (Phosphoglycerat Mutase 2, *gpmB*) wurden hochreguliert. Dies kann im Falle von PfkB ebenfalls durch die verminderte regulatorische Aktivität des Regulators CsrA erklärt werden. PfkB wird in *csrA<sup>0</sup>*-Mutanten aktiv, PfkA wird hingegen durch CsrA aktiviert. Des Weiteren zeigt das Isoenzym PfkB keine allosterische Regulation (Sabnis et al. 1995).

Nur zwei Komponenten des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes (*aceEF*) wurden differentiell reguliert. *LpdA*, die dritte Untereinheit des Komplexes veränderte sich nicht. Sie wird von zwei weiteren Enzymkomplexen verwendet, der 2-Oxoglutarat Dehydrogenase und dem Glycin-Abbausystem (Perham et al. 1987). Obwohl *aceE* und *aceF* vom gleichen Operon transkribiert werden und identisch reguliert werden sollten, wurden diese beiden Gene im Experiment unterschiedlich reguliert. Eine Erklärung hierfür könnte ein bisher unbekannter Regulationsmechanismus sein. Möglicherweise ändert sich die Stöchiometrie der Zusammensetzung des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes unter Limitierung. *LpdA* selbst wird durch *Fis* aktiviert und durch *FNR* und *cAMP/CRP* inhibiert. Die beobachtete Regulation kann nicht über die bekannte Regulation erklärt werden. Der Regulator *Fis*, der nur in der exponentiellen Phase gebildet wird und in der späten exponentiellen Phase bereits wieder abgebaut wird (Ninnemann et al. 1992), kann nicht aktivierend gewirkt haben. Weiterhin war keine Herunterregulation beobachtet worden. Daher muss eine weitere Regulation von *lpdA* angenommen werden.

### 4.2.3.2 Tricarbonsäure-Zyklus und Glyoxylat-Zyklus

Mit dem Einsetzen der Limitierung wurden C2-Körper, generiert aus Acetat bzw. der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, in den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA) eingeschleust: Zum einen katalysierte die Citrat-Synthase die Reaktion von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat, was mit ihrer Hochregulation einherging. Zum anderen katalysierte die Isocitrat-Lyase die Spaltung von Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat. Succinat wurde durch die Succinat Dehydrogenase zu Fumarat umgesetzt und so wieder in den TCA zur Regeneration von Oxalacetat eingeschleust. Glyoxylat hingegen wurde durch Reaktion mit Acetyl-CoA zu Malat durch die Malat Synthase umgesetzt. Daher waren die Enzyme, die Isocitrat zu Succinat umsetzen, entweder nicht reguliert oder sogar herunterreguliert worden.

Die Expressionsveränderungen des TCA lassen sich durch verschiedene Regulatoren erklären: Hochregulierte Enzyme wurden von IHF und/oder *cAMP/CRP* sowie *Cra* aktiviert. Des Weiteren konnte keine eindeutige regulatorische Aktivität für *ArcA* nachgewiesen werden. *ArcA* ist ein Bestandteil eines Zwei-Komponenten Systems in *E. coli*, welches die Enzyme des TCA hemmt sowie Gene des aeroben Wachstums herunterreguliert (Wick und Egly 2004). Allosterische Regulationen können die Aktivitäten der Citrat-Synthase beeinflussen (Schlegel 1992). Bedingt durch die herabgesetzte Produktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat sowie NADH war keine allosterische Hemmung der Citrat-Synthase möglich.



#### 4.2.3.3 Pentosephosphat-Weg

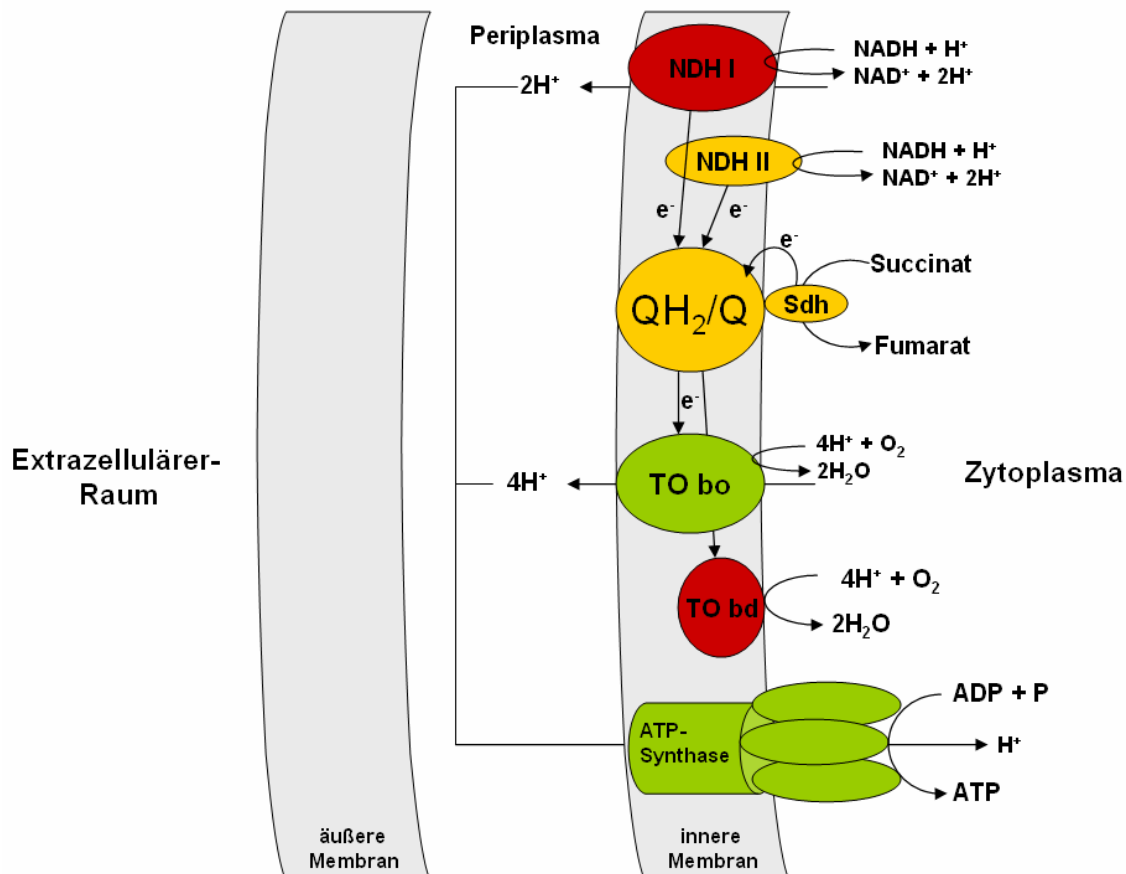
Ein Enzym des oxidativen Zweigs des Pentosephosphat-Wegs (PPP) sowie zwei Enzyme des nicht oxidativen Zweiges des PPP wurden differentiell reguliert.

Die herabgesetzte mRNA-Synthese der 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase (*gnd*) legt eine herabgesetzte NADPH-Bildung nahe. Somit wurde weniger NADPH für Biosynthesen zur Verfügung gestellt. Pease und Wolf konnten zeigen, dass Zellen, die in Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoff-Quelle wachsen, höhere 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu Zellen aufweisen, die Acetat als Kohlenstoff-Quelle zur Verfügung hatten (Pease und Wolf, Jr. 1994). Die Stabilität der mRNA ist in diesem Fall nicht abhängig von der Wachstumsrate genauso wie die mRNA-Halbwertszeiten. Eine Wachstumsraten-abhängige Veränderung der mRNA-Konzentrationen kann also auf eine veränderte Transkription zurückgeführt werden (Pease und Wolf, Jr. 1994). Diese Ergebnisse können mit der vorliegenden Studie bestätigt werden. Insgesamt erscheint eine verminderte NADPH-Bildung bei herabgesetzter Biosynthese sinnvoll, da NADPH bevorzugt für Biosynthesen benötigt wird. Weiterhin stellt der PPP der Zelle Intermediate für den Anabolismus der Aminosäuren, Vitamine, Nukleotide und Zellwandbestandteile zur Verfügung (Sprenger 1995). Die Kohlenhydrat-Limitierung resultierte in einer verminderten Wachstumsrate und führte so zu einem reduzierten Bedarf solcher Vorstufen, wie aus einer Herunterregulation der betroffenen anabolen Stoffwechsel-Enzyme ersichtlich wird.

Aus Ribulose-5-Phosphat wurde bevorzugt Ribose-5-Phosphat gebildet. Dies ist bei einer herabgesetzten Nukleotid-Biosynthese schwer zu erklären. Da die Ribose-5-Phosphat Isomerase (*rpiA*) auch an der umgekehrten Reaktion während des Ribose- und Adenosin-Katabolismus beteiligt ist, erscheint eher die umgekehrte Reaktion denkbar. Die signifikante Hochregulation dieses bekanntermaßen konstitutiv exprimierten Enzyms (Skinner und Cooper 1971) unter Kohlenhydrat-Limitierung ist verwunderlich und lässt weiterhin auf eine Regulation schließen. Das regulierte Isoenzym *rpiB* wurde nicht verändert gefunden, was zu erwarten war, da dieses Enzym nur exprimiert wird, wenn die Zelle auf D-Ribose oder Substraten wächst, die zu Ribose-5-Phosphat umwandelbar sind (Sprenger 1995). Dies war hier nicht der Fall.

## 4.2.3.4 Atmung

Der Elektronentransport sowie die ATP-Regeneration unter Kohlenhydrat-Limitierung erfolgten über verschiedene Komponenten der Atmungskette sowie die ATP-Synthase. Abb. 4.7 gibt einen Überblick über die unter vollständiger Kohlenhydrat-Limitierung (T3) verstärkt oder vermindert verwendeten Komponenten.



**Abb. 4.7:** Unter vollständiger Kohlenhydrat-Limitierung (T3) verwendete Komponenten der Atmungskette in *E. coli*. Über die beiden NADH-Dehydrogenasen (NDH I und NDH II) wurden unter vollständiger Kohlenhydrat-Limitierung Elektronen auf Ubichinon (Q) übertragen. Weiterhin wurden Elektronen über die Succinat Dehydrogenase (Sdh) bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat auf Ubichinon übertragen. Ubichinon wurde dabei zu Ubichinol (QH<sub>2</sub>) reduziert. Die Elektronen wurden vom Ubichinol auf die Terminalen Oxidasen TO bo und TO bd übertragen. Die TO bd wurde verstärkt verwendet. Eine Herunterregulation der Gene der ATP-Synthase lässt auf einen verminderten Transport von Protonen sowie eine verminderte Bildung von ATP durch die ATP-Synthase schließen. Rot: unter Limitierung verstärkt verwendete Komponenten, grün: unter Limitierung vermindert verwendete Komponenten; gelb: Komponenten, die unter Limitierung und in der exponentiellen Phase gleich verwendet wurden

Die Elektronen des NADH wurden über die beiden in *E. coli* vorhandenen NADH Dehydrogenasen (NDH I und NDH II) auf Ubichinon (Q) übertragen. Ubichinon wurde dabei zu Ubichinol (QH<sub>2</sub>) reduziert. 20 min nach Beginn der Glukose-Limitierung erfolgte ein verstärkter Elektronentransport durch die Hochregulation der NDH I. Die NDH I baute weiterhin einen Protonengradienten durch das Pumpen von zwei H<sup>+</sup> pro Elektron auf. Die beobachtete Hochregulation kann durch eine Aktivierung der Transkription durch den Regulator NarL erklärt werden. Weitere Regulatoren wie ArcA, Fis, FNR und IHF scheiden aus, da deren regulatorische Aktivität entweder nicht nachgewiesen werden konnte oder entgegengesetzt der erwarteten Regulation erfolgte. NarL ist Bestandteil eines Zwei-Komponenten Regulationssystems und kontrolliert die Expression von beteiligten Genen der fermentativen und anaeroben Energiegewinnung. In der Tat war die NarL-mRNA als Signal auf dem Microarray deutlich nachweisbar.

NDH II transportierte ebenfalls Elektronen. Es erfolgte keine differentielle Regulation, aber über die Microarray-Analyse konnten Signale für die mRNA nachgewiesen werden. Ferner gilt die NDH II als der vorwiegend exprimierte Enzymkomplex unter aeroben Bedingungen. Sie weist auch höhere Umsatzraten als die NDH I auf (Unden und Bongaerts 1997).

Weiterhin wurde Succinat durch den Succinat-Dehydrogenase Komplex des TCAs verstärkt zu Fumarat oxidiert. Die Elektronen wurden dabei auf FADH<sub>2</sub> und weiterhin direkt auf Ubichinon übertragen.

Vom Ubichinol flossen die Elektronen auf die beiden aeroben terminalen Oxidasen *E. colis*, die Terminale Oxidase bd (*cydAB*) und die Terminale Oxidase bo (*cyoABCD*). Diese verwendeten unter den aeroben Bedingungen Sauerstoff als terminalen Elektronen-Akzeptor. Zunächst wurde der Elektronentransport forciert (etwa 20 min unter Glukose-Limitierung), da die unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen exprimierte terminale Oxidase bd bis etwa 50 min nach der vollständigen Limitierung verstärkt gebildet wurde, dann aber wieder auf das Ausgangsniveau absank. Die Hochregulation der terminalen Oxidase bd kann dem Aktivator Cra zugeschrieben werden, der speziell zu Beginn der Limitierung über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert werden konnte. Die negative Regulation durch ArcA konnte über die Regulator-Analyse ausgeschlossen werden. Die terminale Oxidase bd wurde möglicherweise trotz ausreichender Sauerstoff Verfügbarkeit zusätzlich induziert, um eine optimale Energieversorgung unter den gegebenen Bedingungen zu gewährleisten.

Die Terminale Oxidase bo, die normalerweise unter hohen Sauerstoffkonzentrationen verwendet wird, wurde zunächst normal verwendet. 30 min nach der vollständigen Kohlenhydrat-Limitierung reagierte die Zelle jedoch auf die verminderte Elektronenzufuhr bedingt durch die herabgesetzte Glykolyse und die herunterregulierte Verwendung von Schritten des TCA, die Reduktionsäquivalente zur Verfügung stellen (siehe 4.2.3.1, „Glykolyse“). Die Terminale Oxidase bo wurde nun vermindert gebildet. Da die Terminale

#### 4. Diskussion

---

Oxidase bo Protonen beim Transport der Elektronen zum terminalen Elektronen-Akzeptor pumpt ( $2 \text{ H}^+/\text{e}^-$ ), muss von einem verminderten Aufbau des Protonengradienten über die Membran ausgegangen werden.

Der über die Atmungskette aufgebaute Protonengradient wurde vermindert durch die ATP-Synthase abgebaut, denn es zeigte sich eine verminderte Transkription von über 60% der Komponenten der ATP-Synthase. Die Regulation der ATP-Synthase ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Kasimoglu und Kollegen beobachteten eine inverse Korrelation mit der Wachstumsrate (Kasimoglu et al. 1996). Diese Beobachtung beruht auf *atpI-lacZ*-Fusionsexperimenten, bei denen die ersten 13 Codons des *lacI*-Gens mit *lacZ* fusioniert wurden und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen wurde. *atpI* kodiert für ein Protein mit noch unbekannter Funktion und ist vor den übrigen acht Genen für die ATP-Synthase (*atpBEFHAGDC*) auf dem Chromosom lokalisiert. Die neun Gene sollen von einem einzigen Promotor abgeschrieben werden. Ferner wurde gezeigt, dass Veränderungen des pH-Wertes im Medium keinen Einfluss auf die Transkription der ATP-Synthase bzw. des Gens *atpI* haben. Die Transkription der *AtpI*-mRNA wurde nicht durch Regulatoren wie FNR, ArcA, Fis oder IHF reguliert (Kasimoglu et al. 1996).

Die in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen sprechen hingegen für eine Wachstumsraten-abhängige Regulation der ATP-Synthase Gene, mit abnehmender Expression bei sinkender Wachstumsrate. Eine Herunterregulation der ATP-Synthase erscheint sinnvoll, denn ATP wird unter den untersuchten Bedingungen bevorzugt in den Erhaltungsstoffwechsel eingeschleust, auf Kosten der Biosyntheseleistung (Keller 2005). Diese Hypothese wird durch die detektierte Herunterregulation des Bewegungsapparates sowie anaboler Stoffwechselwege unterstützt. Trotz einer herabgesetzten Biosynthese der Nukleotide konnte ein Anstieg der ATP-Konzentration über die Nukleotid-Messungen festgestellt werden (Keller 2005). Dieser könnte durchaus aus einem deutlich verminderten Biosyntheseverbrauch von ATP resultieren, trotz einer verminderten ATP-Synthase-mRNA Konzentration und damit einhergehender Reduktion an ATP-Synthase Enzymkomplexen. Die vorliegenden Ergebnisse unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Kasimoglu und Kollegen lassen also auf die Transkription von zumindest einem weiteren Promotor schließen. Da lediglich 60% der ATP-Synthase reguliert wurde, kann auch auf mehrere Promotoren geschlossen werden. Diese Beobachtung bestätigt auch Ergebnisse anderer Labore (McCarthy 1988).

Neben der ATP-Synthase kann der Protonengradient über der Membran auch für den Antrieb der Geißeln oder für Transportprozesse verwendet werden. Unter Glukose-limitierten Bedingungen wurden Komponenten des Bewegungsapparates vermindert gebildet - die Zelle verwendete den Protonengradienten also nicht für Bewegungsprozesse. Demgegenüber wurden Gene zahlreicher Symporter verstärkt transkribiert. Die Zelle wies

unter limitierenden Bedingungen somit ein großes Potential für mögliche Transportprozesse auf.

Einen interessanten Aspekt stellt die positive Regulation des Proteins FrsA (*yafA*, Fermentation/Atmung Umschaltprotein) zu einem späten Zeitpunkt unter Glukose-Limitierung (T6) dar. FrsA interagiert mit dephosphoryliertem EIIA<sup>Glc</sup> (*crr*, Zucker wird transportiert) des Zucker-Phosphotransferase Systems und scheint am Umschalten zwischen aerober Atmung und Fermentation beteiligt zu sein (Koo et al. 2004). Eine Regulation über die Transkription ist bisher nicht bekannt. Eine mögliche Interpretation wäre, dass durch die herabgesetzte Expression der ATP-Synthase sowie der terminalen Oxidase bei einer Anaerobiosis vergleichbarer Zustand wahrgenommen wird, auf den mit der Hochregulation des Proteins FrsA sowie der Herunterregulation der Enzyme Isocitrat Dehydrogenase und 2-Oxoglutarat Dehydrogenase des TCA reagiert wird. Dass die Zelle real keinen anaeroben Bedingungen ausgesetzt war, wurde allerdings zeitnah realisiert. Die Expression wurde wieder auf das Ursprungsniveau zurückgeführt. Die detektierte Hochregulation von Nitrat-Reduktasen zur weiteren Endoxidation ging ebenfalls mit der positiven Regulation des Proteins FrsA einher. Reduktasen sowohl für hohe als auch für geringe Nitrat-Konzentrationen wurden differentiell transkribiert. Da *E. coli* von seiner Physiologie her nicht in der Lage ist, das im Medium vorhandene Ammonium zu Nitrat zu oxidieren (Schlegel 1992), und Nitrat ferner auch kein Mediumbestandteil war, müssen weitere Regulationen an der Expression der Nitrat-Reduktasen beteiligt gewesen sein. Nitrat kann somit als auslösender Faktor einer Induktion ausgeschlossen werden. Der Regulator FNR, über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert, könnte die oben genannten TCA-Enzymkomplexe negativ sowie die Nitrat-Reduktasen positiv reguliert haben.

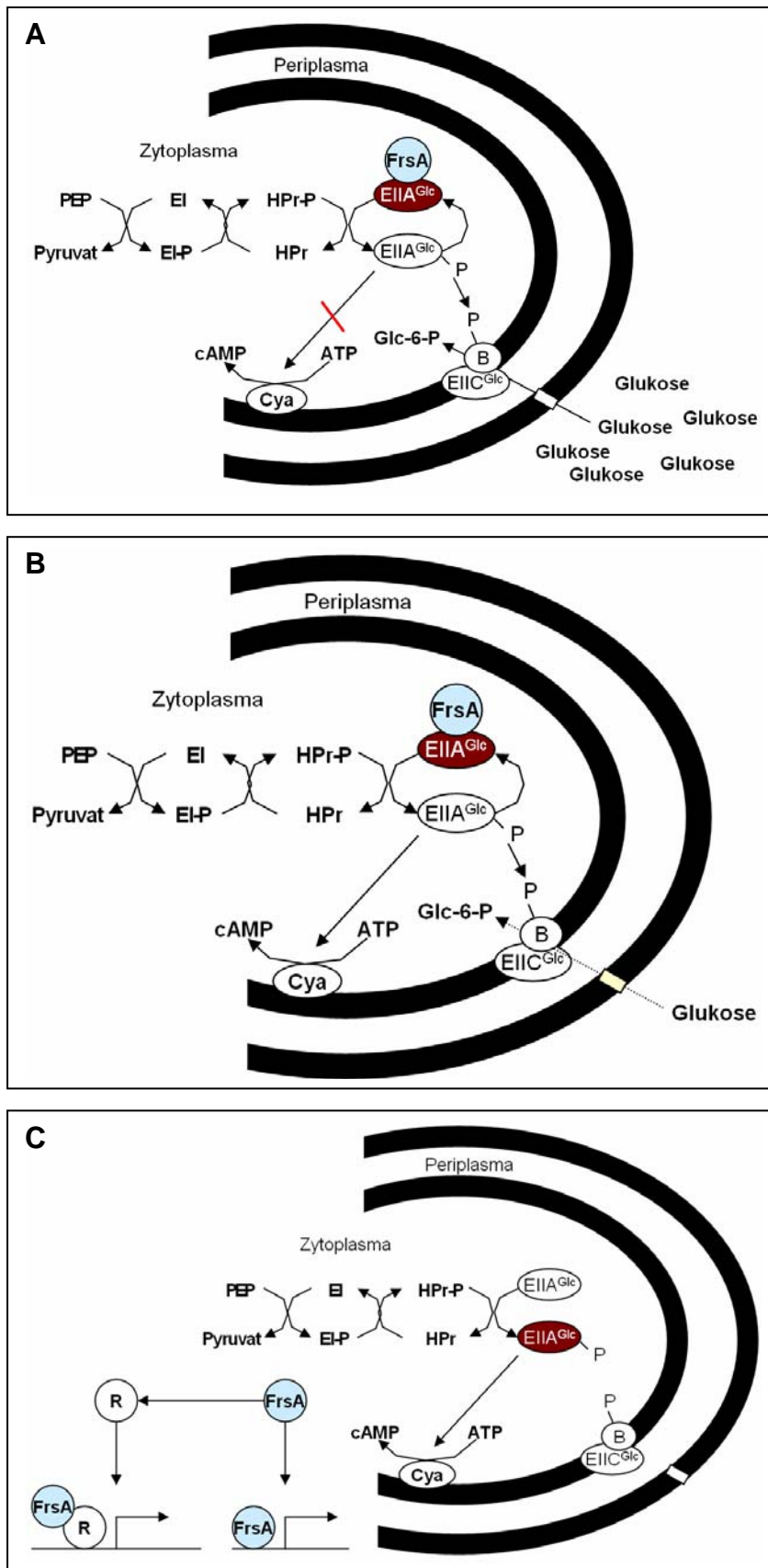
FNR ist ein dualer, DNA-bindender Transkriptionsregulator, welcher die Transkription vieler, an der anaeroben Säurefermentation und der anaeroben Atmung mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor beteiligter Gene, stimuliert. Zusätzlich unterdrückt er die Transkription einiger Gene, die nur während des aeroben Wachstums nötig sind. Dieses System wurde bisher nur für die Aktivierung unter einer anaeroben Energiegewinnung beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch auch auf eine Aktivierung unter aeroben Bedingungen schließen.

Einen weiteren Hinweis hierauf gibt auch die Regulation des Enzyms YfiA. Dieses Enzym hemmt die Translation in der stationären Phase und stabilisiert die Ribosomen. Durch FNR wird diese Enzym unter anaeroben Bedingungen herunterreguliert (Salmon et al. 2003). Hier konnte ebenfalls zum Zeitpunkt 6 eine herabgesetzte Expression im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt beobachtet werden, was auf eine Regulation durch FNR unter aeroben Bedingungen schließen lässt.

Die Repression von TCA-Enzymen unter aeroben Bedingungen, einhergehend mit einer Kohlenhydrat-Limitierung, ist bereits beschrieben worden (Nystrom 1994).

FNR wird durch Sauerstoff inaktiviert (Unden et al. 2002). Da FNR nicht auf Transkriptionsebene reguliert wird, wird vermutet, dass verschiedene reduzierende Agenzien (Glutathion,  $\text{Fe}^{2+}$ , Cystein u.a.) FNR unter anaeroben Bedingungen aktivieren können. Unter aeroben Bedingungen müßte also eine Reduktionsquelle zur Verfügung gestanden haben. Glutathion scheidet aus, da dessen Biosynthese herunterreguliert wurde. Welche Komponente reduzierend gewirkt hat, kann hier nicht gesagt werden. Alternativ könnte neben FNR ein weiterer, bisher nicht entdeckter Regulator existieren, der unter aeroben Bedingungen die genannten Gene in aufgezeigter Weise reguliert. Möglicherweise spielt hier das Fermentation/Atmung Umschaltprotein FrsA als Signalprotein eine entscheidende Rolle, da es bereits gebildet ist und an  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  gebunden vorliegt. Es kann also schnell mobilisiert werden und könnte entweder mit Regulatoren wechselwirken oder selbst regulatorisch tätig sein.

Koo *et al.* schlugen FrsA als molekularen Regulator des Umschaltens zwischen aerober Atmung und anaerober Säurefermentation vor (Koo et al. 2004). Die vorliegende Studie legt sogar eine Regulation auf Ebene der Transkription nahe. Weiterhin wurde hier nicht nur ein Umschalten zwischen aerober Atmung und Fermentation, sondern auch zwischen aerober und anaerober Nitrat-Atmung beobachtet, obwohl keine anaeroben Realbedingungen vorlagen. Denkbar ist, dass die Glukose-Konzentration zum Zeitpunkt T6 schon so weit gesunken war, dass  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  überwiegend phosphoryliert vorlag. FrsA wurde freigesetzt und bewirkte die vorübergehende Umstellung. Abb. 4.8 verdeutlicht die Bedingungen in der exponentiellen Phase (A), unter Glukose-Limitierung (B) sowie zum Zeitpunkt T6 (C). Was die darauffolgende Repression des FrsA bedingte, kann aus den hier vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden.



**Abb. 4.8: Interaktion des Fermentation/Atmung Umschaltproteins FrsA (*yafA*) mit EIIA<sup>Glc</sup>.** **A:** Ausreichend Glukose ist im Medium vorhanden. Glukose wird über das PTS-System aufgenommen, EIIA<sup>Glc</sup> liegt überwiegend dephosphoryliert vor. **B:** Es ist nur wenig Glukose im Medium vorhanden (millimolare bis mikromolare Konzentrationen). Phosphoryliertes EIIA<sup>Glc</sup> interagiert mit der Adenylat-

## 4. Diskussion

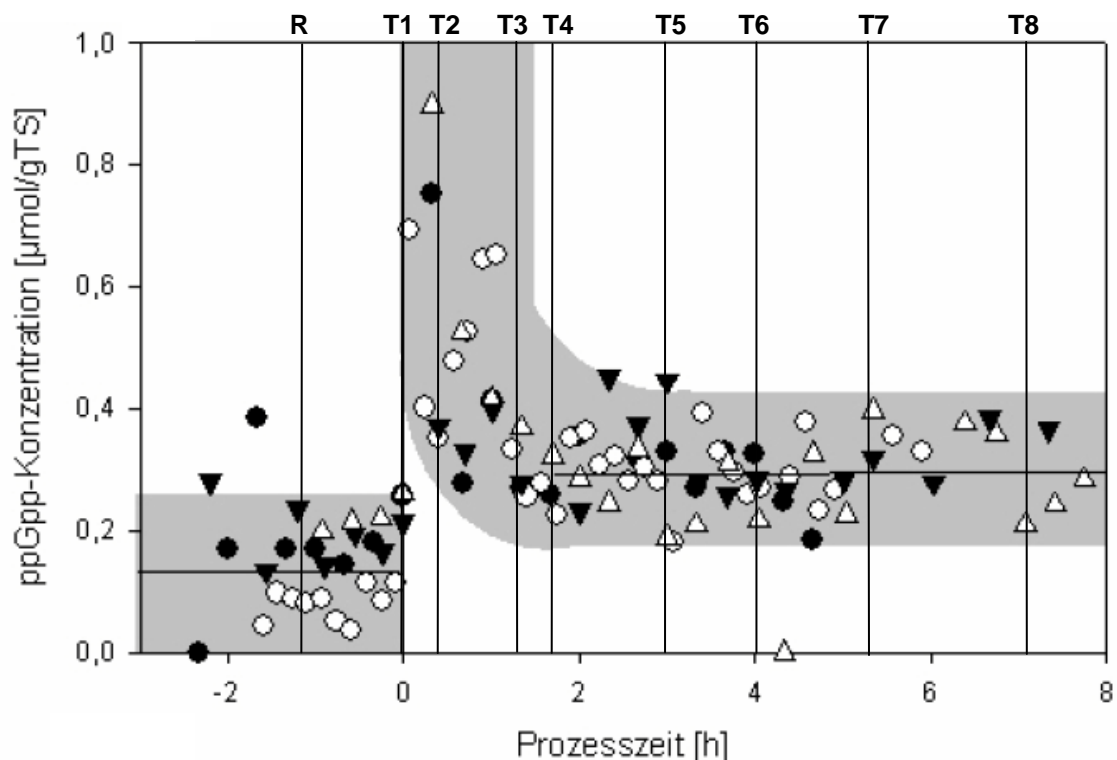
Zyklase (Cya) und aktiviert sie. **C:** Nahezu keine Glukose ist mehr vorhanden (submikromolare Konzentrationen). EIIA<sup>Glc</sup> liegt vorwiegend phosphoryliert vor. FrsA wird freigesetzt und kann entweder direkt oder indirekt die Expression verschiedener Gene bewirken. Andere Glukose-Aufnahmesysteme sind nicht dargestellt (siehe hierfür auch Abb. 4.1).

### 4.2.4 Die Stringente Kontrolle

Mittels der gekoppelten Batch/Fed-Batch-Fermentationsstrategie durch den Stimulus einer gesteuerten Glukose-Limitierung wurde die Stringente Kontrolle in *E. coli* ausgelöst. Folgende Punkte bestätigen die erfolgreiche Induktion der Stringenten Kontrolle:

1. ppGpp wurde unter Kohlenhydrat-Limitierung vermehrt gebildet

Während der Fermentation konnte eine ppGpp-Bildung mit dem Einsetzen der Glukoselimitierung (vergleichbar mit T1 in der vorliegenden Studie) nachgewiesen werden (Abb. 4.9, (Keller 2005)). Zu beobachten war ein rapider Anstieg der ppGpp Bildung mit dem Einsetzen der Glukose-Limitierung, sowie ein Abfallen auf das Zweifache des Ausgangsniveaus innerhalb von zwei Stunden. Die ppGpp-Konzentrationen blieben über den restlichen betrachteten Zeitraum konstant erhöht (Keller 2005).



**Abb. 4.9: Über HPLC gemessener Verlauf der ppGpp-Konzentration im Verlauf der Fermentationen.** Dargestellt sind die Ergebnisse von vier Fermentationen (die Kreis- und Dreieck-Symbole entsprechen den einzelnen Fermentationen), die alle vergleichbar waren. Über die Microarray-Analyse untersuchte Zeitpunkte T1-T8 sind durch senkrechte Striche markiert. R: Referenz, Quelle:(Keller 2005)



Über die Microarray-Analyse konnte keine differentielle Expression der ppGpp-synthetisierenden Enzyme RelA und SpoT nachgewiesen werden. Dies erscheint sinnvoll, betrachtet man Reaktionsgeschwindigkeiten in physiologischen Systemen. Rasche Änderungen der ppGpp-Konzentrationen bei abnehmender Wachstumsrate sind wahrscheinlich nicht über eine *de novo* Transkription und anschließende Translation nach Detektion des Stimulus „Limitierung“ realisierbar. *E. coli* bildet in Minimalmedium bereits während der exponentiellen Phase geringe Mengen ppGpps. Die mRNAs der ppGpp synthetisierenden Enzyme bzw. die Enzyme selbst sind also bereits vorhanden und müssen durch den entsprechenden Stimulus in der Aktivität modifiziert bzw. verstärkt werden.

Für die RelA-abhängige ppGpp Synthese ist bekannt, dass die ppGpp-Synthase Aktivität des RelA-Proteins durch die Bindung ungeladener aminoacylierter tRNAs an das Ribosom aktiviert wird (Cashel et al. 1996). Die in der durchgeführten Studie beobachtete herabgesetzte Transkription einiger Aminosäurebiosynthese Enzyme bekräftigt diese Theorie. Durch die Kohlenhydrat-Limitierung kam es so möglicherweise zu einem Aminosäure-Mangel. Weniger beladene tRNAs standen für die Proteinbiosynthese zur Verfügung und dies führte möglicherweise zu einer RelA-bedingten ppGpp-Synthese.

Andererseits ist auch eine ppGpp Synthese durch SpoT denkbar: Unveröffentlichte Daten von Zhang und Kollegen (zitiert in (Dennis et al. 2004)) legen die Theorie nahe, dass eine verminderte Proteinbiosyntheserate die Spezifität von SpoT beeinflusst. Das Enzym liegt möglicherweise in zwei verschiedenen Konformationen vor und bildet abhängig von der Translationsgeschwindigkeit die ppGpp-Pyrophosphohydrolase- oder die ppGpp-Synthase-Aktivität aus. Im vorliegenden Experiment könnte eine verlangsamte Translation der bereits in der exponentiellen Phase gebildeten mRNA während der Kohlenhydrat-Limitierung also zur Ausbildung der ppGpp-Synthase-Aktivität und damit zur ppGpp-Bildung geführt haben.

Aufgrund der gemachten Beobachtungen kann eine mRNA-Neusynthese der ppGpp-synthetisierenden Enzyme ausgeschlossen werden, die ppGpp-Produktion selbst kann jedoch keinem der beiden Enzyme eindeutig zugeordnet werden. Identische Experimente mit *relA* oder *relA/spoT* Null-Mutanten könnten hierüber Aufschluss geben. Ein Vergleich der dabei gebildeten ppGpp-Konzentrationen mit den im vorliegenden Experiment bestimmten Konzentrationen kann Hinweise auf eine Bildung des ppGpp durch RelA oder SpoT geben.

## 2. Die verminderte rRNA-Synthese konnte indirekt nachgewiesen werden

Das Hauptcharakteristikum der Stringenten Kontrolle stellt die herabgesetzte Transkription stabiler RNA (tRNA sowie rRNA) dar (Cashel et al. 1996). Der Konzentrationsverlauf dieser RNAs konnte über die Microarray-Analyse nicht verfolgt werden, da das verwendete kommerzielle Microarray-Oligonukleotidset keine geeigneten Sonden hierfür beinhaltete. Daher kann nur über indirekte Effekte auf eine herabgesetzte rRNA-Synthese geschlossen werden. Bereits nach 20 min unter Glukose-Limitierung lagen für die Proteinbiosynthese

#### 4. Diskussion

---

verwendete Proteine und Enzyme mit wenigen Ausnahmen herunterreguliert vor. Eine Herunterregulation der ribosomalen Proteine spiegelt eine verminderte rRNA-Synthese wider. Ribosomale Proteine binden nach ihrer Synthese an die ribosomale RNA. Ist nicht ausreichend rRNA vorhanden, so kommt es zu einer Hemmung der Translation ribosomaler Proteine und einer damit einhergehenden Destabilisierung der mRNA. Diese wird rasch degradiert (Dennis et al. 2004). Ribosomale RNA selbst ist wachstumsphasenabhängig reguliert und wird mit herabgesetzter Wachstumsrate vermindert gebildet. Die Wachstumsrate der untersuchten Fermentationen sank kontinuierlich und bereits vor Limitierung durch die Acetathemmung.

Als Ursachen der rRNA-Herunterregulation werden verschiedene Faktoren diskutiert (Dennis et al. 2004):

Zum einen erfolgt die Herunterregulation über die Stringente Kontrolle durch die Bildung von ppGpp. Dieses interagiert mit der RNA-Polymerase und setzt die Halbwertszeit der offenen Promotorkomplexe an der rDNA herab. Die Bindungskinetik der RNA-Polymerase ist nicht ausreichend schnell und es kommt zu einer Herunterregulation.

Zum anderen führt ein Rückgang der initialisierenden NTP-Konzentrationen während der stationären Phase laut Literaturangaben ebenfalls zu einer herabgesetzten Transkription der rRNA (Paul et al. 2004b). Alle sieben rRNA Operone werden von zwei Promotoren, *rrn* P1 und *rrn* P2, beschrieben, wobei der Hauptanteil von *rrn* P1 beschrieben wird. *Rrn* P1 benötigt ATP zur Initialisierung, *rrn* P2 benötigt CTP. Die initialisierenden NTPs verursachen eine Konformationsänderung in der RNA-Polymerase und erhöhen die Halbwertszeit an den offenen Komplexen. Es wird diskutiert, dass verminderte ATP-Konzentrationen somit ebenfalls zur Destabilisierung des RNA-Polymerase/DNA Komplexes führen und die rRNA Transkription von *rrn* P1 negativ beeinflussen. Bezüglich der ATP-Konzentrationen während der exponentiellen sowie der stationären Phase gibt es jedoch Arbeiten, in denen ein Absinken der ATP-Konzentration während der stationären Phase nicht beobachtet wurde. Vielmehr blieb die ATP-Konzentration hier konstant über die Zeit bzw. zeigte einen Anstieg mit dem Eintritt in die Limitierung (Meyer et al. 1999).

Die Nukleotidmessungen der in dieser Studie untersuchten Fermentationen weisen ebenfalls einen sprunghaften Anstieg der ATP-Konzentrationen mit dem Einsetzen der Limitierung auf (Keller 2005). Dennis und Kollegen schlagen vor, dass die Transkription von *rrn* P1 ausschließlich durch veränderte ppGpp-Konzentrationen vermittelt wird (Dennis et al. 2004). Dadurch würden erniedrigte ATP-Konzentrationen nicht zwangsläufig für eine rRNA-Repression benötigt. Flussanalysen der hier bearbeiteten Fermentationen zeigen, dass die Zelle den Kohlenstoff-Fluss verstärkt in die Energiegenerierung durch den Zitronensäurezyklus lenkt. Dies erklärt den beobachteten Anstieg der ATP-Konzentrationen (Keller 2005). Die Beobachtungen der Flussanalyse decken sich zum Teil mit den

Microarray-Analysen: Die mRNA-Konzentrationen der TCA-Enzyme, die gemeinsam mit dem Glyoxylat-Zyklus verwendet werden, waren unter Limitierung signifikant erhöht.

In dem den Flussanalysen zugrunde liegenden Modell (Software: INSILICO Discovery von Insilico Biotechnology) war der Glyoxylat-Zyklus nicht implementiert. Über die übrigen Aspekte, welche die ATP-Konzentrationen beeinflussen und über eine Microarray-Analyse detektiert werden konnten, lassen sich keine eindeutigen Aussagen über eine Zu- oder Abnahme der ATP-Konzentrationen ableiten. So waren Enzyme der *de novo* Nukleotid-Biosynthese sowie des Salvage Pathways unter Limitierung herunterreguliert. Zu erwarten wäre deshalb eine herabgesetzte Nukleotid-Konzentration im Vergleich zur Referenz gewesen. Nukleasen hingegen, die durch die Spaltung von Nukleinsäuren ebenfalls Einfluss nehmen auf Nukleotid-Konzentrationen, wurden sowohl hoch- als auch herunterreguliert gefunden. Weiterhin waren mRNA-Konzentrationen der ATP-Synthase herunterreguliert, so dass von einer verminderten ATP-Synthese durch die ATP-Synthase ausgegangen werden muss. Welche Rolle die ATP-Konzentration an der herabgesetzten rRNA-Synthese gespielt hat, lässt sich durch die Microarray-Analyse also nicht abschließend beantworten.

Bei der rRNA-Transkription spielen darüber hinaus die Transkriptionsregulatoren Fis und H-NS eine Rolle: Fis ist ein, bis in die exponentielle Phase hinein exprimierter, positiver Regulator der rRNA-Synthese. In der späten exponentiellen Phase sinkt die Fis Konzentration ab. In der Übergangsphase sowie der stationären Phase kann der Regulator nicht mehr nachgewiesen werden. H-NS hingegen wird mit dem Übergang zur stationären Phase vermehrt gebildet und reguliert die rRNA-Transkription negativ. Über die Regulator-Analyse konnte nur H-NS als „aktiv“ identifiziert werden. Man kann also schlussfolgern, dass die rRNA-Konzentration durch H-NS negativ beeinflusst wurde. Da Fis nicht als „aktiv“ identifiziert werden konnte, kann hiermit auch der positive Effekt auf die rRNA Transkription ausgeschlossen werden.

### 3. Ein Enzym, das ppGpp für seine Synthese benötigt, wurde hochreguliert

Rmf, der „Ribosome modulation factor“ benötigt ppGpp für seine Transkription (Izutsu et al. 2001a). Die determinierten, erhöhten mRNA-Konzentrationen über den gesamten betrachteten Zeitverlauf gehen mit der erhöhten ppGpp-Konzentration unter Limitierung einher.

### 4. Weitere Effekte, die der stringenten Transkription zugeschrieben werden, konnten beobachtet werden

Hemmende Effekte des ppGpp auf die Bildung von Elongationsfaktoren, Zellwandkomponenten, Fettsäuren und Lipiden sowie die DNA-Replikation werden beschrieben (Magnusson et al. 2005). Diese Effekte sind auch unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen beobachtet worden.

#### 4. Diskussion

---

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wurden Beobachtungen gemacht, die nicht mit dem herkömmlichen Verständnis der Stringenten Kontrolle übereinstimmen:

1.  $\sigma^S$  soll unter Anwesenheit von ppGpp verstärkt gebildet werden

Der Sigma-Faktor  $\sigma^S$  (*rpoS*) stellt einen wichtigen Vermittler der „Starvation“ und der damit einhergehenden Stressresistenz dar.  $\sigma^S$  kontrolliert mehr als 70 Gene und ermöglicht der Zelle eine höhere Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren (Hengge-Aronis 2002). Unter Glukose-Limitierung soll dieser Sigma-Faktor vermehrt gebildet werden (Mandel und Silhavy 2005). Die Bildung ist von ppGpp abhängig, denn ppGpp Null-Mutanten weisen keine erhöhten  $\sigma^S$ -Proteinkonzentrationen auf (Gentry et al. 1993). Andererseits wurden erhöhte *rpoS* mRNA-Konzentrationen in ppGpp Nullmutanten nachgewiesen (Zgurskaya et al. 1997).  $\sigma^S$  wird nicht auf der Ebene der Transkription sondern auf der Ebene der Translation und Proteolyse kontrolliert (Lange und Hengge-Aronis 1994; Zgurskaya et al. 1997). Die Stabilität des Proteins nimmt mit dem Eintreten in die stationäre Phase zu.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen nicht auf eine eindeutige regulatorische Aktivität dieses Sigma-Faktors unter Glukose-Limitierung hin. Der Sigma-Faktor wurde über die Sigma-Faktor Analyse zwar als „aktiv“ identifiziert. Zu Beginn der Limitierung wurden jedoch einige Gene, die theoretisch durch  $\sigma^S$  beschrieben werden, herunterreguliert.

Diauxie-Experimente zeigten, dass die  $\sigma^S$ -Translation während der späten exponentiellen Phase stimuliert wird. Mit Einsetzen der Limitierung übernimmt jedoch das cAMP/CRP-Regulator-System die Stressantwort und hat einen inhibitorischen Effekt auf die Translation  $\sigma^S$ -abhängiger Promotoren (Fischer et al. 1998). Übertragen auf die hier erhaltenen Ergebnisse kann man annehmen, dass die  $\sigma^S$ -Antwort bereits vor und auch während des ersten Zeitpunktes aktiv war, dann durch die cAMP/CRP Antwort herabgesetzt wurde und erst spät wieder angeschaltet wurde. Dies erklärt eine Herunterregulation  $\sigma^S$ -abhängiger Gene. Diese wurden also frühestens ab T4, möglicherweise aber auch erst zum Zeitpunkt T6 verstärkt beschrieben.  $\sigma^S$  war auch nicht in vollem Maße aktiv, denn über die vorliegende experimentelle Vorgehensweise konnten nur wenige Gene der  $\sigma^S$ -Stressantwort als „differentiell exprimiert“ identifiziert werden. Viele Gene, die unter Kohlenhydrat-Limitierung positiv durch  $\sigma^S$  reguliert werden wie z.B. *osmY* oder auch *rssB*, eine Komponente, die an der  $\sigma^S$ -Proteolyse beteiligt ist, wurden nicht als „differentiell exprimiert“ identifiziert. Möglicherweise war die Glukose-Konzentration unter den gegebenen experimentellen Bedingungen immer noch zu hoch, um eine tatsächliche „Starvation“ auszulösen. Experimente im Labor von Ferenci deuten darauf hin, dass die Transkription  $\sigma^S$ -abhängiger Gene erst bei Glukose-Konzentrationen unter  $10^{-7}$  M stattfindet (Ferenci 1999b). Auch war über den gesamten betrachteten Zeitraum ein Zellwachstum zu verzeichnen, die „Starvation“ zeichnet sich aber durch einen Wachstumsstopp aus.

$\sigma^S$  wird in der exponentiellen Phase durch den RssB-abhängigen Proteasekomplex ClpXP degradiert (Schweder et al. 1996; Zhou et al. 2001). Die Proteasekomponente ClpX war zum Zeitpunkt T6 differentiell herunterreguliert. Dies könnte mit einer verminderten Proteolyse des Sigma-Faktors einhergegangen sein. Dafür spricht auch die vermutete maximale regulatorische Aktivität des Sigma-Faktors zum Zeitpunkt T6.

Insgesamt sprechen die hier angeführten Beobachtungen gegen eine entscheidende Beteiligung des Sigma-Faktors  $\sigma^S$  an der Kontrolle der physiologischen Antwort von *E. coli* auf eine Kohlenhydrat-Limitierung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen.

Die  $\sigma^S$ -Aktivität wird komplex und durch zahlreiche Regulatoren moduliert (Loewen et al. 1998). Viele der Regulatoren (H-NS, IHF, CRP, ppGpp) wurden über die Regulator-Analyse bzw. Nukleotidmessungen identifiziert. Trotzdem zeigten die regulierten Gene überwiegend eine Regulation in entgegengesetzter Richtung. Die  $\sigma^S$ -Translation selbst wird durch HNS negativ reguliert (Barth et al. 1995; Yamashino et al. 1995). Über die Regulator-Analyse wurde dieser Regulator von T2 bis T4 als „aktiv“ identifiziert, über die Microarray-Analyse zum Zeitpunkt T3 und T6 als „hochreguliert“ identifiziert. Die Aktivität des Regulators deckt sich mit der vermuteten Inaktivität des Sigma-Faktors.

## 2. Enzyme der Aminosäure Biosynthese und Proteasen sollen im Zuge der Stringenten Kontrolle verstärkt exprimiert werden

Stringent regulierte *E. coli* Zellen sollen eine erhöhte Aminosäure Biosynthese aufweisen. Des Weiteren fördert die verstärkte Proteolyse von Proteinen die Freisetzung von Aminosäuren (Cashel et al. 1996).

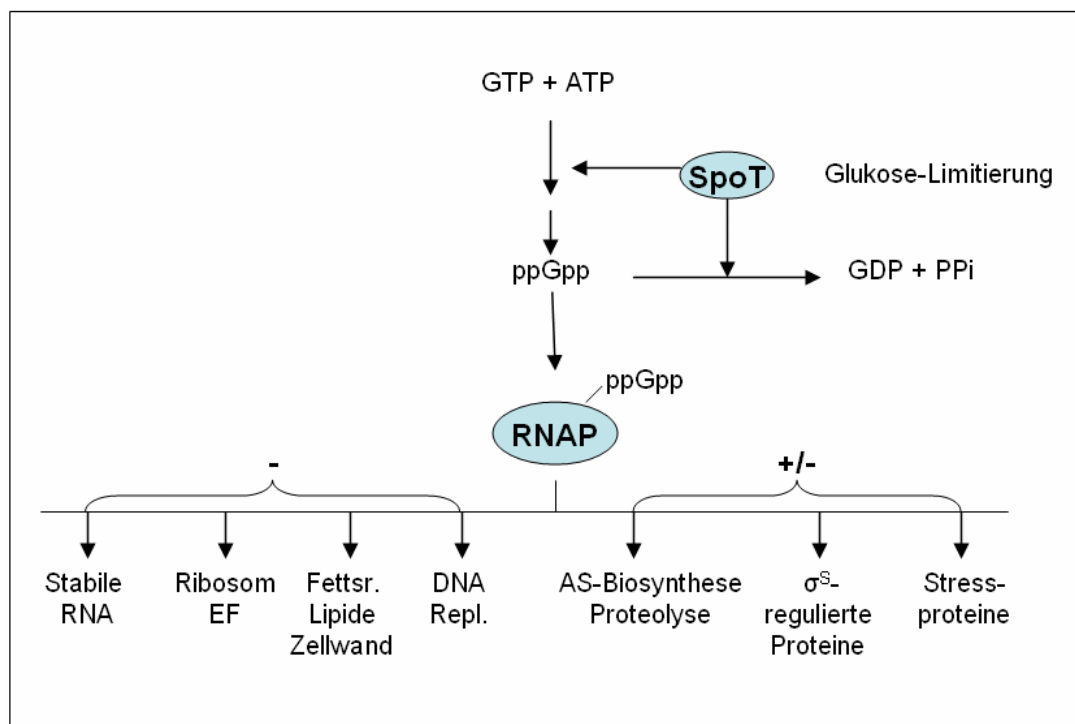
Die Daten der vorliegenden Transkriptanalyse weisen jedoch auf eine herabgesetzte Aminosäure Biosynthese und auch auf eine erniedrigte Proteolyse hin. Sowohl die mRNA-Konzentrationen für die Enzyme der Aminosäure Biosynthese als auch für die Proteasen waren im Vergleich zur Referenz erniedrigt. Die ppGpp-Synthese durch RelA wird durch Aminosäure-Mangel ausgelöst. Eine verringerte Aminosäure-Biosynthese im Verlauf der Fermentation könnte zu einer Aminosäure-Limitierung führen und die Aktivierung des RelA Proteins fördern. Bedenkt man das Absinken der Wachstumsrate und den insgesamt herabgesetzten Anabolismus, so ist auch ein verminderter Bedarf an Aminosäuren zu vermuten. Aminosäure Konzentrationsmessungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, daher kann über die tatsächliche Aminosäureverfügbarkeit nur spekuliert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Bild der Stringenten Kontrolle bezüglich der Aminosäure Biosynthese sowie der  $\sigma^S$ -Antwort angepasst werden sollte: Wie oben dargestellt, konnten verschiedene physiologische Anpassungen, die unter Kohlenhydrat-Limitierung einer veränderten Transkription durch die Interaktion von ppGpp mit der RNA-Polymerase zugeschrieben werden, über das vorliegende Experiment beobachtet und

## 4. Diskussion

bestätigt werden. So wurden Gene des Ribosoms und dem zufolge der stabilen RNAs vermindert transkribiert. Auch wurde mRNA der Gene von Enzymen, die an der Replikation beteiligt sind, sowie mRNA der Gene, die für Biosynthese-Enzyme von Fettsäuren sowie Zellwandkomponenten kodieren, vermindert gebildet.

Einige physiologischen Anpassungen hingegen konnten nicht beobachtet werden: Unter Kohlenhydrat-Limitierung konnte vorwiegend eine herabgesetzte Synthese der mRNA für Enzyme der Aminosäurebiosynthese nachgewiesen werden. Ob dies tatsächlich eine herabgesetzte Aminosäurekonzentration widerspiegelt, lässt sich nur vermuten. Aminosäure-Konzentrationsmessungen könnten solche Hypothesen verifizieren. Weiterhin war die Stringente Kontrolle nicht an eine Regulation der Physiologie durch  $\sigma^S$  (*rpoS*) gekoppelt. Wie die vorliegenden Ergebnisse vermuten lassen, spielte die  $\sigma^S$ -vermittelte Stressantwort lediglich eine untergeordnete Rolle. Sichere Aussagen jedoch ließen sich beispielsweise mit *rpoS* Deletionsmutanten machen. Diese sollten dann eine ähnliche physiologische Antwort wie der Wildtyp aufweisen. Eine graphische Zusammenfassung ist in Abb. 4.10 wiedergegeben.



**Abb. 4.10: Modell der Stringenten Kontrolle unter Kohlenhydrat-Limitierung.** Durch SpoT wird ppGpp gebildet. Dieses interagiert mit der RNA-Polymerase und bewirkt vorwiegend eine herabgesetzte Transkription (-) von Genen, die für das Ribosom, Elongationsfaktoren (EF) und Fettsäure- (Fettsr.), Lipid- und Zellwandkomponenten-Biosyntheseenzyme kodieren.  $\sigma^S$ -regulierte Gene, Gene von Stress-Proteinen sowie Aminosäure (AS)-Biosynthese-Enzyme und Proteasen wurden zum Teil verstärkt (+), zum Teil vermindert (-) transkribiert.

## 5 Literaturverzeichnis

### References

1. Alföldi, L., Stent, G.S., Clowes, R.C., 1962. The chromosomal site of the RNA control (RC) locus in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 5, 348-55.
2. Ansaldi, M., Bordi, C., Lepelletier, M., Mejean, V., 1999. TorC apocytochrome negatively autoregulates the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33, 284-295.
3. Arfin, S.M., Long, A.D., Ito, E.T., Toller, L., Riehle, M.M., Paegle, E.S., Hatfield, G.W., 2000. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem* 275, 29672-84.
4. Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., Vassilyev, D.G., 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* 117, 299-310.
5. Atlung, T., Ingmer, H., 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* 24, 7-17.
6. Ausubel, F.M., 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. J Wiley.
7. Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., Rouviere-Yaniv, J., 2001. The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol. Microbiol.* 39, 1069-1079.
8. Bammler, T., Beyer, R.P., Bhattacharya, S., Boorman, G.A., Boyles, A., Bradford, B.U., Bumgarner, R.E., Bushel, P.R., Chaturvedi, K., Choi, D., Cunningham, M.L., Deng, S., Dressman, H.K., Fannin, R.D., Farin, F.M., Freedman, J.H., Fry, R.C., Harper, A., Humble, M.C., Hurban, P., Kavanagh, T.J., Kaufmann, W.K., Kerr, K.F., Jing, L., Lapidus, J.A., Lasarev, M.R., Li, J., Li, Y.J., Lobenhofer, E.K., Lu, X., Malek, R.L., Milton, S., Nagalla, S.R., O'Malley, J.P., Palmer, V.S., Pattee, P., Paules, R.S., Perou, C.M., Phillips, K., Qin, L.X., Qiu, Y., Quigley, S.D., Rodland, M., Rusyn, I., Samson, L.D., Schwartz, D.A., Shi, Y., Shin, J.L., Sieber, S.O., Slifer, S., Speer, M.C., Spencer, P.S., Sproles, D.I., Swenberg, J.A., Suk, W.A., Sullivan, R.C., Tian, R., Tennant, R.W., Todd, S.A., Tucker, C.J., Van Houten, B., Weis, B.K., Xuan, S., Zarbl, H., 2005. Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods* 2, 351-6.
9. Barth, M., Marschall, C., Muffler, A., Fischer, D., Hengge-Aronis, R., 1995. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 3455-3464.
10. Berg, O.G., von Hippel, P.H., 1988. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol* 200, 709-23.
11. Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.H., Lin-Chao, S., Cohen, S.N., 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene

## 5. Literaturverzeichnis

---

- resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9697-702.
12. Blattner, F.R., Plunkett, G.3., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-74.
  13. Bohm, A., Boos, W., 2004. Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 151-156.
  14. Borek, E., Rockenbach, J., Ryan, A., 1956. Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 71, 318-23.
  15. Brown, L., Gentry, D., Elliott, T., Cashel, M., 2002. DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *J. Bacteriol.* 184, 4455-4465.
  16. Brown, T.D., Jones-Mortimer, M.C., Kornberg, H.L., 1977. The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 102, 327-336.
  17. Buckle, M., Pemberton, I.K., Jacquet, M.A., Buc, H., 1999. The kinetics of sigma subunit directed promoter recognition by *E. coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 285, 955-964.
  18. Cao, M., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Wu, M.F., Paddon, C., Helmann, J.D., 2002. Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J. Mol. Biol.* 316, 443-457.
  19. Carmona, M., Rodriguez, M.J., Martinez-Costa, O., De, L., V, 2000. In vivo and in vitro effects of (p)ppGpp on the sigma(54) promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 182, 4711-4718.
  20. Cashel, M., 1969. The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J Biol Chem* 244, 3133-41.
  21. Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Vinella, D., 1996. *The Stringent Response. Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* ASM Press, Washington, D.C..
  22. Castellani, A., Chalmers, A.J., 1919. *Manual of Tropical Medicine*, 3 edition. Williams Wood and Co., New York.
  23. Causton, H.C., Game, L., 2003. MGED comes of age. *Genome Biol.* 4, 351.
  24. Chang, D.E., Smalley, D.J., Conway, T., 2002. Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* 45, 289-306.
  25. Chatterji, D., Fujita, N., Ishihama, A., 1998. The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells* 3, 279-87.
  26. Chilcott, G.S., Hughes, K.T., 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 694-708.



27. Churchill,G.A., 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32 Suppl, 490-5.
28. Cohn,M., Horibata,K., 1959. Physiology of the inhibition by glucose of the induced synthesis of the beta-galactosideenzyme system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 78, 624-35.
29. Cox,D.R., 1958. *Planning of Experiments*. Wiley, New York.
30. Crain,P.F., McCloskey,J.A., 1996. The RNA modification database. *Nucleic Acids Res.* 24, 98-99.
31. Dartigalongue,C., Missiakas,D., Raina,S., 2001. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276, 20866-75.
32. Dean,D.A., Reizer,J., Nikaido,H., Saier,M.H., Jr., 1990. Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J Biol Chem* 265, 21005-10.
33. Death,A., Ferenci,T., 1994. Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J Bacteriol* 176, 5101-7.
34. Dennis,P.P., Ehrenberg,M., Bremer,H., 2004. Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 639-68.
35. Dersch,P., Kneip,S., Bremer,E., 1994. The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. *Mol Gen Genet* 245, 255-9.
36. DiRusso,C.C., Nystrom,T., 1998. The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol. Microbiol.* 27, 1-8.
37. Dittmar,K.A., Sorensen,M.A., Elf,J., Ehrenberg,M., Pan,T., 2005. Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep* 6, 151-7.
38. Drew,H.R., Weeks,J.R., Travers,A.A., 1985. Negative supercoiling induces spontaneous unwinding of a bacterial promoter. *EMBO J.* 4, 1025-1032.
39. Drlica,K., 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* 6, 425-33.
40. Dudoit,S., Popper Schaffer,J., Boldrick,J.C., 2003. Multiple Hypothesis Testing in Microarray Experiments. *Statistical Science* 18, 71-103.
41. Dunin-Horkawicz,S., Czerwoniec,A., Gajda,M.J., Feder,M., Grosjean,H., Bujnicki,J.M., 2006. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. *Nucleic Acids Res.* 34, D145-D149.
42. Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., Botstein,D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-8.

## 5. Literaturverzeichnis

---

43. Emmer,M., deCrombrugge,B., Pastan,I., Perlman,R., 1970. Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: its role in the synthesis of inducible enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66, 480-7.
44. Erdogan,F., Kirchner,R., Mann,W., Ropers,H.H., Nuber,U.A., 2001. Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res.* 29, E36.
45. Escherich,T. Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. 1886.

Ref Type: Report

46. Fan,J.B., Chen,X., Halushka,M.K., Berno,A., Huang,X., Ryder,T., Lipshutz,R.J., Lockhart,D.J., Chakravarti,A., 2000. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res.* 10, 853-860.
47. Feng,J., Atkinson,M.R., McCleary,W., Stock,J.B., Wanner,B.L., Ninfa,A.J., 1992. Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 6061-6070.
48. Ferenci,T., 1996. Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiol Rev* 18, 301-17.
49. Ferenci,T., 1999a. 'Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res Microbiol* 150, 431-8.
50. Ferenci,T., 1999b. Regulation by nutrient limitation. *Curr Opin Microbiol* 2, 208-13.
51. Ferenci,T., 2001. Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environ Microbiol* 3, 605-11.
52. Fischer,D., Teich,A., Neubauer,P., Hengge-Aronis,R., 1998. The general stress sigma factor sigmaS of *Escherichia coli* is induced during diauxic shift from glucose to lactose. *J. Bacteriol.* 180, 6203-6206.
53. Friesen,J.D., Fiil,N.P., Parker,J.M., Haseltine,W.A., 1974. A new relaxed mutant of *Escherichia coli* with an altered 50S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3465-9.
54. Geerse,R.H., van der Pluijm,J., Postma,P.W., 1989. The repressor of the PEP:fructose phosphotransferase system is required for the transcription of the pps gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 218, 348-52.
55. Gentry,D.R., Hernandez,V.J., Nguyen,L.H., Jensen,D.B., Cashel,M., 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175, 7982-7989.
56. Giaever,H.M., Styrvold,O.B., Kaasen,I., Strom,A.R., 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 2841-2849.
57. Gill,R.T., DeLisa,M.P., Valdes,J.J., Bentley,W.E., 2001. Genomic analysis of high-cell-density recombinant *Escherichia coli* fermentation and "cell conditioning" for improved recombinant protein yield. *Biotechnol Bioeng* 72, 85-95.

58. Goldenbaum,P.E., Hall,G.A., 1979. Transport of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate across *Escherichia coli* vesicle membranes. *J Bacteriol* 140, 459-67.
59. Grimm,V., Ezaki,S., Susa,M., Knabbe,C., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2004. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3766-3774.
60. Gropp,M., Strausz,Y., Gross,M., Glaser,G., 2001. Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J Bacteriol* 183, 570-9.
61. Grossman,A.D., Taylor,W.E., Burton,Z.F., Burgess,R.R., Gross,C.A., 1985. Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* 186, 357-365.
62. Hanamura,A., Aiba,H., 1992. A new aspect of transcriptional control of the *Escherichia coli* *crp* gene: positive autoregulation. *Mol Microbiol* 6, 2489-97.
63. Hardimann,T. 2006.  
Ref Type: Personal Communication
64. Harman,J.G., 2001. Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* 1547, 1-17.
65. Hatfield,G.W., Benham,C.J., 2002. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 36, 175-203.
66. Helling,R.B., 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* 176, 4664-4668.
67. Hengge-Aronis,R., 1993. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72, 165-168.
68. Hengge-Aronis,R., 2002. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 341-346.
69. Hengge-Aronis,R., Klein,W., Lange,R., Rimmele,M., Boos,W., 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 7918-7924.
70. Hirsch,M., Elliott,T., 2002. Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 5077-5087.
71. Holland,M.M., Leib,T.K., Gerlt,J.A., 1988. Isolation and characterization of a small catalytic domain released from the adenylate cyclase from *Escherichia coli* by digestion with trypsin. *J Biol Chem* 263, 14661-8.
72. Hommais,F., Krin,E., Laurent-Winter,C., Soutourina,O., Malpertuy,A., Le Caer,J.P., Danchin,A., Bertin,P., 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* 40, 20-36.
73. Hua,Q., Yang,C., Oshima,T., Mori,H., Shimizu,K., 2004. Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 70, 2354-66.

## 5. Literaturverzeichnis

---

74. Hung,S.P., Baldi,P., Hatfield,G.W., 2002. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of leucine-responsive regulatory protein. *J Biol Chem* 277, 40309-23.
75. Ichikawa,J.K., Li,C., Fu,J., Clarke,S., 1994. A gene at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome encodes a lipoprotein with unusual amino acid repeat sequences. *J. Bacteriol.* 176, 1630-1638.
76. Imamura,R., Yamanaka,K., Ogura,T., Hiraga,S., Fujita,N., Ishihama,A., Niki,H., 1996. Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 25423-9.
77. Irizarry,R.A., Warren,D., Spencer,F., Kim,I.F., Biswal,S., Frank,B.C., Gabrielson,E., Garcia,J.G., Geoghegan,J., Germino,G., Griffin,C., Hilmer,S.C., Hoffman,E., Jedlicka,A.E., Kawasaki,E., Martinez-Murillo,F., Morsberger,L., Lee,H., Petersen,D., Quackenbush,J., Scott,A., Wilson,M., Yang,Y., Ye,S.Q., Yu,W., 2005. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods* 2, 345-50.
78. Isaac,S., Jennings,D., 1996. Kultur von Mikroorganismen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
79. Izutsu,K., Wada,A., Wada,C., 2001a. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells* 6, 665-76.
80. Izutsu,K., Wada,C., Komine,Y., Sako,T., Ueguchi,C., Nakura,S., Wada,A., 2001b. *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. *J. Bacteriol.* 183, 2765-2773.
81. Jishage,M., Kvint,K., Shingler,V., Nystrom,T., 2002. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* 16, 1260-1270.
82. Kabir,M.S., Sagara,T., Oshima,T., Kawagoe,Y., Mori,H., Tsunedomi,R., Yamada,M., 2004. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150, 2543-53.
83. Kane,M.D., Jatkoa,T.A., Stumpf,C.R., Lu,J., Thomas,J.D., Madore,S.J., 2000. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* 28, 4552-4557.
84. Kao,K.C., Tran,L.M., Liao,J.C., 2005. A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. *J Biol Chem* 280, 36079-87.
85. Kasimoglu,E., Park,S.J., Malek,J., Tseng,C.P., Gunsalus,R.P., 1996. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atp1BEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate. *J Bacteriol* 178, 5563-7.
86. Kawai,S., Mukai,T., Mori,S., Mikami,B., Murata,K., 2005. Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *J Biosci Bioeng* 99, 320-30.
87. Keller,M. Singalbildung und metabolische Flüsse während der Stringenten Antwort in *Escherichia coli* K12 W3110. 2005.

Ref Type: Thesis/Dissertation

88. Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Karp, P.D., 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33, 334-7.
89. Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O., Yanofsky, C., 2000. DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12170-5.
90. Kim, S.Y., Nam, T.W., Shin, D., Koo, B.M., Seok, Y.J., Ryu, S., 1999. Purification of Mlc and analysis of its effects on the pts expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274, 25398-402.
91. Kimata, K., Tanaka, Y., Inada, T., Aiba, H., 2001. Expression of the glucose transporter gene, ptsG, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *Embo J* 20, 3587-95.
92. Kitano, H., 2002. Systems biology: a brief overview. *Science* 295, 1662-4.
93. Koo, B.M., Yoon, M.J., Lee, C.R., Nam, T.W., Choe, Y.J., Jaffe, H., Peterkofsky, A., Seok, Y.J., 2004. A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279, 31613-21.
94. Kovarova-Kovar, K., Egli, T., 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 646-66.
95. Kvint, K., Farewell, A., Nystrom, T., 2000. RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J. Biol. Chem.* 275, 14795-14798.
96. Laffler, T., Gallant, J.A., 1974. Stringent control of protein synthesis in *E. coli*. *Cell* 3, 47-9.
97. Lange, R., Fischer, D., Hengge-Aronis, R., 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 4676-4680.
98. Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1994. The nlpD gene is located in an operon with rpoS on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* 13, 733-743.
99. Laurie, A.D., Bernardo, L.M., Sze, C.C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nystrom, T., Shingler, V., 2003. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278, 1494-1503.
100. Lease, R.A., Belfort, M., 2000. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9919-9924.
101. Lease, R.A., Cusick, M.E., Belfort, M., 1998. Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 12456-12461.
102. Lengeler, J.W., 1993. Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box? *Antonie Van Leeuwenhoek* 63, 275-288.

## 5. Literaturverzeichnis

---

103. Leonhartsberger,S., Huber,A., Lottspeich,F., Bock,A., 2001. The hydH/G Genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J. Mol. Biol.* 307, 93-105.
104. Lipshutz,R.J., Fodor,S.P., Gingeras,T.R., Lockhart,D.J., 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* 21, 20-24.
105. Liu,X., De Wulf,P., 2004. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* 279, 12588-97.
106. Liu,X., Ferenci,T., 1998. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 3917-22.
107. Liu,X., Ferenci,T., 2001. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* 147, 2981-9.
108. Loewen,P.C., Hengge-Aronis,R., 1994. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* 48, 53-80.
109. Loewen,P.C., Hu,B., Strutinsky,J., Sparling,R., 1998. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 44, 707-17.
110. Lönstedt,I., Speed,T.P., 2002. Replicated microarray data. *Statistica sinica* 12, 31-46.
111. Luli,G.W., Strohl,W.R., 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1004-1011.
112. Lunin,V.V., Li,Y., Schrag,J.D., Iannuzzi,P., Cygler,M., Matte,A., 2004. Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *J Bacteriol* 186, 6915-27.
113. Magnusson,L.U., Farewell,A., Nystrom,T., 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13, 236-42.
114. Majdalani,N., Cunning,C., Sledjeski,D., Elliott,T., Gottesman,S., 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 12462-12467.
115. Mandel,M.J., Silhavy,T.J., 2005. Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability. *J. Bacteriol.* 187, 434-442.
116. Mandell,G.L., Bennett,J.E., Dolin,R., 2004. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 edition. Elsevier Churchill Livingstone.
117. Mauch,K., Müller,D., Reuss,M. Integration von zellulären Stoffwechsel- und Signalnetzwerken. Themenheft Forschung 2005 - Systembiologie 1. 2005. Universität Stuttgart.

Ref Type: Magazine Article

118. McCann, M.P., Fraley, C.D., Matin, A., 1993. The putative sigma factor KatF is regulated posttranscriptionally during carbon starvation. *J. Bacteriol.* 175, 2143-2149.
119. McCarter, J.D., Stephens, D., Shoemaker, K., Rosenberg, S., Kirsch, J.F., Georgiou, G., 2004. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.* 186, 5919-5925.
120. McCarthy, J.E., 1988. Expression of the unc genes in *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20, 19-39.
121. McFall, E., Newman, E.B., 1996. *Amino Acids as Carbon Sources. Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* ASM Press, Washington, D.C..
122. McGinnis, J.F., Paigen, K., 1969. Catabolite inhibition: a general phenomenon in the control of carbohydrate utilization. *J. Bacteriol.* 100, 902-13.
123. Merrick, M.J., 1993. In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol. Microbiol.* 10, 903-9.
124. Meyer, D., Schneider-Fresenius, C., Horlacher, R., Peist, R., Boos, W., 1997. Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179, 1298-306.
125. Meyer, S., Noisommit-Rizzi, N., Reuss, M., Neubauer, P., 1999. Optimized analysis of intracellular adenosine and guanosine phosphates in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 271, 43-52.
126. Migula, W., 1895. *Bacteriaceae (Stabchenbakterien).* Die Natürlichen Pflanzenfamilien, W. Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia. A. ENGLER and K. PRANTL (eds), pp. 20-30.
127. Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., Ilsley, D., 2000. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21, 128-34.
128. Muffler, A., Barth, M., Marschall, C., Hengge-Aronis, R., 1997a. Heat shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 445-452.
129. Muffler, A., Traulsen, D.D., Fischer, D., Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1997b. The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 297-300.
130. Neidhardt, F.C., Curtiss I., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.E., 1996. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* ASM Press, Washington, D.C..
131. Neidhardt, F.C., Ingraham, J., Schaechter, M., 1990. *Physiology of the Bacterial Cell.* Sinauer Associates, Inc..
132. Nguyen, C.C., Saier, M.H., Jr., 1995. Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors. *FEBS Lett* 377, 98-102.

## 5. Literaturverzeichnis

---

133. Ninnemann,O., Koch,C., Kahmann,R., 1992. The E.coli fis promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J.* 11, 1075-1083.
134. Notley-McRobb,L., Ferenci,T., 1999. The generation of multiple co-existing mal-regulatory mutations through polygenic evolution in glucose-limited populations of *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* 1, 45-52.
135. Nystrom,T., 1994. The glucose-starvation stimulon of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. *Mol. Microbiol.* 12, 833-843.
136. Ogura,M., Agata,Y., Watanabe,K., McCormick,R.M., Hamaguchi,Y., Aso,Y., Mitsuhashi,M., 1998. RNA chip: quality assessment of RNA by microchannel linear gel electrophoresis in injection-molded plastic chips. *Clin. Chem.* 44, 2249-2255.
137. Oh,M.K., Liao,J.C., 2000a. DNA microarray detection of metabolic responses to protein overproduction in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 2, 201-9.
138. Oh,M.K., Liao,J.C., 2000b. Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 16, 278-86.
139. Oh,M.K., Rohlin,L., Kao,K.C., Liao,J.C., 2002. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277, 13175-83.
140. Osumi,T., Saier,M.H., Jr., 1982a. Mechanism of regulation of the lactose permease by the phosphotransferase system in *Escherichia coli*: evidence for protein-protein interaction. *Ann Microbiol (Paris)* 133, 269-73.
141. Osumi,T., Saier,M.H., Jr., 1982b. Regulation of lactose permease activity by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 1457-61.
142. Pastan,I., Perlman,R., 1970. Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science* 169, 339-44.
143. Paul,B.J., Barker,M.M., Ross,W., Schneider,D.A., Webb,C., Foster,J.W., Gourse,R.L., 2004a. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118, 311-22.
144. Paul,B.J., Ross,W., Gaal,T., Gourse,R.L., 2004b. rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 38, 749-70.
145. Pease,A.J., Wolf,R.E., Jr., 1994. Determination of the growth rate-regulated steps in expression of the *Escherichia coli* K-12 *gnd* gene. *J Bacteriol* 176, 115-22.
146. Perham,R.N., Packman,L.C., Radford,S.E., 1987. 2-Oxo acid dehydrogenase multi-enzyme complexes: in the beginning and halfway there. *Biochem. Soc. Symp.* 54, 67-81.
147. Phadtare,S., Inouye,M., 2001. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 1205-1214.



148. Phadtare,S., Kato,I., Inouye,M., 2002. DNA microarray analysis of the expression profile of *Escherichia coli* in response to treatment with 4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one. *J Bacteriol* 184, 6725-9.
  149. Polen,T., Rittmann,D., Wendisch,V.F., Sahm,H., 2003. DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl Environ Microbiol* 69, 1759-74.
  150. Preiss,J., Yung,S.G., Baecker,P.A., 1983. Regulation of bacterial glycogen synthesis. *Mol. Cell Biochem.* 57, 61-80.
  151. Quackenbush,J., 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* 32 Suppl, 496-501.
  152. Quinn,G.P., Keough,M.J., 2002. Experimental design and data analysis for biologist. Cambridge University Press.
  153. R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
  154. Ramseier,T.M., Bledig,S., Michotey,V., Feghali,R., Saier,M.H., Jr., 1995. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16, 1157-69.
  155. Ramseier,T.M., Negre,D., Cortay,J.C., Scarabel,M., Cozzone,A.J., Saier,M.H., Jr., 1993. In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the fru, pps, ace, pts and icd operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 234, 28-44.
  156. Reitzer,L., Schneider,B.L., 2001. Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 422-44, table.
  157. Renard,P., Ernest,I., Houbion,A., Art,M., Le Calvez,H., Raes,M., Remacle,J., 2001. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res.* 29, E21.
  158. Reuss,M. Forschungsschwerpunkt Systembiologie an der Universität Stuttgart. Themenheft Forschung 2005 - Systembiologie 1. 2005. Universität Stuttgart.
- Ref Type: Magazine Article
159. Richmond,C.S., Glasner,J.D., Mau,R., Jin,H., Blattner,F.R., 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 27, 3821-35.
  160. Roy,A., Danchin,A., Joseph,E., Ullmann,A., 1983. Two functional domains in adenylate cyclase of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 165, 197-202.
  161. Rozen,Y., LaRossa,R.A., Templeton,L.J., Smulski,D.R., Belkin,S., 2002. Gene expression analysis of the response by *Escherichia coli* to seawater. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 15-25.
  162. Sabina,J., Dover,N., Templeton,L.J., Smulski,D.R., Soll,D., LaRossa,R.A., 2003. Interfering with different steps of protein synthesis explored by transcriptional profiling of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 185, 6158-70.

## 5. Literaturverzeichnis

---

163. Sabnis,N.A., Yang,H., Romeo,T., 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* 270, 29096-104.
164. Saier,M.H., Jr., 1996a. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 138, 97-103.
165. Saier,M.H., Jr., 1996b. Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Res Microbiol* 147, 439-47.
166. Saier,M.H., Jr., Feucht,B.U., McCaman,M.T., 1975. Regulation of intracellular adenosine cyclic 3':5'-monophosphate levels in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Evidence for energy-dependent excretion of the cyclic nucleotide. *J Biol Chem* 250, 7593-601.
167. Salmon,K., Hung,S.P., Mekjian,K., Baldi,P., Hatfield,G.W., Gunsalus,R.P., 2003. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* 278, 29837-55.
168. Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, New York.
169. Sands,M.K., Roberts,R.B., 1952. The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 63, 505-11.
170. Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W., Brown,P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
171. Schlegel,H.G., 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*, 7 edition. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York.
172. Schneider,E., 2000. ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chemie in unserer Zeit* 34, 90-98.
173. Schreiber,G., Metzger,S., Aizenman,E., Roza,S., Cashel,M., Glaser,G., 1991. Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266, 3760-7.
174. Schuchhardt,J., Beule,D., Malik,A., Wolski,E., Eickhoff,H., Lehrach,H., Herzog,H., 2000. Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 28, E47.
175. Schweder,T., Lee,K.H., Lomovskaya,O., Matin,A., 1996. Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor ( $\sigma^s$ ) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* 178, 470-476.
176. Seeto,S., Notley-McRobb,L., Ferenci,T., 2004. The multifactorial influences of RpoS, Mlc and cAMP on *ptsG* expression under glucose-limited and anaerobic conditions. *Res Microbiol* 155, 211-5.
177. Selinger,D.W., Saxena,R.M., Cheung,K.J., Church,G.M., Rosenow,C., 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* 13, 216-23.

178. Seyfzadeh,M., Keener,J., Nomura,M., 1993. spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 11004-11008.
179. Shapiro,J., Machattie,L., Eron,L., Ihler,G., Ippen,K., Beckwith,J., 1969. Isolation of pure lac operon DNA. Nature 224, 768-74.
180. Shimada,T., Fujita,N., Maeda,M., Ishihama,A., 2005. Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system. Genes Cells 10, 907-918.
181. Skinner,A.J., Cooper,R.A., 1971. The regulation of ribose-5-phosphate isomerisation in *Escherichia coli* K12. FEBS Lett. 12, 293-296.
182. Smyth,G.K., 2005. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman,R., Carrey,V., Dudoit,S., Irizarry,R., Huber,W. (Eds.), 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. Springer, New York, pp. 397-420.
183. Smyth,G.K., Yang,Y.H., Speed,T., 2003. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. Methods Mol. Biol. 224, 111-136.
184. Somerville,C.R., Ahmed,A., 1979. Mutants of *Escherichia coli* defective in the degradation of guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate (pppGpp). Mol Gen Genet 169, 315-23.
185. Southern,E., Mir,K., Shchepinov,M., 1999. Molecular interactions on microarrays. Nat. Genet. 21, 5-9.
186. Southern,E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.
187. Spassky,A., Rimsky,S., Buc,H., Busby,S., 1988. Correlation between the conformation of *Escherichia coli* -10 hexamer sequences and promoter strength: use of orthophenanthroline cuprous complex as a structural index. EMBO J. 7, 1871-1879.
188. Sprenger,G.A., 1995. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. Arch. Microbiol. 164, 324-330.
189. Stamminger,G., Lazzarini,R.A., 1974. Analysis of the RNA of defective VSV particles. Cell 3, 85-93.
190. Stent,G.S., Brenner,S., 1961. A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 47, 2005-14.
191. Straus,D.B., Walter,W.A., Gross,C.A., 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. Nature 329, 348-51.
192. Stryer,L., 1996. Biochemie, 4 edition. Spektrum Akademischer Verlag.
193. Tani,T.H., Khodursky,A., Blumenthal,R.M., Brown,P.O., Matthews,R.G., 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13471-6.
194. Tao,H., Bausch,C., Richmond,C., Blattner,F.R., Conway,T., 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. J Bacteriol 181, 6425-40.

## 5. Literaturverzeichnis

---

195. Touloukhanov,I., Shulgina,I., Hernandez,V.J., 2001. Binding of the transcription effector ppGpp to Escherichia coli RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. *J Biol Chem* 276, 1220-5.
196. Travers,A., Muskhelishvili,G., 2005. DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* 3, 157-69.
197. Tucker,D.L., Tucker,N., Conway,T., 2002. Gene expression profiling of the pH response in Escherichia coli. *J Bacteriol* 184, 6551-8.
198. Tusher,V.G., Tibshirani,R., Chu,G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-21.
199. Uden,G., Achebach,S., Holighaus,G., Tran,H.G., Wackwitz,B., Zeuner,Y., 2002. Control of FNR function of Escherichia coli by O<sub>2</sub> and reducing conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 263-268.
200. Uden,G., Bongaerts,J., 1997. Alternative respiratory pathways of Escherichia coli: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 217-234.
201. Velculescu,V.E., Zhang,L., Vogelstein,B., Kinzler,K.W., 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
202. Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannerhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Di Francesco,V., Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nusskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferreira,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T.,

- Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., Nodell,M., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-51.
203. Vrentas,C.E., Gaal,T., Ross,W., Ebright,R.H., Gourse,R.L., 2005. Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.* 19, 2378-2387.
204. Wada,A., Igarashi,K., Yoshimura,S., Aimoto,S., Ishihama,A., 1995. Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 410-7.
205. Wang,L., Li,J., March,J.C., Valdes,J.J., Bentley,W.E., 2005. luxS-Dependent Gene Regulation in *Escherichia coli* K-12 Revealed by Genomic Expression Profiling. *J Bacteriol* 187, 8350-60.
206. Wei,Y., Lee,J.M., Richmond,C., Blattner,F.R., Rafalski,J.A., LaRossa,R.A., 2001. High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 545-56.
207. Weickert,M.J., Adhya,S., 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* 267, 15869-74.
208. Wick,L.M., Egli,T., 2004. Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 89, 1-45.
209. Winter,S. 2006.  
Ref Type: Personal Communication
210. Xiao,H., Kalman,M., Ikehara,K., Zemel,S., Glaser,G., Cashel,M., 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *J Biol Chem* 266, 5980-90.
211. Xu,B., Jahic,M., Blomsten,G., Enfors,S.O., 1999a. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 564-571.
212. Xu,B., Jahic,M., Enfors,S.O., 1999b. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 15, 81-90.
213. Yamada,H., Muramatsu,S., Mizuno,T., 1990. An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 420-425.
214. Yamashino,T., Ueguchi,C., Mizuno,T., 1995. Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J.* 14, 594-602.
215. Yang,X., Ishiguro,E.E., 2001. Involvement of the N terminus of ribosomal protein L11 in regulation of the RelA protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 6532-7.

## 5. Literaturverzeichnis

---

216. Yang, Y.H., Buckley, M.J., Dudoit, S., Speed, T.P. Comparison of methods for image analysis on cDNA microarray data. Department of Statistics, UC-Berkeley. <http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/zarray/Html/papersindex.html> . 2000.

Ref Type: Report

217. Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., Speed, T.P., 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30, e15.
218. Yang, Y.H., Speed, T., 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* 3, 579-588.
219. Yu, X., Susa, M., Knabbe, C., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2004. Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4083-4091.
220. Zgurskaya, H.I., Keyhan, M., Matin, A., 1997. The sigma S level in starving *Escherichia coli* cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis. *Mol Microbiol* 24, 643-51.
221. Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Minchin, S.D., 2004. Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* 32, 5874-93.
222. Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., Storz, G., 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 183, 4562-70.
223. Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J.R., Maurizi, M.R., Wickner, S., 2001. The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* 15, 627-637.
224. Zientz, E., Bongaerts, J., Uden, G., 1998. Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 180, 5421-5425.
225. Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J., 1970. Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66, 104-10.

## 6 Glossar

alternativer Sigma-Faktor	Der <b>alternative Sigma-Faktor</b> interagiert unter verschiedenen Stressbedingungen mit der RNA-Polymerase und bewirkt so deren Umprogrammierung. Gene, die der Zelle erlauben, auf den gegebenen Stress zu reagieren, werden exprimiert. In <i>E. coli</i> sind sechs alternative Sigma-Faktoren bekannt.
A-Wert	Der <b>A-Wert</b> bezeichnet die mittlere logarithmierte Gesamtintensität eines Spots und berechnet sich zu $A=1/2\log_2RG$ . ( <i>R</i> : Hintergrundkorrigierte Intensität eines Spots für den roten Kanal, <i>G</i> : Hintergrundkorrigierte Intensität eines Spots für den grünen Kanal).
Batch	<b>Batch</b> -Prozesse bezeichnen Fermentationsprozesse, bei denen der Bioreaktor einmal komplett befüllt wird und nach Ablauf einer bestimmten Zeitspanne ("Reaktionszeit" oder "Wachstumszeit") wieder komplett entleert wird.
C-terminal	<b>C-terminal</b> bezeichnet das Carboxyl-Ende eines Proteins
Chemostat	Der <b>Chemostat</b> bezeichnet eine kontinuierliche Prozeßtechnik, bei der die Durchflußrate auf einen konstanten Wert eingestellt wird. Zellkonzentration, Substrat- und Produktkonzentrationen nehmen dann die durch die Verdünnungsrate determinierten Werte an. Die Verdünnungsrate im Chemostat entspricht der Wachstumsrate der Kultur, das Reaktionsvolumen bleibt konstant.
Common Reference Design	Das <b>Common Reference Design</b> beschreibt eine spezielle Vorgehensweise bei der Hybridisierung von Proben auf Zweikanal-DNA-Microarrays. Verschiedene Proben, die entweder untereinander oder mit der Referenz verglichen werden sollen, werden auf dem Microarray hybridisiert. Dabei wird auf jedem Microarray eine Referenzprobe mit der zu untersuchenden Probe hybridisiert. Interessiert der Vergleich von zwei Proben untereinander, muss der Vergleich indirekt über die Referenz geschehen.
Downstream	Mit <b>Downstream</b> wird die relative Lage eines Abschnittes auf einem DNA- oder RNA-Strang in Richtung des 3'-Endes hin bezeichnet.

Dye-Swap Experiment	Ein <b>Dye-Swap Experiment</b> ist ein Experiment, bei dem zwei Microarrays mit cDNA-Proben gleichen RNA-Ursprungs hybridisiert werden. Der Unterschied zwischen den Microarrays ist die Markierung der cDNA: Auf dem ersten Microarray wird Probe 1 mit Cy3-dCTP markiert und Probe 2 mit Cy5-dCTP, auf dem zweiten Microarray wird umgekehrt Probe 1 mit Cy5-dCTP markiert und Probe 2 mit Cy3-dCTP. Die Markierungen werden also über Kreuz vertauscht. Idealerweise lassen sich so die durch die Einbauunterschiede der markierten Nukleotide bedingten Verzerrungen der Daten bei entsprechender Verrechnung der Log-Ratios eliminieren.
False Discovery Rate	Die <b>False Discovery Rate</b> ist das erwartete Verhältnis zwischen der Anzahl der Fehler 1. Art und der Anzahl der abgelehnten Null-Hypothesen.
Family Wise Error Rate	Die <b>Family Wise Error Rate</b> ist die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens ein Fehler 1. Art auftritt.
Fed-Batch	<b>Fed-Batch</b> -Prozesse bezeichnen Fermentationsprozesse, bei denen der Füllstand anfangs unterhalb der maximalen Kapazität des Bioreaktors liegt. Der Füllstand wird dann langsam bis zur maximalen Auslastung mit Nährmedium erhöht. Dann wird der Reaktor wieder komplett entleert.
Fehler 1. Art	Ein <b>Fehler 1. Art</b> ist die Entscheidung für die Alternativ-Hypothese, obwohl die Null-Hypothese richtig ist, kurz eine falsch-positive Entscheidung.
Fehler 2. Art	Ein <b>Fehler 2. Art</b> ist die Entscheidung für die Nullhypothese, obwohl die Alternativ-Hypothese richtig ist, kurz eine falsch-negative Entscheidung.
Freiheitsgrad	<b>Freiheitsgrade</b> beschreiben die in einer Analyse oder einem System zur Verfügung stehenden Informationen. Die Anzahl der Freiheitsgrade in einem Microarray-Experiment berechnet sich aus der Anzahl unterschiedlicher unabhängiger Einheiten (biologische Replikate) abzüglich der Anzahl unterschiedlicher Behandlungen.
Functional Genomics	<b>Functional Genomics</b> bezeichnet die Analyse des Genoms, der Ribonukleinsäuren, der Metabolite sowie der Proteine.



---

Grid	Ein <b>Grid</b> bezeichnet ein Gitter, das zur Bildanalyse über den Array „gelegt“ wird. Es ist in der Bildanalyse-Software implementiert. Die einzelnen Punkte des Grids werden mit den Spots auf der Bilddatei zur Deckung gebracht. Über die Bildanalyse-Software kann so ein Wert für die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Spots berechnet werden.
Genomics	<b>Genomics</b> bezeichnet die Analyse des gesamten Genoms.
Helix-Turn-Helix Motiv	Die DNA-bindende Oberfläche eines DNA-bindenden Proteins, die aus zwei $\alpha$ -Helices besteht, welche über eine Kehre (engl.: <i>turn</i> ) verbunden sind, wird als <b>Helix-Turn-Helix Motiv</b> bezeichnet.
Irrtumswahrscheinlichkeit	Klassische statistische Hypothesentests wie z.B. der t-Test, kontrollieren den Fehler 1. Art zu einer vorher festgelegten <b>Irrtumswahrscheinlichkeit</b> (auch als Signifikanzniveau bezeichnet). Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist eine obere Grenze für den Fehler 1. Art und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der im Rahmen dieses Hypothesentests die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen werden kann, obwohl sie eigentlich richtig ist.
Local Weighted Regression	Die <b>Local Weighted Regression</b> stellt ein Verfahren der bereichsweisen linearen Regressionsschätzung dar. Bei der Normalisierung von Microarray-Daten wird sie häufig verwendet, um die funktionale Abhängigkeit der <i>M</i> -Werte von den <i>A</i> -Werten zu schätzen. Damit können dann experimentell bedingte Datenverzerrungen eliminiert werden, insbesondere diejenigen, die durch Unterschiede in den Einbauraten der Nukleotide über die Reverse Transkriptase verursacht worden sind.
Log-Ratio	Der <b>Log-Ratio</b> (auch als <i>M</i> -Wert bezeichnet) gibt bei einem Microarray-Experiment den logarithmierten Expressions-Verhältniswert der hintergrundkorrigierten Intensitäten des roten ( <i>R</i> ) und des grünen ( <i>G</i> ) Kanals eines untersuchten Spots an und berechnet sich zu $M = \log_2 R/G$ .
MA-Plot	Im <b>MA-Plot</b> sind die <i>M</i> -Werte in Abhängigkeit der <i>A</i> -Werte graphisch dargestellt.
Metabolit	Ein <b>Metabolit</b> ist ein Stoffwechselintermediat.

Metabolomics	<b>Metabolomics</b> bezeichnet die Analyse der Stoffwechselintermediate (Metabolite) der Zelle.
Modulon	Die Basiseinheit der Genexpression ist das Operon. Mehrere Operons werden durch ein übergeordnetes Regulatorprotein, im Rahmen eines sogenannten Regulons, koordiniert gesteuert. Eine hierarchisch noch höhere Einheit ist das <b>Modulon</b> . Hier wird eine mehr oder weniger große Anzahl von Regulons zu einer bereits sehr komplex strukturierten Regulationseinheit zusammengefasst. Die Regulons werden durch ein gemeinsames Modulatorprotein reguliert. Einem Modulon lässt sich in der Regel eine bestimmte physiologische Aufgabenstellung zuordnen. Es ist in der Lage die untergeordneten Expressionseinheiten koordiniert zu aktivieren oder zu inhibieren.
mRNA	Die <b>mRNA</b> (Boten-RNA, engl.: <i>messenger-RNA</i> ) wird während des Vorgangs der Transkription durch das Enzym RNA-Polymerase hergestellt. Sie stellt eine direkte RNA-Kopie eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnitts der DNA dar.
M-Wert	siehe Log-Ratio
N-terminal	<b>N-terminal</b> bezeichnet das Amino-Ende eines Proteins
Null-Hypothese	Die <b>Null-Hypothese</b> eines statistischen Tests trifft eine Annahme über eine oder mehrere in diesem Test untersuchten stochastischen Größen. Im Gegenzug steht die Alternativ-Hypothese für eine Menge von Ereignissen, die der Null-Hypothese nicht entsprechen. Der Analyse liegt dabei die Frage zugrunde, ob die Null-Hypothese zu einer vorher festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit abgelehnt und damit die Alternativ-Hypothese angenommen werden kann. Die Null-Hypothese bei der Untersuchung der Frage, ob ein bestimmtes Gen in einem Microarray-Experiment zwischen zwei Bedingungen signifikant reguliert ist oder nicht, lautet: Das Gen ist nicht differentiell exprimiert. Die Alternativ-Hypothese lautet in diesem Fall: Das Gen ist differentiell exprimiert.
p-Wert	Der <b>p-Wert</b> ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Teststatistik bei vorausgesetzter Gültigkeit der Null-Hypothese Werte annimmt, die mindestens so groß sind wie der aus der Stichprobe abgeleitete Wert der Teststatistik.

---

Penalty-Wert	Der <b>Penalty-Wert</b> ist ein Wert, der auf Grund des Mittelwertes sowie der Standardabweichung der Probenvarianzen eines Gens in einem Microarray-Experiment geschätzt wird, um eine parametrische, empirische Bayes-Annäherung der t-Statistik berechnen zu können.
Proteomics	<b>Proteomics</b> bezeichnet die Analyse aller vorhandenen Proteine und deren Wechselwirkungen.
Regulon	Ein <b>Regulon</b> umfaßt mehrere oft überlappende Gruppen metabolisch koordinierter Operone. Diese werden durch einen gemeinsamen Regulator reguliert.
Scatterplot Smoother	siehe Local Weighted Regression
Sigma-Faktor	Ein <b>Sigma-Faktor</b> ist in der Protein-Biosynthese von Prokaryoten ein Protein, welches für die Initiation der Transkription notwendig ist. Der Sigma-Faktor bindet an die Pribnow-Box des Promotors (ein spezieller Bereich des Promotors) und erhöht damit drastisch die Bindungswahrscheinlichkeit der Polymerase an dieser Stelle, denn die Polymerase kann sich auch so locker an die DNA binden (allerdings ohne zu transkribieren). Nun wird unter Einbau von Nukleotiden die Elongation gestartet, wobei der Sigma-Faktor abgespalten wird.
Sonde	Als <b>Sonde</b> eines Gens wird ein DNA-Fragment (z.B. cDNA, Oligonukleotide) bezeichnet, das komplementär zur gesuchten und zu hybridisierenden Probe ist. Sie wird auf dem Microarray immobilisiert.
Spot	Mit <b>Spot</b> (engl. <i>Punkt</i> ) bezeichnet man die immobilisierte Sonde eines Gens an einer vordefinierten Position auf dem Microarray.
Starvation	Als <b>Starvation</b> werden strukturelle und funktionale Veränderungen aufgrund einer komplett reprimierten Energie- und Nährstoffzufuhr bezeichnet. Starvation ist die schwerste Form des Hungers. Die prinzipielle metabolische Antwort eines biologischen Systems auf die Starvation ist die Konservierung von Energie und Zellstrukturen.
Stichprobenvarianz	Die <b>Stichprobenvarianz</b> ist der Mittelwert der quadratischen Abweichungen vom Mittelwert.

Stimulon	Ein <b>Stimulon</b> umfaßt eine Gruppe von Genen, die auf einen Stimulus, also einen Außenreiz mit einer verstärkten oder verringerten Transkription reagieren. Die Transkriptions-Änderung erlaubt der Zelle eine Reizantwort.
Structural Genomics	<b>Structural Genomics</b> bezeichnet die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der vom Genom kodierten Proteine.
Subarray	Als <b>Subarray</b> wird ein Microarray bezeichnet, der nur eine begrenzte Anzahl von Genen eines bestimmten Organismus beinhaltet. Oft stehen die Gene in einem thematischen Zusammenhang. Im Gegensatz dazu spiegelt der gesamtgenomische Microarray das gesamte Genom wider. Sonden jedes Offenen Leserahmens des Organismus sind hier repräsentiert.
Subgrid	Hochdichte Microarrays mit mehreren tausend Genen werden oft mit mehreren Nadeln gedruckt. Mit <b>Subgrid</b> wird der Bereich auf dem Microarray bezeichnet, der von einer Nadel gedruckt wurde.
Supercoiling	<b>Supercoiling</b> bezeichnet einen Zustand doppelsträngiger DNA (dsDNA), in dem die Helixachse selbst (und nicht nur der DNA Strang) einen helikalen Verlauf nimmt. Supercoiling ist eine Eigenschaft aller dsDNA Moleküle und eine Voraussetzung für deren biologische Aktivität. In der Regel ist dsDNA negativ verwunden, d.h. leicht „entwunden“.
Systembiologie	Die <b>Systembiologie</b> untersucht das Verhalten und die Wechselwirkungen aller Elemente in einem bestimmten funktionierenden biologischen System und hat dabei den Fokus auf Systemstrukturen biologischer Systeme, also den einzelnen Bestandteilen sowie deren strukturellen Beziehungen. Ferner werden die Systemdynamik, also die Änderung des Systems mit der Zeit unter verschiedenen Bedingungen, die Systemkontrolle, also die im System genutzten biologischen Kontrollsysteme sowie die Konstruktionsprinzipien biologischer Systeme betrachtet. Die Zelle oder sogar ganze Organe sollen in der Gesamtheit der komplexen und dynamischen Abläufe (z.B. Umweltanpassung oder Alterung) quantitativ verstanden und abgebildet werden.

t-Teststatistik	Die gewöhnliche <b>t-Teststatistik</b> für zwei Stichproben berechnet sich als der Quotient aus der Differenz der Mittelwerte der beiden Stichproben und der gepoolten Stichprobenvarianz.
t-Wert	Der <b>t-Wert</b> stellt einen konkreten Wert der t-Teststatistik dar.
Transcriptomics	<b>Transcriptomics</b> bezeichnet die Analyse der Gene, die in einem biologischen System transkribiert werden.
Upstream	Mit <b>Upstream</b> wird die relative Lage eines Abschnittes auf einem DNA- oder RNA-Strang in Richtung des 5'-Endes hin bezeichnet.
Varianz	Die <b>Varianz</b> bezeichnet in der Statistik ein Streuungsmaß, also ein Maß für die Abweichung einer Zufallsvariablen von ihrem Erwartungswert.

## 7 Anhang

Anhang zu Kapitel 3.3, Bestimmung differentiell exprimierter Gene.

### 7.1 Signifikant differentiell exprimierte Gene (geordnet nach T1 - T8)

**Tab. 7.1: Zeitpunkt T1.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren M-, A-, p- und t-Werte, geordnet nach dem Gennamen

T1				
Gen	M	A	t	P.Value
<i>araC</i>	0.80	9.23	4.14	0.019541
<i>b0309</i>	0.67	8.84	3.89	0.039105
<i>b1669</i>	-1.28	8.22	-5.52	0.000312
<i>b1973</i>	0.92	10.84	5.58	0.000292
<i>cstA</i>	0.88	11.53	4.21	0.016796
<i>degS</i>	-0.73	9.48	-4.29	0.014801
<i>gatA</i>	1.02	10.32	4.30	0.014801
<i>gatD</i>	0.71	10.31	4.23	0.016796
<i>gatY</i>	1.07	11.46	7.03	2.83E-06
<i>gatZ</i>	0.86	13.77	4.39	0.01181
<i>gcvH</i>	0.46	9.46	3.83	0.044108
<i>glk</i>	0.55	9.63	4.12	0.019932
<i>hdeA</i>	0.55	10.18	4.81	0.00314
<i>ilvN</i>	0.58	9.86	4.22	0.016796
<i>lamB</i>	0.69	11.46	3.81	0.044108
<i>malE</i>	0.94	9.63	5.36	0.000488
<i>malk</i>	1.08	9.65	6.63	7.04E-06
<i>malT</i>	0.62	10.69	4.89	0.002577
<i>manX</i>	1.03	9.80	6.57	7.04E-06
<i>manY</i>	0.61	11.54	4.43	0.011109
<i>mgIB</i>	0.76	10.44	5.34	0.000488
<i>mgsA</i>	0.37	9.25	4.03	0.026416
<i>unknown (12B3)</i>	-0.36	9.43	-3.78	0.04585
<i>unknown (12E16)</i>	-1.06	8.78	-3.93	0.035508
<i>ybeK</i>	0.52	10.15	3.85	0.042391
<i>ychH</i>	0.64	9.84	4.53	0.008469
<i>ydfH</i>	0.70	9.30	3.80	0.044108
<i>yfeC</i>	0.59	8.95	3.80	0.044108

**Tab. 7.2: Zeitpunkt T2.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren M-, A-, p- und t-Werte, geordnet nach dem Gennamen

<b>T2</b>				
<b>Gen</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>t</b>	<b>P.Value</b>
<i>accB</i>	-0.53	11.05	-3.79	0.007509
<i>aceA</i>	1.39	11.43	9.41	5.89E-12
<i>aceB</i>	1.05	12.84	6.58	4.85E-07
<i>aceE</i>	-0.75	9.80	-5.55	2.40E-05
<i>acpP</i>	-0.55	10.69	-3.23	0.031779
<i>acs</i>	0.78	9.22	5.87	7.96E-06
<i>ahpC</i>	0.44	10.40	4.12	0.003132
<i>alaS</i>	-0.91	10.98	-6.75	2.47E-07
<i>aldA</i>	1.21	10.59	7.00	8.98E-08
<i>argB</i>	-1.12	11.12	-7.12	5.71E-08
<i>aroG</i>	-1.18	11.86	-5.79	1.06E-05
<i>artI</i>	-0.58	9.67	-3.48	0.017848
<i>asnS</i>	-0.63	8.44	-4.33	0.001623
<i>atpA</i>	-0.51	11.34	-4.38	0.001402
<i>atpF</i>	-0.55	12.95	-4.74	0.000442
<i>b0753</i>	0.57	10.10	3.72	0.009232
<i>b0959</i>	0.27	9.27	3.14	0.038898
<i>b1297</i>	0.37	9.87	3.09	0.043219
<i>b1345</i>	-0.40	10.00	-3.08	0.043999
<i>b1399</i>	0.33	11.50	3.37	0.022589
<i>b1518</i>	0.58	9.07	5.23	8.31E-05
<i>b1588</i>	0.65	9.60	4.26	0.002047
<i>b1695</i>	-0.47	8.79	-3.72	0.009232
<i>b1775</i>	0.45	8.61	3.50	0.016779
<i>b1821</i>	0.44	8.90	3.20	0.033865
<i>b1976</i>	0.87	8.69	4.69	0.000517
<i>b2146</i>	0.72	8.96	6.07	3.70E-06
<i>b2341</i>	1.14	11.69	7.56	1.05E-08
<i>b2342</i>	0.42	12.08	3.33	0.024018
<i>b2351</i>	-1.11	10.58	-5.98	5.17E-06
<i>b2505</i>	0.41	9.09	3.18	0.035622
<i>b2999</i>	0.45	8.75	3.15	0.037642
<i>bax</i>	0.44	9.86	3.16	0.03691
<i>carA</i>	-1.94	10.13	-12.07	2.19E-16
<i>carB</i>	-0.59	10.90	-5.03	0.000169
<i>cmk</i>	-0.72	10.18	-5.71	1.34E-05
<i>codA</i>	-0.67	10.16	-3.92	0.005413
<i>codB</i>	-1.14	10.77	-6.94	1.13E-07

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>cpdB</i>	0.41	9.70	3.29	0.026691
<i>cspD</i>	1.28	10.30	5.75	1.22E-05
<i>cspl</i>	0.47	9.60	3.51	0.016548
<i>csrA</i>	-0.48	9.74	-3.53	0.015522
<i>cstA</i>	2.09	11.53	9.98	6.55E-13
<i>cvpA</i>	-0.82	8.97	-5.64	1.73E-05
<i>cydA</i>	0.59	10.33	5.03	0.00017
<i>cydB</i>	0.51	10.03	3.34	0.023885
<i>cydD</i>	-0.51	9.40	-3.70	0.009803
<i>cyoA</i>	-0.40	10.73	-3.45	0.01866
<i>cysC</i>	-0.52	9.41	-4.82	0.000342
<i>cysD</i>	-0.35	12.76	-3.38	0.022153
<i>cysH</i>	-0.42	10.32	-3.83	0.006888
<i>cysJ</i>	-1.35	8.98	-8.12	9.71E-10
<i>cysK</i>	-0.46	9.41	-3.75	0.008444
<i>cysP</i>	-0.38	9.77	-3.50	0.016779
<i>cysW</i>	-0.40	10.90	-3.79	0.007509
<i>dapB</i>	-0.38	9.39	-3.29	0.026425
<i>ddlA</i>	-0.45	9.59	-5.09	0.000136
<i>dmsA</i>	-0.50	8.69	-4.26	0.002047
<i>dnaB</i>	-0.39	10.46	-3.21	0.033637
<i>dniR</i>	-0.33	8.32	-3.15	0.037642
<i>exbB</i>	-0.72	10.33	-6.28	1.74E-06
<i>exbD</i>	-0.44	9.80	-4.09	0.003346
<i>fabF</i>	-0.33	8.69	-3.13	0.039919
<i>fba</i>	-0.74	11.43	-5.74	1.23E-05
<i>fhuA</i>	-0.30	9.36	-3.41	0.020859
<i>flgE</i>	-0.56	11.19	-3.12	0.040028
<i>flgJ</i>	-0.45	10.74	-3.79	0.007509
<i>fliE</i>	-0.81	11.14	-4.52	0.0009
<i>fliZ</i>	-0.33	9.77	-3.03	0.04883
<i>ftn</i>	0.71	9.96	7.42	1.67E-08
<i>gapA</i>	-0.45	10.16	-3.11	0.040736
<i>gatA</i>	1.49	10.32	6.88	1.42E-07
<i>gatC</i>	0.95	11.23	4.71	0.000482
<i>gatD</i>	1.44	10.31	9.27	1.02E-11
<i>gatY</i>	1.23	11.46	8.72	9.90E-11
<i>gatZ</i>	1.41	13.77	7.22	3.71E-08
<i>gcvH</i>	-0.56	9.46	-4.99	0.000195
<i>glcB</i>	0.83	9.02	8.33	4.32E-10
<i>glcF</i>	2.33	10.32	11.15	8.19E-15
<i>glcG</i>	1.77	11.61	10.43	1.23E-13
<i>glk</i>	0.39	9.63	3.45	0.018954

Tab. 7.2:  
Zeitpunkt T2  
Fortsetzung



Gen	M	A	t	P.Value
<i>glnH</i>	0.93	10.86	5.76	1.15E-05
<i>glnP</i>	0.42	10.89	3.59	0.013277
<i>glpF</i>	0.68	10.25	4.68	0.000524
<i>glpK</i>	0.58	10.27	3.91	0.005413
<i>gltA</i>	1.51	10.52	7.81	3.64E-09
<i>gltB</i>	-0.83	10.04	-5.35	5.30E-05
<i>glyA</i>	-0.35	9.87	-3.90	0.005578
<i>grxA</i>	-0.33	10.32	-3.32	0.025086
<i>gshA</i>	-0.47	11.60	-4.46	0.001094
<i>guaB</i>	-0.76	9.16	-6.23	2.09E-06
<i>guaC</i>	-0.47	9.95	-3.08	0.043676
<i>gutM</i>	0.38	9.39	4.39	0.001363
<i>hcaR</i>	0.58	9.69	4.87	0.000297
<i>hdhA</i>	0.36	9.87	3.94	0.005064
<i>hemG</i>	-0.32	10.30	-3.78	0.007693
<i>idnT</i>	0.26	11.19	3.06	0.045802
<i>ilvB</i>	0.59	10.45	3.83	0.006975
<i>ilvC</i>	-0.76	10.54	-3.92	0.005413
<i>ilvG_1</i>	-0.37	9.98	-3.64	0.01158
<i>infA</i>	-0.56	10.48	-3.57	0.013828
<i>intB</i>	0.34	9.45	3.42	0.020209
<i>kgtP</i>	0.52	11.39	4.45	0.001094
<i>ksgA</i>	-0.48	10.39	-3.48	0.017562
<i>lamB</i>	1.04	11.46	5.73	1.29E-05
<i>ldhA</i>	0.93	9.03	4.56	0.000792
<i>lepB</i>	-0.32	8.75	-3.09	0.042708
<i>lldP</i>	0.35	9.36	3.10	0.041664
<i>malE</i>	1.08	9.63	7.33	2.44E-08
<i>malK</i>	1.43	9.65	9.57	3.23E-12
<i>malT</i>	1.08	10.69	8.66	1.20E-10
<i>manX</i>	1.97	9.80	13.56	8.02E-19
<i>manY</i>	1.33	11.54	9.62	2.90E-12
<i>manZ</i>	1.01	9.09	9.00	2.90E-11
<i>map</i>	-0.35	9.20	-3.19	0.035136
<i>mglA</i>	0.57	11.02	3.36	0.022902
<i>mglB</i>	1.05	10.44	8.04	1.36E-09
<i>mhpE</i>	0.51	12.28	3.70	0.009799
<i>mhpR</i>	0.60	10.71	4.04	0.003792
<i>minC</i>	0.57	10.32	4.00	0.004317
<i>modB</i>	0.78	9.47	3.99	0.004463
<i>nlpD</i>	0.77	12.89	4.56	0.000792
<i>nmpC</i>	0.99	11.02	4.15	0.002821
<i>nrfB</i>	0.34	9.26	3.23	0.031779

Tab. 7.2:  
Zeitpunkt T2  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>nuoA</i>	0.61	10.27	3.80	0.007498
<i>nuoB</i>	0.61	10.14	3.51	0.016332
<i>ompT</i>	-1.01	12.42	-6.47	7.66E-07
<i>ompX</i>	-0.39	10.84	-3.52	0.016112
<i>otsB</i>	0.30	11.33	3.30	0.026057
<i>pal</i>	-0.52	9.85	-3.98	0.004662
<i>pflC</i>	-0.56	12.66	-3.40	0.020997
<i>pgk</i>	-0.49	11.14	-4.51	0.0009
<i>pntA</i>	-0.57	11.08	-4.13	0.003101
<i>potC</i>	-0.42	12.34	-3.14	0.03887
<i>priB</i>	-0.58	11.85	-3.98	0.004668
<i>priA</i>	-0.43	11.78	-3.09	0.04297
<i>proV</i>	-0.40	9.83	-3.07	0.045432
<i>prsA</i>	-0.42	9.96	-3.43	0.019825
<i>pspD</i>	0.45	9.07	3.13	0.039919
<i>pssA</i>	0.35	10.08	3.79	0.007574
<i>purE</i>	-0.63	9.72	-5.43	3.91E-05
<i>purF</i>	-0.71	8.94	-4.79	0.000377
<i>purM</i>	-0.73	11.72	-4.12	0.003132
<i>pykF</i>	-0.40	10.66	-3.15	0.037642
<i>pyrB</i>	-0.71	12.18	-4.73	0.000442
<i>pyrH</i>	-1.00	9.61	-7.07	6.64E-08
<i>pyrI</i>	-0.95	11.25	-5.83	9.20E-06
<i>queA</i>	-0.51	10.59	-4.18	0.002631
<i>rbsB</i>	1.69	11.30	7.64	7.63E-09
<i>rfal</i>	-0.47	10.19	-3.39	0.021474
<i>rfbB</i>	-0.49	10.90	-3.84	0.006711
<i>rfbC</i>	-0.37	8.80	-3.38	0.021727
<i>rfbD</i>	-0.50	10.25	-3.12	0.040736
<i>rfbX</i>	-0.67	10.10	-4.58	0.00076
<i>rmf</i>	1.61	12.68	8.35	4.30E-10
<i>rnc</i>	-0.34	10.06	-3.41	0.020504
<i>rnt</i>	-0.41	8.94	-3.19	0.035136
<i>rpiA</i>	0.37	13.64	3.06	0.046073
<i>rplA</i>	-0.86	11.85	-6.14	2.81E-06
<i>rplE</i>	-0.75	10.68	-4.93	0.000231
<i>rplF</i>	-1.00	10.52	-7.07	6.64E-08
<i>rplI</i>	-0.52	9.19	-4.38	0.001398
<i>rplK</i>	-0.84	10.44	-7.54	1.08E-08
<i>rplL</i>	-0.55	12.02	-4.04	0.003835
<i>rplM</i>	-0.69	10.56	-4.83	0.00033
<i>rplN</i>	-0.79	11.21	-5.82	9.59E-06
<i>rplP</i>	-0.47	12.19	-3.89	0.005735

Tab. 7.2:  
Zeitpunkt T2  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>rplR</i>	-0.88	9.84	-6.16	2.60E-06
<i>rplU</i>	-0.51	12.71	-3.44	0.01955
<i>rplV</i>	-0.41	11.57	-3.41	0.02054
<i>rplW</i>	-1.10	11.43	-7.51	1.21E-08
<i>rplX</i>	-0.68	12.29	-5.93	6.28E-06
<i>rplY</i>	-0.82	11.89	-3.66	0.011053
<i>rpmA</i>	-0.53	11.00	-3.02	0.049969
<i>rpmB</i>	-0.80	10.64	-5.04	0.000166
<i>rpmD</i>	-0.80	11.09	-6.05	3.94E-06
<i>rpmE</i>	-0.43	10.25	-3.46	0.018395
<i>rpmF</i>	-0.34	9.53	-3.35	0.023148
<i>rpmH</i>	-0.44	11.69	-3.06	0.04598
<i>rpoA</i>	-0.47	10.85	-3.96	0.004931
<i>rpoZ</i>	-0.46	11.25	-4.96	0.000208
<i>rpsB</i>	-0.84	11.42	-4.06	0.003635
<i>rpsC</i>	-0.32	10.83	-3.32	0.024968
<i>rpsD</i>	-0.70	12.96	-4.20	0.00253
<i>rpsE</i>	-0.61	11.92	-4.23	0.00222
<i>rpsJ</i>	-0.75	11.88	-6.19	2.38E-06
<i>rpsK</i>	-0.52	11.73	-3.19	0.034823
<i>rpsL</i>	-0.52	12.09	-4.25	0.002122
<i>rpsM</i>	-0.49	11.23	-3.95	0.004965
<i>rpsN</i>	-0.66	12.72	-4.94	0.000224
<i>rpsP</i>	-0.83	10.69	-6.61	4.34E-07
<i>rpsQ</i>	-0.55	9.87	-4.19	0.002573
<i>rpsR</i>	-0.34	9.98	-3.74	0.008684
<i>rpsS</i>	-1.17	10.23	-7.25	3.38E-08
<i>rpsT</i>	-0.48	9.47	-3.82	0.007203
<i>rpsU</i>	-0.50	9.95	-3.64	0.01158
<i>rpsV</i>	0.59	10.60	3.62	0.012133
<i>sapA</i>	0.40	9.12	3.22	0.03263
<i>sdhA</i>	0.51	11.13	3.80	0.007498
<i>sdhC</i>	0.69	9.33	4.71	0.000483
<i>sdhD</i>	0.70	12.01	5.36	5.19E-05
<i>sfsA</i>	0.48	10.19	3.22	0.032894
<i>sgcX</i>	0.66	10.55	4.98	0.000196
<i>smf_2</i>	0.51	8.86	4.74	0.000442
<i>smg</i>	0.36	11.72	3.18	0.035247
<i>spr</i>	0.66	11.27	3.84	0.006679
<i>srlA</i>	0.49	9.18	4.57	0.000773
<i>srlR</i>	0.27	9.22	3.46	0.018395
<i>sspA</i>	-0.41	10.49	-3.90	0.005688
<i>stpA</i>	-0.58	8.75	-4.77	0.000404

Tab. 7.2:  
Zeitpunkt T2  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>sucD</i>	0.42	10.30	3.19	0.035136
<i>thrB</i>	-0.64	10.36	-4.78	0.000394
<i>thrC</i>	-1.13	11.72	-8.33	4.32E-10
<i>tnaA</i>	2.73	10.57	10.97	1.38E-14
<i>tolA</i>	-0.46	12.20	-3.16	0.03691
<i>torS</i>	-0.44	8.33	-3.51	0.016332
<i>tra8_1</i>	-0.40	9.51	-3.12	0.040311
<i>trmD</i>	-0.72	12.12	-5.70	1.38E-05
<i>trpB</i>	-0.40	11.15	-3.06	0.045802
<i>trpD</i>	-0.55	9.64	-4.48	0.000996
<i>trs5_1</i>	0.59	12.17	3.38	0.021846
<i>ubiC</i>	0.81	11.54	4.36	0.001462
<i>ugd</i>	0.36	10.33	3.34	0.023453
<i>unknown (12H17)</i>	-1.27	9.05	-9.10	2.00E-11
<i>xerD</i>	-0.44	8.54	-3.11	0.040736
<i>yadF</i>	-0.43	10.83	-3.37	0.022589
<i>yafZ</i>	0.38	9.55	3.10	0.041664
<i>yaiE</i>	0.46	9.07	3.59	0.013037
<i>yajK</i>	-0.38	9.50	-3.81	0.00739
<i>ybaJ</i>	-0.88	8.11	-4.83	0.00033
<i>ybcJ</i>	-0.32	9.35	-3.30	0.026363
<i>ybcT</i>	-0.49	8.55	-3.03	0.04943
<i>ybcU</i>	-0.49	8.73	-3.52	0.015944
<i>ybeJ</i>	0.53	9.92	4.52	0.000887
<i>ybeK</i>	0.48	10.15	3.95	0.004965
<i>ybeR</i>	-0.54	8.59	-3.39	0.021474
<i>ybeV</i>	0.43	9.73	4.05	0.003762
<i>ybfB</i>	0.51	8.50	5.26	7.48E-05
<i>ybjZ</i>	0.34	9.31	4.16	0.002771
<i>yccV</i>	-0.71	8.51	-4.09	0.003342
<i>ycdR</i>	0.40	8.80	3.36	0.022902
<i>ycdS</i>	0.62	8.92	5.11	0.00013
<i>yceO</i>	-0.61	8.31	-4.40	0.001296
<i>ycfC</i>	-0.70	10.89	-4.54	0.00085
<i>ycgN</i>	0.38	9.79	3.42	0.020431
<i>ychH</i>	1.12	9.84	8.58	1.62E-10
<i>yciW</i>	-0.49	9.00	-3.72	0.009296
<i>ycjO</i>	-0.45	9.40	-3.48	0.017474
<i>ycjZ</i>	0.33	8.83	3.62	0.012133
<i>ydcF</i>	0.41	9.57	3.96	0.004931
<i>ydgO</i>	0.28	12.05	3.33	0.024395
<i>ydjE</i>	0.36	8.65	4.10	0.003238
<i>yeaA</i>	0.45	10.95	3.15	0.037642

Tab. 7.2:  
Zeitpunkt T2  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>yeaD</i>	-0.48	9.17	-4.44	0.001126
<i>yeaM</i>	0.35	8.73	3.15	0.038282
<i>yeaZ</i>	-0.37	9.74	-3.35	0.023432
<i>yebL</i>	-0.74	11.20	-5.10	0.000133
<i>yeiC</i>	0.32	9.73	3.04	0.04785
<i>yfhJ</i>	-0.56	9.45	-3.55	0.014938
<i>yfiA</i>	1.09	10.70	7.45	1.53E-08
<i>yfjA</i>	-0.64	12.79	-4.12	0.003132
<i>ygaF</i>	0.39	10.87	3.24	0.03091
<i>ygaH</i>	-0.51	9.50	-4.80	0.000372
<i>ygcA</i>	0.33	10.36	3.63	0.011945
<i>yggG</i>	0.71	11.09	5.09	0.000137
<i>ygjO</i>	0.50	8.89	3.63	0.011865
<i>yhaL</i>	-0.28	14.76	-3.03	0.04943
<i>yhbL</i>	0.42	12.41	3.47	0.018341
<i>yhbV</i>	-0.44	10.00	-4.11	0.003195
<i>yhiJ</i>	0.55	8.18	3.53	0.015907
<i>yaC</i>	0.37	9.98	3.03	0.048933
<i>yihE</i>	-0.45	9.94	-3.88	0.005997
<i>yihX</i>	0.55	9.18	5.57	2.23E-05
<i>yjcG</i>	0.87	9.61	5.72	1.29E-05
<i>yjcH</i>	1.01	10.06	8.14	9.49E-10
<i>yjdG</i>	0.40	8.90	3.69	0.010007
<i>yjdH</i>	0.47	9.74	4.07	0.003579
<i>yjdL</i>	0.41	9.76	3.35	0.023205
<i>yjeB</i>	0.34	9.92	3.72	0.009214
<i>yjfC</i>	0.51	8.65	4.31	0.001714
<i>yjhD</i>	0.29	9.44	3.17	0.036792
<i>yjhE</i>	0.40	8.91	3.46	0.018357
<i>yjhH</i>	0.43	8.84	3.39	0.021474
<i>yjjW</i>	0.33	12.34	3.10	0.041664
<i>ymfH</i>	0.46	8.68	3.65	0.011454
<i>ynaF</i>	0.64	9.08	5.17	0.000104
<i>ynbE</i>	-0.49	9.35	-3.74	0.00883
<i>yqgF</i>	-0.42	8.86	-4.11	0.003195
<i>yrbK</i>	-0.48	11.09	-4.19	0.002573
<i>yrfF</i>	0.41	9.54	3.24	0.031149

Tab. 7.2:  
Zeitpunkt T2  
Fortsetzung

**Tab. 7.3: Zeitpunkt T3.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren M-, A-, p- und t-Werte, geordnet nach dem Gennamen

<b>T3</b>				
<b>Gen</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>t</b>	<b>P.Value</b>
<i>accB</i>	-0.69	11.05	-4.56	0.000824
<i>aceA</i>	1.59	11.43	9.95	1.73E-12
<i>aceB</i>	0.64	12.84	3.97	0.003964
<i>aceB</i>	1.00	12.84	6.22	2.62E-06
<i>aceE</i>	-0.80	9.80	-4.35	0.00146
<i>aceK</i>	0.33	12.49	3.25	0.025174
<i>acrA</i>	-0.41	10.10	-3.19	0.028804
<i>acrB</i>	-0.48	9.71	-3.34	0.020517
<i>acrF</i>	0.65	9.38	4.12	0.002765
<i>acs</i>	1.12	9.22	6.32	1.87E-06
<i>ada</i>	-0.57	10.69	-3.38	0.01911
<i>agaW</i>	0.55	9.50	5.02	0.000184
<i>agaZ</i>	0.40	8.83	3.28	0.02412
<i>ahpC</i>	0.60	10.40	4.67	0.000599
<i>alaS</i>	-0.69	10.98	-4.76	0.000434
<i>aldA</i>	1.69	10.59	8.99	5.73E-11
<i>alpA</i>	0.32	8.63	2.95	0.047007
<i>alr</i>	0.51	9.06	4.09	0.003023
<i>amiA</i>	-0.37	13.09	-3.22	0.027619
<i>ampG</i>	-0.37	9.89	-3.02	0.040679
<i>araJ</i>	0.36	12.16	3.40	0.018057
<i>aroG</i>	-1.07	11.86	-5.21	0.000103
<i>aroK</i>	-0.35	12.72	-3.17	0.030165
<i>artQ</i>	0.54	12.07	4.01	0.003568
<i>asnS</i>	-0.65	8.44	-4.49	0.000994
<i>atpA</i>	-0.58	11.34	-4.63	0.000685
<i>atpF</i>	-0.37	12.95	-3.12	0.03318
<i>atpH</i>	-0.42	11.15	-4.01	0.003565
<i>b0235</i>	0.70	9.52	4.13	0.002671
<i>b0499</i>	0.27	12.62	2.93	0.047704
<i>b0817</i>	-0.39	11.77	-3.26	0.024855
<i>b0832</i>	0.58	10.10	3.39	0.018194
<i>b1016</i>	-0.38	9.90	-2.95	0.046606
<i>b1057</i>	0.61	9.98	3.96	0.004174
<i>b1202</i>	-1.25	8.26	-5.46	4.50E-05
<i>b1297</i>	1.46	9.87	10.12	1.25E-12
<i>b1354</i>	0.45	8.68	3.27	0.02442
<i>b1372</i>	0.35	9.60	3.12	0.033078

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>b1399</i>	0.33	11.50	3.34	0.020602
<i>b1553</i>	0.67	8.87	3.25	0.025128
<i>b1578</i>	0.45	10.81	3.10	0.034655
<i>b1588</i>	1.08	9.60	5.26	8.94E-05
<i>b1605</i>	-0.44	10.12	-3.62	0.010496
<i>b1667</i>	0.49	10.32	3.10	0.034695
<i>b1730</i>	1.05	9.17	4.51	0.000941
<i>b1758</i>	0.30	11.41	3.11	0.034199
<i>b1965</i>	0.55	9.98	3.56	0.011948
<i>b1971</i>	0.94	8.88	4.56	0.000818
<i>b1976</i>	1.05	8.69	5.11	0.000136
<i>b2083</i>	0.48	9.39	3.17	0.030248
<i>b2084</i>	0.35	8.99	3.02	0.040747
<i>b2086</i>	0.51	9.93	4.66	0.000609
<i>b2097</i>	0.39	8.57	3.27	0.024289
<i>b2146</i>	0.41	8.96	3.07	0.036939
<i>b2191</i>	0.45	11.38	3.15	0.031149
<i>b2294</i>	-0.76	9.60	-5.23	9.59E-05
<i>b2341</i>	0.96	11.69	6.39	1.49E-06
<i>b2342</i>	0.45	12.08	3.60	0.010704
<i>b2372</i>	0.42	9.01	3.75	0.007293
<i>b2375</i>	-0.64	10.22	-3.06	0.037744
<i>b2384</i>	-0.52	8.90	-3.15	0.031006
<i>b2430</i>	0.40	9.75	2.91	0.049273
<i>b2450</i>	-0.57	10.10	-3.95	0.004292
<i>b2635</i>	-0.52	12.98	-5.34	6.81E-05
<i>b2740</i>	0.40	11.40	3.82	0.005951
<i>b2789</i>	0.35	9.63	3.40	0.017958
<i>b2833</i>	0.64	9.59	3.85	0.005633
<i>b2873</i>	-0.44	12.35	-3.85	0.005633
<i>b2875</i>	0.45	13.31	5.26	8.94E-05
<i>b2896</i>	0.61	11.56	5.75	1.61E-05
<i>b3022</i>	0.55	9.20	4.37	0.001389
<i>b3023</i>	0.41	9.49	3.61	0.010579
<i>b3042</i>	-0.35	10.12	-3.50	0.014246
<i>bax</i>	0.56	9.86	4.04	0.003195
<i>bax</i>	0.72	9.86	3.88	0.00515
<i>bcp</i>	-0.53	9.31	-3.51	0.013875
<i>bolA</i>	-0.65	10.04	-3.44	0.016553
<i>carA</i>	-1.42	10.13	-8.16	1.92E-09
<i>chaA</i>	-0.31	13.93	-3.26	0.024858
<i>cheR</i>	0.41	9.67	3.42	0.017187
<i>cmk</i>	-0.41	10.18	-2.94	0.047121

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>codB</i>	-1.09	10.77	-6.13	3.60E-06
<i>cspD</i>	1.58	10.30	6.50	1.01E-06
<i>cspE</i>	0.60	9.41	3.15	0.031006
<i>cstA</i>	1.70	11.53	8.08	2.47E-09
<i>cyaA</i>	0.32	10.62	3.27	0.024431
<i>cydA</i>	0.38	10.33	2.95	0.047007
<i>cyoC</i>	-0.34	12.02	-3.12	0.033423
<i>cysB</i>	0.34	9.19	2.91	0.049273
<i>cysC</i>	-0.55	9.41	-3.75	0.007293
<i>cysD</i>	-0.42	12.76	-3.96	0.004198
<i>cysI</i>	-0.82	8.59	-3.61	0.010617
<i>cysJ</i>	-1.75	8.98	-9.38	1.39E-11
<i>cysN</i>	-0.42	11.52	-3.61	0.010617
<i>cysW</i>	-0.55	10.90	-5.17	0.000113
<i>dadA</i>	0.39	12.07	3.20	0.028804
<i>dapB</i>	-0.42	9.39	-3.02	0.040846
<i>dcm</i>	-0.45	10.84	-3.17	0.030165
<i>dgoA</i>	0.58	10.74	4.29	0.001715
<i>dgoK</i>	0.43	10.43	3.47	0.015269
<i>dppA</i>	0.46	10.76	3.02	0.040569
<i>dut</i>	-0.39	10.18	-3.97	0.003964
<i>edd</i>	-0.42	13.54	-4.00	0.003666
<i>entB</i>	-0.42	9.83	-2.96	0.046208
<i>entC</i>	0.26	14.70	2.96	0.046208
<i>exbD</i>	-0.56	9.80	-4.34	0.00146
<i>exuR</i>	-0.71	9.59	-4.45	0.001143
<i>fabD</i>	-0.51	12.39	-3.36	0.01995
<i>fadL</i>	0.46	9.11	3.98	0.003889
<i>fba</i>	-0.50	11.43	-3.88	0.00515
<i>fecA</i>	-0.39	11.83	-2.92	0.0491
<i>fecR</i>	1.59	8.66	4.60	0.00075
<i>flgB</i>	-0.40	12.97	-2.96	0.046208
<i>flgE</i>	-0.68	11.19	-3.47	0.015269
<i>flgG</i>	-0.95	9.65	-4.12	0.002774
<i>flgH</i>	-0.48	9.83	-2.96	0.046208
<i>flgJ</i>	-0.63	10.74	-4.92	0.000255
<i>flgK</i>	-0.64	9.63	-3.23	0.026489
<i>fliD</i>	-0.39	10.32	-3.47	0.015269
<i>fliS</i>	-0.59	9.34	-3.49	0.014885
<i>fliZ</i>	-0.66	9.77	-4.45	0.001143
<i>folC</i>	0.50	13.93	3.35	0.020251
<i>fruA</i>	0.35	10.87	3.31	0.022174
<i>ftsZ</i>	-0.52	12.88	-3.58	0.011553

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung



Gen	M	A	t	P.Value
<i>fusA</i>	-0.41	13.98	-3.98	0.003906
<i>galP</i>	0.55	11.32	4.03	0.003478
<i>galT</i>	-0.56	10.03	-3.06	0.037732
<i>gapA</i>	-0.54	10.16	-3.36	0.019647
<i>gatA</i>	1.60	10.32	6.16	3.37E-06
<i>gatB</i>	0.76	13.96	4.42	0.001224
<i>gatC</i>	1.04	11.23	5.19	0.000105
<i>gatD</i>	1.42	10.31	7.65	1.45E-08
<i>gatY</i>	1.04	11.46	7.38	4.26E-08
<i>gatZ</i>	1.17	13.77	6.02	5.36E-06
<i>gcvH</i>	-0.46	9.46	-3.03	0.039606
<i>glcB</i>	0.49	9.02	3.67	0.009333
<i>glcC</i>	0.67	9.94	4.13	0.002671
<i>glcF</i>	1.31	10.32	5.20	0.000103
<i>glcG</i>	1.24	11.61	7.28	4.77E-08
<i>glgB</i>	-0.30	11.79	-3.23	0.026779
<i>glk</i>	0.55	9.63	4.05	0.003389
<i>glnB</i>	-0.43	9.94	-3.04	0.039209
<i>glnH</i>	0.99	10.86	6.13	3.58E-06
<i>glnP</i>	0.66	10.89	5.16	0.000115
<i>gltA</i>	0.97	10.52	4.16	0.002538
<i>gltB</i>	-1.11	10.04	-6.60	7.10E-07
<i>gltP</i>	0.35	12.26	3.97	0.004044
<i>glyA</i>	-0.42	9.87	-3.87	0.005425
<i>gntP</i>	0.27	12.92	3.08	0.035988
<i>goaG</i>	0.73	9.21	5.49	4.01E-05
<i>greB</i>	-0.60	10.87	-4.03	0.003421
<i>gshA</i>	-0.45	11.60	-4.33	0.001491
<i>guaB</i>	-0.97	9.16	-5.88	9.38E-06
<i>guaB</i>	-0.60	9.16	-4.10	0.002647
<i>guaC</i>	-0.49	9.95	-2.94	0.047341
<i>hcaR</i>	0.72	9.69	5.09	0.000144
<i>hcaT</i>	0.52	9.38	3.37	0.019145
<i>hdeA</i>	-0.38	10.18	-3.02	0.040569
<i>hdhA</i>	0.49	9.87	4.43	0.001181
<i>hemG</i>	-0.42	10.30	-4.49	0.00101
<i>hemM</i>	-0.52	12.04	-4.01	0.003611
<i>hflX</i>	0.51	14.54	3.72	0.008121
<i>hisF</i>	-0.56	11.44	-4.35	0.00146
<i>hslJ</i>	-0.58	10.06	-4.16	0.002552
<i>htrE</i>	0.49	9.33	3.39	0.018583
<i>hupB</i>	1.08	12.67	6.56	8.29E-07
<i>hybC</i>	-0.34	11.40	-3.57	0.01173

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>hyfB</i>	1.27	9.71	4.23	0.002005
<i>hypF</i>	-0.36	12.72	-3.72	0.008121
<i>ileS</i>	-0.40	13.26	-3.06	0.037937
<i>ilvG_1</i>	-0.43	9.98	-3.55	0.012163
<i>ilvN</i>	0.46	9.86	4.01	0.003525
<i>ilvN</i>	0.60	9.86	4.34	0.00146
<i>infA</i>	-0.58	10.48	-3.45	0.016134
<i>insB_2</i>	0.62	10.78	4.60	0.000746
<i>kdul</i>	0.47	10.59	5.05	0.000169
<i>kgtP</i>	0.84	11.39	6.62	6.78E-07
<i>lamB</i>	1.04	11.46	5.72	1.69E-05
<i>livF</i>	-1.22	9.79	-4.95	0.000242
<i>lldP</i>	0.50	9.36	3.21	0.028252
<i>lldR</i>	0.55	10.51	3.80	0.006381
<i>malE</i>	0.97	9.63	4.91	0.000264
<i>malK</i>	1.31	9.65	7.27	4.77E-08
<i>malM</i>	0.65	9.38	3.19	0.029037
<i>malT</i>	1.06	10.69	7.10	8.78E-08
<i>manX</i>	1.23	9.80	7.12	8.40E-08
<i>manY</i>	1.01	11.54	7.30	4.73E-08
<i>map</i>	-0.51	9.20	-3.80	0.006315
<i>menG</i>	1.31	10.25	3.84	0.005687
<i>metA</i>	0.43	9.09	3.77	0.007056
<i>mgIA</i>	0.75	11.02	4.40	0.001286
<i>mgIB</i>	1.04	10.44	7.30	4.73E-08
<i>mhpR</i>	0.64	10.71	4.32	0.001567
<i>modA</i>	0.68	10.39	3.30	0.022699
<i>motA</i>	-0.62	13.37	-4.04	0.003421
<i>mrp</i>	0.57	14.08	4.04	0.003421
<i>msrA</i>	0.41	9.50	2.92	0.048935
<i>mukE</i>	-0.48	12.00	-4.05	0.003378
<i>murl</i>	-0.39	10.46	-3.68	0.008981
<i>nac</i>	0.51	10.26	3.37	0.019145
<i>nadA</i>	-0.41	13.17	-2.96	0.046476
<i>nagE</i>	0.58	15.03	4.10	0.002882
<i>narJ</i>	-0.77	9.45	-3.34	0.020602
<i>nikC</i>	0.34	9.15	3.04	0.039345
<i>nlpD</i>	1.23	12.89	7.31	4.73E-08
<i>nmpC</i>	1.40	11.02	5.42	5.15E-05
<i>nuoA</i>	0.59	10.27	3.10	0.034695
<i>ompT</i>	-0.95	12.42	-6.10	3.94E-06
<i>ompX</i>	-0.60	10.84	-4.93	0.000254
<i>pal</i>	-0.81	9.85	-4.55	0.000824

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>pflA</i>	0.34	11.04	3.19	0.029009
<i>pflB</i>	-0.40	9.05	-2.99	0.043234
<i>pgk</i>	-0.72	11.14	-6.13	3.58E-06
<i>phnC</i>	-0.31	11.79	-3.17	0.030189
<i>prsA</i>	-0.70	9.96	-5.68	1.94E-05
<i>purF</i>	-0.93	8.94	-5.58	2.91E-05
<i>purU</i>	-0.46	9.19	-2.93	0.047704
<i>pyrB</i>	-0.46	12.18	-3.06	0.037744
<i>pyrF</i>	-1.15	8.69	-6.24	2.57E-06
<i>pyrH</i>	-0.83	9.61	-4.88	0.000294
<i>pyrI</i>	-0.68	11.25	-4.14	0.002671
<i>queA</i>	-0.40	10.59	-3.28	0.02369
<i>rbsB</i>	2.17	11.30	9.05	5.12E-11
<i>rfbB</i>	-0.45	10.90	-3.52	0.013303
<i>rhoL</i>	-0.46	11.28	-3.16	0.030439
<i>ribD</i>	-0.62	12.07	-5.72	1.69E-05
<i>rlpB</i>	-0.75	9.20	-3.19	0.028804
<i>rmf</i>	1.43	12.68	7.43	3.56E-08
<i>rpiA</i>	0.36	13.64	2.95	0.046991
<i>rplA</i>	-0.52	11.85	-3.72	0.008034
<i>rplC</i>	-0.40	12.75	-3.63	0.010071
<i>rplE</i>	-0.63	10.68	-3.79	0.006529
<i>rplF</i>	-0.47	10.52	-3.04	0.039117
<i>rplI</i>	-0.43	9.19	-2.91	0.049271
<i>rplK</i>	-0.86	10.44	-6.45	1.18E-06
<i>rplL</i>	-0.56	12.02	-4.10	0.002937
<i>rplM</i>	-0.96	10.56	-4.94	0.000242
<i>rplP</i>	-0.35	12.19	-2.91	0.049273
<i>rplR</i>	-0.81	9.84	-4.74	0.000476
<i>rplW</i>	-0.67	11.43	-4.20	0.002197
<i>rpmE</i>	-0.44	10.25	-3.30	0.022699
<i>rpmF</i>	-0.45	9.53	-3.73	0.007906
<i>rpmJ</i>	-0.46	11.96	-3.65	0.009705
<i>rpoA</i>	-0.42	10.85	-3.21	0.027722
<i>rpoB</i>	-0.52	9.62	-3.03	0.039606
<i>rpoZ</i>	-0.47	11.25	-5.08	0.000153
<i>rpsH</i>	-0.56	11.25	-4.06	0.00308
<i>rpsJ</i>	-0.39	11.88	-3.17	0.030081
<i>rpsM</i>	-0.50	11.23	-3.71	0.00818
<i>rpsN</i>	-0.54	12.72	-4.04	0.003418
<i>rpsP</i>	-0.96	10.69	-6.38	1.51E-06
<i>rpsS</i>	-0.68	10.23	-3.53	0.013106
<i>rpsV</i>	0.66	10.60	4.05	0.003128

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>rspB</i>	0.58	8.78	2.95	0.046798
<i>seqA</i>	-0.99	9.44	-4.34	0.00146
<i>sfmH</i>	0.58	9.81	5.23	9.59E-05
<i>sgcX</i>	0.39	10.55	2.91	0.049273
<i>smf_2</i>	0.44	8.86	3.61	0.010579
<i>smg</i>	0.43	11.72	3.77	0.006902
<i>smpB</i>	-0.47	9.52	-3.97	0.003972
<i>sodA</i>	0.24	13.55	2.99	0.043165
<i>speD</i>	-0.42	10.96	-3.67	0.009255
<i>speE</i>	-0.63	9.57	-3.04	0.039209
<i>srlA</i>	0.76	9.18	5.31	7.47E-05
<i>srlE</i>	0.56	9.25	4.12	0.002774
<i>stpA</i>	-0.40	8.75	-2.92	0.049146
<i>thiF</i>	-0.35	12.65	-2.97	0.045183
<i>thrA</i>	-0.39	13.25	-3.14	0.032162
<i>thrB</i>	-0.73	10.36	-4.58	0.000779
<i>thrC</i>	-1.19	11.72	-8.78	1.33E-10
<i>tig</i>	-0.40	9.49	-3.37	0.01915
<i>tnaA</i>	3.20	10.57	11.79	1.52E-15
<i>topB</i>	-0.56	11.30	-3.40	0.017958
<i>tpiA</i>	-0.40	10.10	-3.27	0.02442
<i>tra5_1</i>	0.38	11.26	2.99	0.043614
<i>treA</i>	-0.36	14.27	-3.91	0.004813
<i>treB</i>	0.52	9.11	2.93	0.047925
<i>trmD</i>	-0.39	12.12	-3.06	0.037744
<i>trpB</i>	-0.73	11.15	-5.11	0.000136
<i>trpC</i>	-0.74	10.66	-5.14	0.000123
<i>trpD</i>	-0.69	9.64	-4.15	0.002563
<i>trs5_1</i>	1.18	12.17	6.23	2.57E-06
<i>trs5_5</i>	0.91	11.93	4.52	0.00093
<i>tufA</i>	-0.46	11.06	-3.31	0.022505
<i>ubiC</i>	0.79	11.54	3.93	0.004507
<i>ugd</i>	0.59	10.33	4.58	0.000782
<i>ugpC</i>	-0.56	12.07	-4.40	0.001286
<i>uidA</i>	-0.42	13.11	-3.13	0.033078
<i>unknown (12A10)</i>	0.41	9.51	3.09	0.034912
<i>unknown (12A4)</i>	0.34	9.56	2.92	0.049213
<i>unknown (12D15)</i>	0.39	8.55	3.30	0.022876
<i>unknown (12D24)</i>	-0.62	13.55	-3.85	0.005648
<i>unknown (12E18)</i>	0.60	9.33	5.36	6.40E-05
<i>unknown (12E6)</i>	0.69	11.80	4.33	0.001515
<i>unknown (12F23)</i>	-0.96	9.90	-4.03	0.003421
<i>unknown (12H17)</i>	-0.56	9.05	-4.03	0.003421

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>unknown (12M5)</i>	-0.66	10.82	-3.28	0.024022
<i>uvrB</i>	0.94	8.78	3.70	0.008579
<i>uxaB</i>	-0.54	13.73	-3.40	0.01811
<i>uxaC</i>	0.53	9.44	3.66	0.00948
<i>wbbH</i>	0.35	10.87	3.03	0.039606
<i>xylF</i>	0.62	9.12	4.39	0.001325
<i>yaal</i>	-0.45	8.69	-4.37	0.001389
<i>yabQ</i>	0.43	9.91	3.12	0.033234
<i>yadF</i>	-0.67	10.83	-4.85	0.00032
<i>yaeT</i>	-0.55	9.71	-2.94	0.047399
<i>yagY</i>	-0.35	12.23	-3.29	0.023264
<i>yahC</i>	0.34	8.73	2.94	0.04763
<i>yahO</i>	0.74	9.69	3.20	0.028804
<i>yaiV</i>	0.94	8.71	4.10	0.002937
<i>yajK</i>	-0.41	9.50	-3.03	0.040158
<i>ybaA</i>	0.28	14.49	2.93	0.048401
<i>ybcM</i>	0.35	8.85	2.98	0.044284
<i>ybcR</i>	0.34	9.54	3.00	0.041973
<i>ybcU</i>	-0.64	8.73	-4.07	0.003229
<i>ybeJ</i>	0.58	9.92	4.12	0.002774
<i>ybeV</i>	0.55	9.73	4.34	0.00146
<i>ybfD</i>	0.63	10.14	4.61	0.000732
<i>ybfH</i>	-0.57	9.77	-3.17	0.029925
<i>ybiC</i>	-0.40	9.73	-2.91	0.049273
<i>ybjD</i>	-0.95	8.86	-4.02	0.003426
<i>ybjZ</i>	0.39	9.31	4.30	0.001661
<i>ycaK</i>	0.41	10.11	3.05	0.038313
<i>ycdU</i>	0.54	9.15	3.65	0.009673
<i>yceI</i>	0.53	10.26	4.00	0.003641
<i>yceK</i>	0.42	9.81	3.04	0.03913
<i>ycfM</i>	0.62	9.56	3.52	0.01353
<i>ycgJ</i>	-0.59	9.92	-2.91	0.049271
<i>ycgR</i>	-0.74	9.78	-4.40	0.001286
<i>yche</i>	0.50	10.72	4.04	0.003417
<i>ychF</i>	-0.52	9.50	-2.98	0.043908
<i>ychH</i>	1.14	9.84	7.33	4.73E-08
<i>ychJ</i>	-0.54	9.32	-3.33	0.021257
<i>ychK</i>	-1.47	9.17	-4.27	0.001764
<i>yciW</i>	-0.68	9.00	-4.16	0.002538
<i>ycjL</i>	0.56	11.28	4.03	0.00339
<i>ycjL</i>	0.77	11.28	5.52	3.54E-05
<i>ycjT</i>	0.33	9.27	3.59	0.010958
<i>ycjW</i>	0.43	11.35	3.11	0.034225

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>ydaA</i>	-0.39	9.78	-3.17	0.029925
<i>ydbD</i>	0.27	14.38	3.19	0.029009
<i>ydbO</i>	0.51	10.11	3.61	0.010663
<i>ydcF</i>	0.58	9.57	4.21	0.002196
<i>ydeB</i>	0.49	12.24	4.36	0.001402
<i>ydgO</i>	0.25	12.05	2.92	0.049008
<i>yeaA</i>	0.69	10.95	4.39	0.001313
<i>yeaD</i>	-0.72	9.17	-5.38	5.95E-05
<i>yebJ</i>	-0.53	10.28	-2.95	0.046807
<i>yebL</i>	-0.54	11.20	-3.40	0.017958
<i>yeeX</i>	-0.52	10.87	-3.31	0.022505
<i>yehE</i>	0.58	9.30	3.83	0.005814
<i>yeiL</i>	0.42	9.12	3.47	0.015308
<i>yeiM</i>	0.36	11.17	2.91	0.049273
<i>yejE</i>	0.59	9.93	3.99	0.003861
<i>yfdM</i>	-0.46	9.58	-3.15	0.031006
<i>yfhJ</i>	-0.77	9.45	-3.60	0.010704
<i>yfiA</i>	0.82	10.70	4.68	0.000585
<i>yfiM</i>	0.26	11.32	3.44	0.016553
<i>yfjA</i>	-0.53	12.79	-3.37	0.019224
<i>yfjJ</i>	0.44	8.96	3.44	0.016553
<i>ygaF</i>	0.42	10.87	3.47	0.015269
<i>ygaH</i>	-0.51	9.50	-3.58	0.011462
<i>ygaM</i>	-0.55	11.33	-3.48	0.015269
<i>ygbM</i>	-0.53	12.90	-4.05	0.00316
<i>ygbM</i>	-0.43	12.90	-3.34	0.020595
<i>ygcE</i>	0.38	8.99	3.19	0.029009
<i>ygcF</i>	0.46	8.71	3.64	0.009843
<i>ygfT</i>	0.36	14.50	3.84	0.005749
<i>yggG</i>	0.90	11.09	5.97	6.58E-06
<i>yggH</i>	-0.46	10.22	-3.63	0.010085
<i>yggR</i>	-0.39	11.45	-3.57	0.011611
<i>yggX</i>	-0.40	12.31	-3.07	0.037128
<i>yghT</i>	0.38	8.33	3.19	0.029009
<i>yglL</i>	0.48	11.47	4.11	0.00263
<i>ygoO</i>	0.55	8.89	2.94	0.047399
<i>yhaH</i>	0.36	11.53	3.20	0.028804
<i>yhaK</i>	0.34	9.55	2.97	0.044912
<i>yhaL</i>	-0.37	14.76	-4.06	0.003274
<i>yhaU</i>	0.38	9.39	2.91	0.049273
<i>yhcR</i>	0.36	9.69	3.27	0.024218
<i>yhdR</i>	0.53	8.77	3.43	0.016974
<i>yhdY</i>	0.41	8.60	3.10	0.034244

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>yhfQ</i>	1.89	9.29	4.40	0.001305
<i>yhgJ</i>	0.43	9.09	3.16	0.030533
<i>yhhX</i>	0.25	15.04	3.63	0.010284
<i>yhiO</i>	0.62	10.22	4.94	0.000242
<i>yhiW</i>	-0.51	10.49	-3.89	0.005134
<i>yhiX</i>	-0.33	9.97	-2.90	0.049757
<i>yiaB</i>	0.33	12.43	2.99	0.043614
<i>yiaV</i>	-0.46	10.26	-3.92	0.004643
<i>yiaY</i>	-0.39	9.70	-2.93	0.047704
<i>yibD</i>	0.43	11.37	4.51	0.000946
<i>yidF</i>	0.38	8.67	2.95	0.047007
<i>yidL</i>	-0.75	9.51	-3.01	0.041832
<i>yihX</i>	0.61	9.18	4.57	0.0008
<i>yiiM</i>	-0.44	12.68	-3.84	0.005749
<i>yijP</i>	-0.43	9.15	-4.11	0.00263
<i>yjbB</i>	0.42	9.96	3.40	0.01811
<i>yjbF</i>	0.39	9.64	2.97	0.044912
<i>yjcG</i>	1.29	9.61	7.01	1.28E-07
<i>yjcH</i>	1.43	10.06	9.67	4.72E-12
<i>yjcP</i>	-0.63	8.72	-3.13	0.03267
<i>yjeJ</i>	0.73	10.82	4.87	0.0003
<i>yjfH</i>	-0.41	13.34	-3.30	0.022699
<i>yjfP</i>	2.22	8.98	4.70	0.000551
<i>yjgB</i>	0.64	10.63	3.08	0.036204
<i>yjhB</i>	0.60	9.28	2.91	0.049273
<i>yjhF</i>	0.91	8.81	6.51	9.77E-07
<i>yjhS</i>	-0.45	9.86	-3.15	0.031006
<i>yjiK</i>	-0.70	14.35	-5.23	9.59E-05
<i>yjiR</i>	0.36	15.42	4.15	0.002563
<i>yjjY</i>	0.41	8.88	3.47	0.015269
<i>ynaE</i>	0.47	9.30	3.90	0.004955
<i>ynaF</i>	0.68	9.08	4.44	0.001175
<i>yohK</i>	0.33	12.27	3.08	0.036156
<i>ypfl</i>	-0.62	10.94	-3.92	0.004625
<i>yphD</i>	0.39	12.05	3.01	0.041507
<i>yqhE</i>	0.35	9.31	3.18	0.029185
<i>yqiB</i>	0.61	11.41	5.75	1.55E-05
<i>yqjB</i>	0.99	10.15	3.86	0.005426
<i>yraK</i>	0.40	9.23	2.95	0.047007
<i>yrdA</i>	-0.38	13.05	-3.44	0.016553
<i>ytfI</i>	0.81	10.04	3.92	0.004671
<i>ytfJ</i>	0.56	11.34	3.83	0.005825
<i>ytfK</i>	0.44	9.29	3.68	0.008903

Tab. 7.3:  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>yzgL</i>	0.44	10.60	4.49	0.000994

**Tab. 7.3:**  
Zeitpunkt T3  
Fortsetzung

**Tab. 7.4: Zeitpunkt T4.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren *M*-, *A*-, *p*- und *t*-Werte, geordnet nach dem Gennamen

T4				
Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>accB</i>	-0.72	11.05	-5.16	8.94E-05
<i>aceA</i>	1.72	11.43	11.64	5.79E-16
<i>aceE</i>	-0.69	9.80	-5.07	0.000125
<i>aceK</i>	0.39	12.49	3.89	0.004827
<i>acrB</i>	-0.49	9.71	-3.32	0.034666
<i>acrB</i>	-0.37	9.71	-3.44	0.016695
<i>acs</i>	0.90	9.22	6.71	2.29E-07
<i>adk</i>	-0.91	10.44	-5.54	2.29E-05
<i>ahpC</i>	0.61	10.40	5.69	1.35E-05
<i>alaS</i>	-0.97	10.98	-7.24	2.86E-08
<i>aldA</i>	1.57	10.59	9.11	1.49E-11
<i>araA</i>	0.42	10.86	3.48	0.015153
<i>araG</i>	0.55	9.09	3.66	0.009097
<i>argI</i>	0.81	10.39	4.51	0.000754
<i>aroA</i>	-0.46	10.56	-3.27	0.027087
<i>aroG</i>	-1.43	11.86	-7.00	7.37E-08
<i>atpA</i>	-0.70	11.34	-6.05	3.29E-06
<i>atpF</i>	-0.46	12.95	-3.96	0.004036
<i>b0380</i>	0.52	11.44	3.10	0.040133
<i>b0753</i>	0.59	10.10	3.89	0.004822
<i>b0834</i>	-0.37	9.53	-3.27	0.026578
<i>b0967</i>	-0.37	10.03	-3.08	0.04168
<i>b1016</i>	-0.37	9.90	-3.11	0.039416
<i>b1057</i>	0.85	9.98	6.62	3.37E-07
<i>b1085</i>	-0.75	8.29	-3.51	0.013926
<i>b1153</i>	-0.30	8.84	-3.11	0.039887
<i>b1297</i>	1.43	9.87	11.85	2.86E-16
<i>b1420</i>	0.62	9.09	3.95	0.004089
<i>b1422</i>	0.44	8.75	3.80	0.006335
<i>b1518</i>	0.71	9.07	6.44	7.07E-07
<i>b1588</i>	1.20	9.60	7.84	2.57E-09
<i>b1690</i>	0.42	9.44	3.43	0.01724
<i>b1720</i>	-0.51	8.55	-3.34	0.022175
<i>b1724</i>	0.54	9.80	5.03	0.000136
<i>b1976</i>	0.85	8.69	3.40	0.028948



Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<i>P.Value</i>
<i>b1976</i>	1.12	8.69	5.47	3.04E-05
<i>b2084</i>	-0.36	8.99	-3.55	0.012945
<i>b2146</i>	0.50	8.96	3.72	0.008033
<i>b2295</i>	0.44	10.04	3.18	0.033896
<i>b2341</i>	1.32	11.69	8.76	6.28E-11
<i>b2351</i>	-1.35	10.58	-7.25	2.76E-08
<i>b2352</i>	-0.76	9.29	-4.70	0.000406
<i>b2430</i>	0.44	9.75	4.31	0.001418
<i>b2460</i>	-0.42	12.70	-3.04	0.045601
<i>b2635</i>	-0.38	12.98	-3.86	0.005198
<i>b2638</i>	0.40	10.10	3.81	0.006063
<i>b2756</i>	-0.47	8.68	-3.19	0.03258
<i>b3022</i>	0.32	9.20	3.01	0.049096
<i>bioF</i>	-0.36	9.64	-3.29	0.025572
<i>carA</i>	-2.01	10.13	-12.48	3.88E-17
<i>carB</i>	-0.53	10.90	-4.49	0.000801
<i>cheR</i>	-0.40	9.67	-3.92	0.004508
<i>clpA</i>	0.37	9.42	4.23	0.001812
<i>cmk</i>	-0.68	10.18	-5.39	3.82E-05
<i>codA</i>	-0.84	10.16	-4.88	0.000233
<i>codB</i>	-1.34	10.77	-8.16	7.79E-10
<i>csiE</i>	0.36	9.90	3.03	0.04708
<i>cspD</i>	1.74	10.30	7.81	2.83E-09
<i>cspE</i>	0.74	9.41	3.35	0.03245
<i>cspE</i>	0.81	9.41	4.26	0.001637
<i>cstA</i>	1.79	11.53	8.56	1.42E-10
<i>cydA</i>	0.63	10.33	5.37	4.04E-05
<i>cydB</i>	0.56	10.03	3.67	0.00903
<i>cydD</i>	-0.47	9.40	-3.63	0.009895
<i>cyoC</i>	-0.46	12.02	-4.57	0.000634
<i>cysC</i>	-0.54	9.41	-5.01	0.000142
<i>cysJ</i>	-0.73	8.98	-3.87	0.005101
<i>dbpA</i>	0.37	11.83	3.49	0.014749
<i>dfp</i>	-0.33	10.19	-3.14	0.037326
<i>dnaB</i>	-0.56	10.46	-4.56	0.000643
<i>dnaX</i>	-0.31	10.56	-3.17	0.03409
<i>eno</i>	-0.47	12.10	-3.09	0.041116
<i>exbB</i>	-0.43	10.33	-3.76	0.006961
<i>exbD</i>	-0.37	9.80	-3.45	0.016413
<i>fabF</i>	0.37	8.69	3.52	0.013704
<i>fadR</i>	0.39	9.62	3.28	0.026289
<i>fhiA</i>	0.47	8.64	5.03	0.000135
<i>fliA</i>	-0.64	11.20	-3.64	0.009847

Tab. 7.4:  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<i>P.Value</i>
<i>flgD</i>	-0.59	12.29	-4.57	0.000634
<i>flgJ</i>	-0.52	10.74	-4.40	0.001094
<i>fliE</i>	-0.84	11.14	-4.70	0.000406
<i>fliS</i>	-0.63	9.34	-5.06	0.000126
<i>fliZ</i>	-0.35	9.77	-3.22	0.030422
<i>ftsA</i>	-0.45	12.18	-3.35	0.03245
<i>ftsZ</i>	-0.44	12.88	-3.02	0.048079
<i>gapA</i>	-0.58	10.57	-4.63	0.000514
<i>gatA</i>	1.52	10.32	7.00	7.37E-08
<i>gatC</i>	0.85	11.23	4.23	0.001795
<i>gatD</i>	1.50	10.31	9.63	1.55E-12
<i>gatY</i>	1.31	11.46	9.30	6.45E-12
<i>gatZ</i>	1.59	13.77	8.15	7.79E-10
<i>gcvH</i>	-0.70	9.46	-6.30	1.23E-06
<i>gcvT</i>	-0.44	9.80	-3.68	0.008805
<i>glcB</i>	0.60	9.02	5.03	0.000135
<i>glcF</i>	1.78	10.32	8.54	1.49E-10
<i>glcG</i>	1.27	11.61	7.46	1.13E-08
<i>glgP</i>	0.46	9.42	4.33	0.001356
<i>glk</i>	0.38	9.63	3.36	0.02117
<i>glnH</i>	1.13	10.86	6.96	8.61E-08
<i>glnP</i>	0.46	10.89	3.89	0.004868
<i>glnQ</i>	0.76	8.73	4.55	0.000662
<i>glpF</i>	0.58	10.25	3.96	0.004019
<i>gltA</i>	1.19	10.52	6.18	1.89E-06
<i>gltB</i>	-1.35	10.04	-8.67	8.98E-11
<i>glyA</i>	-0.48	9.87	-5.20	7.80E-05
<i>gshA</i>	-0.53	11.60	-5.05	0.000132
<i>guaA</i>	-0.54	9.40	-3.54	0.013055
<i>guaC</i>	-0.63	9.95	-4.12	0.00255
<i>hcaR</i>	0.72	9.69	6.06	3.12E-06
<i>hflC</i>	0.41	10.23	3.22	0.030316
<i>himD</i>	0.50	10.13	3.29	0.025838
<i>hisC</i>	-0.41	10.25	-3.02	0.048079
<i>hns</i>	0.63	9.74	4.69	0.000416
<i>hpt</i>	-0.54	9.84	-4.74	0.000362
<i>hslV</i>	-0.40	9.93	-3.49	0.014749
<i>htgA</i>	0.39	9.29	3.12	0.038475
<i>hupB</i>	0.72	12.67	4.36	0.001263
<i>hyfA</i>	0.31	10.58	3.09	0.040789
<i>ilvC</i>	-0.83	10.54	-4.31	0.001442
<i>ilvH</i>	-0.45	11.07	-3.50	0.014149
<i>infA</i>	-0.54	10.48	-3.49	0.014749

Tab. 7.4:  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>kgtP</i>	0.73	11.39	6.30	1.21E-06
<i>lamB</i>	1.41	11.46	7.71	3.91E-09
<i>lrhA</i>	0.31	9.65	3.18	0.033615
<i>lysP</i>	-0.36	10.13	-3.02	0.047725
<i>malE</i>	1.43	9.63	9.72	1.12E-12
<i>malF</i>	0.45	9.50	3.03	0.04708
<i>malK</i>	1.69	9.65	11.28	1.99E-15
<i>malM</i>	1.08	9.38	7.12	4.59E-08
<i>malT</i>	1.27	10.69	10.13	2.16E-13
<i>manX</i>	1.16	9.80	8.02	1.29E-09
<i>manY</i>	0.65	11.54	4.72	0.000392
<i>manZ</i>	0.64	9.09	4.78	0.000318
<i>metE</i>	-0.62	9.79	-3.24	0.028826
<i>metF</i>	-0.42	9.14	-3.22	0.030721
<i>mgIA</i>	0.64	11.02	3.76	0.007089
<i>mgIB</i>	1.40	10.44	10.70	1.86E-14
<i>mgsA</i>	0.32	9.25	3.73	0.007806
<i>mhpR</i>	0.72	10.71	4.84	0.000251
<i>minD</i>	0.53	9.37	3.50	0.014348
<i>mioC</i>	-0.39	10.43	-3.18	0.033838
<i>modA</i>	0.68	10.39	3.29	0.025504
<i>modB</i>	0.64	9.47	3.95	0.004139
<i>mutH</i>	0.48	11.07	3.02	0.047725
<i>nlpD</i>	1.12	12.89	6.61	3.42E-07
<i>nmpC</i>	1.12	11.02	4.70	0.000403
<i>nuoA</i>	0.73	10.27	4.56	0.000646
<i>nuoF</i>	0.53	10.52	3.71	0.008213
<i>nusG</i>	-0.45	11.56	-3.30	0.036721
<i>nusG</i>	-0.40	11.56	-3.54	0.013055
<i>ompT</i>	-1.25	12.42	-8.05	1.17E-09
<i>oxyR</i>	-0.31	9.74	-3.53	0.01348
<i>pabC</i>	-1.26	8.46	-6.36	9.68E-07
<i>pfkA</i>	-0.80	8.70	-3.47	0.015414
<i>pfkB</i>	0.48	9.18	3.52	0.01383
<i>pflC</i>	-0.61	12.66	-3.69	0.008542
<i>pgk</i>	-0.75	11.14	-6.93	9.51E-08
<i>pntA</i>	-0.44	11.08	-3.20	0.032295
<i>prfB</i>	-0.55	10.40	-3.88	0.00487
<i>priB</i>	-0.64	11.85	-4.42	0.00103
<i>priA</i>	-0.76	11.78	-5.45	3.25E-05
<i>purE</i>	-0.41	9.72	-3.51	0.013959
<i>purF</i>	-0.75	8.94	-5.57	2.09E-05
<i>purU</i>	-0.63	9.19	-5.39	3.87E-05

Tab. 7.4:  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>pykF</i>	-0.46	10.66	-3.63	0.009934
<i>pyrB</i>	-0.65	12.18	-4.33	0.001356
<i>pyrC</i>	-0.45	9.63	-3.77	0.006867
<i>pyrF</i>	-0.66	8.69	-3.09	0.040789
<i>pyrG</i>	-0.73	10.45	-3.35	0.032215
<i>pyrG</i>	-0.50	10.45	-3.24	0.0287
<i>pyrH</i>	-0.84	9.61	-5.91	5.71E-06
<i>pyrI</i>	-1.31	11.25	-7.98	1.51E-09
<i>queA</i>	-0.57	10.59	-4.72	0.000392
<i>rbn</i>	0.33	11.65	3.47	0.015153
<i>rbsB</i>	1.94	11.30	8.76	6.28E-11
<i>recF</i>	-0.45	9.89	-4.25	0.00173
<i>recJ</i>	-0.54	9.23	-3.47	0.015153
<i>rfaL</i>	-0.43	9.87	-3.86	0.00516
<i>rfaA</i>	-0.47	9.96	-3.27	0.027018
<i>rfaB</i>	-0.54	10.90	-4.23	0.001798
<i>rfaD</i>	-0.63	10.25	-3.95	0.004089
<i>rfaX</i>	-0.76	10.10	-5.21	7.52E-05
<i>rhaT</i>	-0.45	10.44	-4.27	0.001633
<i>ribA</i>	-0.63	8.63	-3.91	0.004602
<i>rmf</i>	1.49	12.68	7.73	3.65E-09
<i>rnc</i>	-0.46	10.06	-3.36	0.031725
<i>rplA</i>	-0.87	11.85	-6.24	1.52E-06
<i>rplC</i>	-0.43	12.75	-3.94	0.00416
<i>rplE</i>	-0.78	10.68	-5.19	8.00E-05
<i>rplF</i>	-0.66	10.52	-4.70	0.000403
<i>rplI</i>	-0.65	9.19	-4.34	0.001323
<i>rplK</i>	-0.76	10.44	-6.85	1.29E-07
<i>rplL</i>	-0.51	12.02	-3.73	0.007714
<i>rplM</i>	-0.70	10.56	-4.85	0.000251
<i>rplP</i>	-0.44	12.19	-3.70	0.008414
<i>rplR</i>	-0.44	9.84	-3.05	0.044734
<i>rplV</i>	-0.45	11.57	-3.71	0.008213
<i>rplW</i>	-0.85	11.43	-5.81	8.40E-06
<i>rpmB</i>	-0.77	10.64	-4.86	0.000242
<i>rpmD</i>	-0.64	11.09	-4.80	0.000294
<i>rpmH</i>	-0.45	11.69	-3.07	0.043345
<i>rpmJ</i>	-0.63	11.96	-5.00	0.000146
<i>rpoA</i>	-0.46	10.85	-3.83	0.005794
<i>rpoE</i>	0.65	9.94	4.14	0.002416
<i>rpsD</i>	-0.83	12.96	-4.96	0.000172
<i>rpsG</i>	-0.70	11.73	-5.42	3.57E-05
<i>rpsJ</i>	-0.96	11.88	-7.94	1.72E-09

Tab. 7.4:  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<b>P.Value</b>
<i>rpsK</i>	-0.79	11.73	-4.84	0.000251
<i>rpsL</i>	-0.52	12.09	-4.19	0.002022
<i>rpsM</i>	-0.96	11.23	-7.80	2.83E-09
<i>rpsN</i>	-0.68	12.72	-5.11	0.000106
<i>rpsP</i>	-0.88	10.69	-7.05	6.30E-08
<i>rpsS</i>	-0.85	10.23	-5.30	5.30E-05
<i>sbcD</i>	-0.37	12.40	-3.88	0.00487
<i>sbmC</i>	0.43	13.07	3.36	0.031725
<i>sdhB</i>	0.38	9.69	3.12	0.038662
<i>serA</i>	-0.38	9.72	-3.67	0.009036
<i>serS</i>	-0.38	11.36	-3.40	0.01884
<i>sfmH</i>	0.44	9.81	4.25	0.001717
<i>sgcQ</i>	0.42	11.82	3.53	0.013298
<i>sgcX</i>	0.48	10.55	3.68	0.008805
<i>slyB</i>	-0.66	11.71	-3.02	0.048105
<i>speB</i>	-0.32	9.39	-3.41	0.01834
<i>speE</i>	-0.58	9.57	-3.75	0.007211
<i>srlA</i>	0.34	9.18	3.15	0.036375
<i>srlR</i>	0.32	9.22	4.11	0.002615
<i>thrB</i>	-0.92	10.36	-6.92	9.91E-08
<i>thrC</i>	-1.64	11.72	-12.10	1.31E-16
<i>tnaA</i>	2.82	10.57	11.34	1.81E-15
<i>trmD</i>	-0.79	12.12	-6.29	1.23E-06
<i>trpB</i>	-0.77	11.15	-5.88	6.48E-06
<i>trpC</i>	-0.69	10.66	-5.21	7.52E-05
<i>trpE</i>	-0.55	10.20	-4.62	0.000526
<i>truB</i>	-0.31	9.88	-3.14	0.037326
<i>tufA</i>	-0.40	11.06	-3.11	0.039887
<i>ubiC</i>	0.75	11.54	3.28	0.03963
<i>ubiC</i>	1.06	11.54	5.69	1.35E-05
<i>udp</i>	0.39	9.86	3.51	0.013855
<i>ugd</i>	0.61	10.33	5.64	1.58E-05
<i>unknown (12A18)</i>	0.48	10.89	3.38	0.029956
<i>unknown (12C17)</i>	0.64	10.71	4.19	0.002027
<i>unknown (12E23)</i>	0.34	9.51	3.09	0.041116
<i>unknown (12E24)</i>	0.79	9.50	5.50	2.68E-05
<i>unknown (12E6)</i>	0.74	11.80	5.04	0.000133
<i>unknown (12H17)</i>	-0.76	9.05	-4.54	0.000682
<i>unknown (12H24)</i>	0.46	10.68	3.31	0.023986
<i>uxaC</i>	0.42	9.44	3.95	0.004139
<i>wbbJ</i>	-0.80	9.78	-4.95	0.000175
<i>wcaJ</i>	0.32	9.62	3.26	0.027704
<i>wzzE</i>	0.43	8.63	3.17	0.034104

**Tab. 7.4:**  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>xerC</i>	-0.53	9.24	-3.43	0.026445
<i>xyIF</i>	0.83	9.12	7.93	1.79E-09
<i>yaaA</i>	-0.25	9.12	-3.10	0.04002
<i>yabH</i>	-0.57	9.33	-3.44	0.025604
<i>yadF</i>	-0.62	10.83	-4.86	0.000244
<i>yadK</i>	-0.36	8.64	-3.21	0.030839
<i>yadT</i>	-0.69	8.23	-4.39	0.001136
<i>yahO</i>	0.74	9.69	4.28	0.00156
<i>ybeJ</i>	0.62	9.92	5.22	7.40E-05
<i>ybeK</i>	0.58	10.15	4.71	0.000401
<i>ybfD</i>	-0.37	10.14	-3.21	0.030721
<i>ybgL</i>	0.67	9.74	5.04	0.000133
<i>ybjX</i>	-0.34	9.62	-3.34	0.022175
<i>ycfC</i>	-0.60	10.89	-3.90	0.004635
<i>ycfL</i>	0.39	9.62	3.11	0.039887
<i>ycgN</i>	0.50	9.79	4.48	0.000813
<i>ychH</i>	1.28	9.84	9.81	8.23E-13
<i>yciW</i>	-0.58	9.00	-3.94	0.004249
<i>ydaA</i>	-0.37	9.78	-3.34	0.022175
<i>ydaO</i>	-0.35	8.99	-3.03	0.047708
<i>ycdF</i>	0.46	9.57	4.50	0.000765
<i>ycdH</i>	0.38	9.51	3.01	0.049482
<i>yeaA</i>	0.64	10.95	4.87	0.000238
<i>yeaD</i>	-0.48	9.17	-4.49	0.000788
<i>yeaG</i>	0.47	9.15	3.92	0.004523
<i>yebI</i>	0.33	9.58	3.04	0.045958
<i>yebL</i>	-0.71	11.20	-4.86	0.000242
<i>yedU</i>	0.51	10.34	3.15	0.036394
<i>yeiC</i>	0.63	9.73	5.99	4.16E-06
<i>yfbB</i>	-0.32	9.21	-3.43	0.01724
<i>yfiA</i>	1.06	10.70	7.20	3.34E-08
<i>yfiQ</i>	0.54	9.57	4.35	0.001281
<i>yfiJ</i>	-0.88	12.79	-5.64	1.58E-05
<i>ygaF</i>	0.44	10.87	3.69	0.008594
<i>ygcA</i>	0.32	10.36	3.56	0.012334
<i>ygcA</i>	0.36	10.36	3.26	0.041381
<i>yggG</i>	0.64	11.09	4.64	0.000504
<i>yggH</i>	-0.40	10.22	-3.77	0.00692
<i>yggL</i>	-0.59	11.56	-4.19	0.002022
<i>ygiX</i>	-0.41	10.11	-4.11	0.00263
<i>ygjO</i>	0.60	8.89	3.65	0.00958
<i>yhaF</i>	0.38	9.97	3.15	0.035828
<i>yhbG</i>	-0.34	9.65	-3.08	0.041858

Tab. 7.4:  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<b>P.Value</b>
<i>yhbV</i>	-0.40	10.00	-3.70	0.008414
<i>yheT</i>	0.34	10.89	3.55	0.012671
<i>yhhA</i>	-0.45	10.79	-4.19	0.002041
<i>yhjE</i>	-0.49	10.05	-4.35	0.001281
<i>yicG</i>	-0.30	8.90	-3.05	0.044742
<i>yihE</i>	-0.65	9.94	-5.69	1.35E-05
<i>yihX</i>	0.41	9.18	3.54	0.013055
<i>yihX</i>	0.46	9.18	3.35	0.03245
<i>yiiD</i>	0.45	10.36	3.25	0.027839
<i>yjcG</i>	1.65	9.61	10.78	1.57E-14
<i>yjcH</i>	1.61	10.06	12.99	8.74E-18
<i>yjdH</i>	0.44	9.74	3.77	0.006918
<i>yjeJ</i>	0.75	10.82	5.41	3.68E-05
<i>yjfO</i>	0.65	10.53	4.27	0.001633
<i>yjhP</i>	0.35	8.92	3.06	0.044508
<i>ymcA</i>	-0.54	8.95	-3.23	0.029574
<i>ynaF</i>	0.89	9.08	7.79	2.83E-09
<i>yojI</i>	-0.28	10.52	-3.09	0.040789
<i>ypjA</i>	-0.39	8.80	-3.14	0.037326
<i>yqiB</i>	0.38	11.41	3.62	0.010404
<i>yrfF</i>	0.82	9.54	6.38	9.02E-07
<i>ytfJ</i>	0.45	11.34	3.08	0.04168

**Tab. 7.4:**  
Zeitpunkt T4  
Fortsetzung

**Tab. 7.5: Zeitpunkt T5.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren *M*-, *A*-, *p*- und *t*-Werte, geordnet nach dem Gennamen

<b>T5</b>				
Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<b>P.Value</b>
<i>accB</i>	-1.25	11.05	-6.43	1.50E-06
<i>aceA</i>	1.60	11.43	7.79	6.74E-09
<i>aceB</i>	0.74	12.84	3.77	0.007929
<i>aceB</i>	0.81	12.84	4.14	0.003576
<i>aceE</i>	-0.74	9.80	-3.90	0.007416
<i>aceF</i>	1.21	9.66	3.56	0.019195
<i>acs</i>	1.11	9.22	6.03	6.47E-06
<i>adk</i>	-0.97	10.44	-4.24	0.002562
<i>agaS</i>	0.47	8.84	3.80	0.007266
<i>alaS</i>	-1.11	10.98	-6.70	4.90E-07
<i>aldA</i>	1.55	10.59	7.31	4.69E-08
<i>argB</i>	-1.01	11.12	-5.26	9.46E-05
<i>argC</i>	-0.48	12.18	-3.20	0.046532
<i>aroG</i>	-2.57	11.86	-10.24	7.83E-13

<b>Gen</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>t</b>	<b>P.Value</b>
<i>atpA</i>	-0.82	11.34	-5.09	0.000158
<i>atpE</i>	-0.51	13.77	-3.49	0.022665
<i>atpF</i>	-0.86	12.95	-5.99	7.18E-06
<i>atpH</i>	-0.81	11.15	-6.39	1.58E-06
<i>b1057</i>	0.62	9.98	3.47	0.023737
<i>b1297</i>	0.87	9.87	5.15	0.000133
<i>b1420</i>	0.94	9.09	5.21	0.000105
<i>b1518</i>	0.80	9.07	5.20	0.000107
<i>b1588</i>	0.75	9.60	3.49	0.022665
<i>b1667</i>	0.73	10.32	3.96	0.00618
<i>b1724</i>	0.53	9.80	3.54	0.019794
<i>b1820</i>	-0.54	13.45	-3.80	0.007266
<i>b2341</i>	1.10	11.69	5.96	7.83E-06
<i>b2351</i>	-1.23	10.58	-4.77	0.000477
<i>b2351</i>	-0.87	10.58	-3.82	0.006977
<i>b2352</i>	-0.79	9.29	-3.80	0.010136
<i>b2859</i>	0.55	8.74	3.81	0.007165
<i>bax</i>	0.85	9.86	4.44	0.001379
<i>carA</i>	-2.29	10.13	-10.22	7.83E-13
<i>carB</i>	-0.54	10.90	-3.74	0.011866
<i>cmk</i>	-0.77	10.18	-4.40	0.001531
<i>codA</i>	-0.86	10.16	-3.62	0.017175
<i>codB</i>	-1.23	10.77	-5.37	6.30E-05
<i>cspD</i>	1.75	10.30	6.42	1.50E-06
<i>cstA</i>	2.07	11.53	8.10	1.92E-09
<i>cyoB</i>	-0.72	12.11	-4.76	0.000485
<i>cyoC</i>	-0.73	12.02	-5.96	7.83E-06
<i>cysJ</i>	-1.06	8.98	-5.47	4.61E-05
<i>dapB</i>	-0.73	9.39	-4.51	0.001063
<i>dnaB</i>	-0.78	10.46	-4.56	0.000909
<i>dppD</i>	-0.59	10.18	-3.20	0.046532
<i>eno</i>	-1.03	12.10	-5.52	3.93E-05
<i>fba</i>	-0.55	11.43	-3.49	0.022665
<i>fldA</i>	-0.76	11.20	-3.51	0.022151
<i>fusA</i>	-0.64	13.98	-5.00	0.000211
<i>gatA</i>	1.65	10.32	5.46	4.87E-05
<i>gatD</i>	1.40	10.31	7.35	4.12E-08
<i>gatY</i>	1.07	11.46	6.20	3.35E-06
<i>gatZ</i>	1.08	13.77	4.53	0.001007
<i>gcvH</i>	-0.79	9.46	-5.09	0.000158
<i>gcvT</i>	-0.54	9.80	-3.24	0.042662
<i>glcF</i>	1.35	10.32	4.64	0.000718
<i>glcG</i>	0.78	11.61	3.75	0.011732
<i>glnH</i>	1.16	10.86	5.88	1.05E-05
<i>glnP</i>	0.53	10.89	3.68	0.014325

**Tab. 7.5:**  
Zeitpunkt T5  
Fortsetzung



Gen	M	A	t	P.Value
<i>glpF</i>	0.82	10.25	4.06	0.004677
<i>gltB</i>	-1.79	10.04	-8.32	8.58E-10
<i>glyA</i>	-0.40	9.87	-3.18	0.048385
<i>gnd</i>	-0.58	11.28	-3.67	0.014633
<i>gshA</i>	-0.78	11.60	-6.11	4.62E-06
<i>guaB</i>	-0.85	9.16	-5.01	0.0002
<i>guaC</i>	-0.87	9.95	-4.09	0.004236
<i>hcaR</i>	0.63	9.69	3.81	0.009828
<i>hemL</i>	1.45	9.57	3.80	0.007263
<i>hha</i>	-0.53	9.66	-3.19	0.048385
<i>ilvC</i>	-1.03	10.54	-3.79	0.010358
<i>kgpP</i>	0.80	11.39	5.60	2.88E-05
<i>lig</i>	0.52	11.48	3.20	0.046532
<i>malK</i>	0.86	9.65	3.49	0.022665
<i>malT</i>	0.72	10.69	4.16	0.00345
<i>manX</i>	0.65	9.80	3.24	0.042789
<i>metE</i>	-1.07	9.79	-4.00	0.00553
<i>mgIB</i>	1.16	10.44	6.36	1.71E-06
<i>nlpD</i>	0.89	12.89	4.29	0.002276
<i>nrdF</i>	0.64	10.73	3.23	0.043322
<i>ompT</i>	-0.89	12.42	-4.66	0.000699
<i>pflC</i>	-0.73	12.66	-3.61	0.017175
<i>pgk</i>	-0.87	11.14	-6.58	8.08E-07
<i>pheS</i>	-0.64	9.62	-3.59	0.017986
<i>pntA</i>	-0.66	11.08	-3.95	0.006435
<i>prfB</i>	-1.07	10.40	-5.42	5.50E-05
<i>priB</i>	-1.00	11.85	-5.62	2.69E-05
<i>purF</i>	-0.75	8.94	-4.32	0.002042
<i>pyrB</i>	-0.69	12.18	-3.77	0.007858
<i>pyrB</i>	-0.68	12.18	-3.72	0.012845
<i>pyrF</i>	-0.86	8.69	-3.79	0.007439
<i>pyrH</i>	-0.97	9.61	-4.86	0.000342
<i>pyrI</i>	-0.72	11.25	-3.57	0.01876
<i>rbn</i>	0.45	11.65	3.85	0.006356
<i>rbsB</i>	2.29	11.30	8.38	7.03E-10
<i>rfal</i>	-0.63	10.19	-3.26	0.041748
<i>rfbB</i>	-0.73	10.90	-4.14	0.00362
<i>rfbX</i>	-1.08	10.10	-5.35	6.89E-05
<i>rffG</i>	-0.37	11.12	-3.18	0.048385
<i>rhaT</i>	-0.71	10.44	-4.80	0.000438
<i>ribH</i>	0.69	10.79	3.83	0.006938
<i>rmf</i>	1.67	12.68	7.09	1.08E-07
<i>rplA</i>	-1.38	11.85	-8.06	2.06E-09
<i>rplC</i>	-0.54	12.75	-4.03	0.005096
<i>rplE</i>	-0.79	10.68	-3.75	0.011557

Tab. 7.5:  
Zeitpunkt T5  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>rplF</i>	-0.84	10.52	-4.27	0.002354
<i>rplK</i>	-0.88	10.44	-5.67	2.29E-05
<i>rplL</i>	-1.13	12.02	-6.76	4.07E-07
<i>rplM</i>	-0.95	10.56	-4.77	0.00048
<i>rplM</i>	-0.67	10.56	-3.77	0.007858
<i>rplN</i>	-0.75	11.21	-4.00	0.005474
<i>rplP</i>	-0.77	12.19	-5.22	0.000103
<i>rplR</i>	-0.94	9.84	-4.72	0.000547
<i>rplS</i>	-0.87	8.48	-3.79	0.010462
<i>rplV</i>	-0.52	11.57	-3.54	0.019794
<i>rplW</i>	-1.47	11.43	-7.19	7.53E-08
<i>rplX</i>	-0.79	12.29	-5.66	2.32E-05
<i>rpmB</i>	-0.89	10.64	-4.04	0.004952
<i>rpmB</i>	-0.74	10.64	-3.82	0.00697
<i>rpmC</i>	-0.86	12.89	-4.25	0.002486
<i>rpmD</i>	-0.94	11.09	-5.82	1.24E-05
<i>rpmE</i>	-0.56	10.25	-3.24	0.042662
<i>rpmH</i>	-0.82	11.69	-4.62	0.000753
<i>rpmJ</i>	-0.57	11.96	-3.66	0.015308
<i>rpoA</i>	-0.75	10.85	-5.02	0.000195
<i>rpoE</i>	0.79	9.94	3.61	0.017253
<i>rpoZ</i>	-0.51	11.25	-4.44	0.001353
<i>rpsB</i>	-0.90	11.42	-3.54	0.019794
<i>rpsD</i>	-1.31	12.96	-6.41	1.50E-06
<i>rpsE</i>	-0.80	11.92	-4.58	0.00085
<i>rpsF</i>	-0.71	12.03	-3.61	0.017175
<i>rpsG</i>	-0.94	11.73	-5.97	7.74E-06
<i>rpsH</i>	-0.65	11.25	-3.84	0.009069
<i>rpsJ</i>	-1.47	11.88	-8.72	1.70E-10
<i>rpsK</i>	-1.08	11.73	-5.34	6.93E-05
<i>rpsL</i>	-0.93	12.09	-6.18	3.61E-06
<i>rpsM</i>	-1.24	11.23	-8.23	1.13E-09
<i>rpsN</i>	-0.80	12.72	-4.88	0.000333
<i>rpsP</i>	-1.04	10.69	-5.87	1.05E-05
<i>rpsS</i>	-1.21	10.23	-5.40	5.85E-05
<i>rpsV</i>	1.15	10.60	5.09	0.000158
<i>sgcX</i>	0.59	10.55	3.22	0.044791
<i>slyB</i>	-0.92	11.71	-3.45	0.025303
<i>speE</i>	-0.92	9.57	-4.27	0.002354
<i>thrB</i>	-0.93	10.36	-5.03	0.000195
<i>thrC</i>	-1.65	11.72	-9.97	1.63E-12
<i>tnaA</i>	2.79	10.57	9.18	2.88E-11
<i>tolB</i>	-0.57	10.88	-3.21	0.046216
<i>trmD</i>	-1.09	12.12	-7.09	1.08E-07
<i>trpB</i>	-1.48	11.15	-9.19	2.88E-11

Tab. 7.5:  
Zeitpunkt T5  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>trpC</i>	-1.13	10.66	-6.98	1.67E-07
<i>trpD</i>	-0.78	9.64	-4.59	0.000832
<i>trpE</i>	-0.77	10.20	-4.63	0.000748
<i>ugd</i>	0.53	10.33	3.54	0.019794
<i>unknown (12H17)</i>	-0.63	9.05	-3.68	0.014325
<i>unknown (12I8)</i>	0.59	9.96	3.86	0.006355
<i>yadF</i>	-0.63	10.83	-3.56	0.019143
<i>yagN</i>	0.85	9.46	3.25	0.041761
<i>yahO</i>	1.10	9.69	4.61	0.000772
<i>yajK</i>	-0.56	9.50	-4.01	0.005359
<i>ybeT</i>	-0.92	9.04	-4.20	0.003013
<i>ybeZ</i>	1.40	8.58	5.23	0.000103
<i>ycaN</i>	1.25	8.59	4.41	0.001498
<i>ychH</i>	1.25	9.84	6.85	2.77E-07
<i>yeaD</i>	-0.70	9.17	-5.13	0.000142
<i>yeiC</i>	0.60	9.73	4.14	0.003576
<i>yfiA</i>	0.73	10.70	3.59	0.017932
<i>yggG</i>	0.66	11.09	3.89	0.007675
<i>yggH</i>	-0.52	10.22	-3.55	0.019752
<i>ygjO</i>	0.67	8.89	3.45	0.024821
<i>yhbV</i>	-0.59	10.00	-3.91	0.007311
<i>yihE</i>	-0.57	9.94	-3.58	0.018626
<i>yihX</i>	0.46	9.18	3.82	0.007092
<i>yjaB</i>	0.43	13.10	3.48	0.022665
<i>yjcG</i>	1.24	9.61	5.83	1.24E-05
<i>yjcH</i>	1.30	10.06	7.56	1.72E-08
<i>yjeJ</i>	0.64	10.82	3.76	0.011557
<i>yjgH</i>	0.55	12.11	3.49	0.022665
<i>ymgC</i>	0.53	8.78	3.86	0.006355
<i>ynaF</i>	0.83	9.08	5.22	0.000103
<i>yqjE</i>	-0.45	9.01	-3.57	0.019012
<i>yrbH</i>	-0.58	10.89	-4.74	0.000518
<i>yrbI</i>	-0.59	10.52	-4.62	0.000753
<i>yrbK</i>	-0.66	11.09	-4.65	0.000699
<i>yrbK</i>	-0.54	11.09	-3.80	0.007266
<i>ytfJ</i>	0.58	11.34	3.24	0.042915

Tab. 7.5:  
Zeitpunkt T5  
Fortsetzung

**Tab. 7.6: Zeitpunkt T6.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren M-, A-, p- und t-Werte, geordnet nach dem Gennamen

<b>T6</b>				
<b>Gen</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>t</b>	<b>P.Value</b>
<i>accB</i>	-0.98	11.05	-5.77	1.44E-05
<i>aceA</i>	1.35	11.43	7.49	1.71E-08
<i>aceE</i>	-0.56	9.80	-3.32	0.02247
<i>acpD</i>	-0.48	9.08	-3.27	0.024812
<i>acs</i>	0.49	9.22	3.01	0.042385
<i>adk</i>	-0.75	10.44	-3.73	0.00875
<i>alaS</i>	-1.28	10.98	-7.81	4.96E-09
<i>aldA</i>	1.46	10.59	6.90	1.46E-07
<i>argB</i>	-0.78	11.12	-4.05	0.003757
<i>argC</i>	-0.45	12.18	-3.03	0.040747
<i>argG</i>	0.56	8.71	4.34	0.001584
<i>aroB</i>	-0.53	10.38	-3.43	0.017534
<i>aroG</i>	-1.83	11.86	-7.28	3.18E-08
<i>aroP</i>	0.37	12.89	3.21	0.028785
<i>atpA</i>	-0.94	11.34	-6.68	3.68E-07
<i>atpE</i>	-0.48	13.77	-3.28	0.024812
<i>atpF</i>	-1.06	12.95	-7.40	2.26E-08
<i>atpG</i>	-0.57	10.34	-3.50	0.015174
<i>atpH</i>	-1.04	11.15	-8.18	1.47E-09
<i>b0245</i>	0.51	9.66	2.98	0.045476
<i>b0359</i>	0.41	9.12	3.22	0.028403
<i>b0844</i>	0.41	9.51	3.36	0.020674
<i>b1052</i>	-0.47	8.70	-3.24	0.027278
<i>b1171</i>	-0.45	8.64	-3.46	0.016673
<i>b1240</i>	0.87	11.67	5.55	2.99E-05
<i>b1354</i>	0.68	8.68	3.62	0.01139
<i>b1399</i>	0.47	11.50	3.90	0.005914
<i>b1420</i>	0.66	9.09	4.12	0.003153
<i>b1445</i>	-0.52	9.58	-3.55	0.013816
<i>b1518</i>	0.56	9.07	3.65	0.010728
<i>b1631</i>	0.36	9.16	3.14	0.032356
<i>b1673</i>	-0.45	8.79	-3.00	0.043199
<i>b1722</i>	0.77	8.97	4.11	0.003173
<i>b1811</i>	0.46	9.61	3.19	0.030022
<i>b1821</i>	0.68	8.90	4.18	0.002628
<i>b1828</i>	0.68	11.07	3.18	0.030022
<i>b1843</i>	-0.51	13.24	-2.96	0.047137
<i>b1965</i>	0.62	9.98	3.54	0.013816

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>b2060</i>	0.62	10.14	3.91	0.005821
<i>b2073</i>	-0.50	12.67	-3.05	0.039384
<i>b2074</i>	0.68	10.90	3.89	0.005914
<i>b2086</i>	0.40	9.93	3.64	0.010812
<i>b2099</i>	0.47	10.98	2.96	0.046857
<i>b2227</i>	0.51	8.75	3.06	0.038471
<i>b2294</i>	-0.62	9.60	-4.18	0.00262
<i>b2341</i>	0.85	11.69	4.63	0.000692
<i>b2354</i>	-0.53	10.61	-3.54	0.013874
<i>b2460</i>	-0.79	12.70	-4.70	0.000553
<i>b2503</i>	-0.47	8.34	-2.96	0.047007
<i>b2603</i>	-0.42	11.07	-3.07	0.037692
<i>b2657</i>	0.55	8.39	3.55	0.013653
<i>b2689</i>	-0.44	10.08	-3.48	0.015883
<i>b2736</i>	0.49	9.32	4.26	0.00205
<i>b2832</i>	0.59	8.52	3.18	0.030022
<i>b2981</i>	-0.39	8.69	-3.06	0.038475
<i>b3836</i>	-0.38	13.56	-3.01	0.043021
<i>b4285</i>	0.30	12.37	3.10	0.03501
<i>caiC</i>	-0.83	8.51	-5.09	0.000146
<i>carA</i>	-1.54	10.13	-7.82	4.96E-09
<i>chaC</i>	0.47	9.21	3.41	0.018397
<i>clpX</i>	-0.69	9.26	-4.82	0.000373
<i>cmk</i>	-0.85	10.18	-5.53	3.16E-05
<i>codB</i>	-0.74	10.77	-3.70	0.009428
<i>crcA</i>	0.55	8.55	3.18	0.030022
<i>cspD</i>	1.69	10.30	6.21	2.48E-06
<i>cspE</i>	0.69	9.41	3.54	0.013816
<i>cspF</i>	0.69	10.77	3.37	0.020384
<i>csrA</i>	-0.49	9.74	-2.99	0.044013
<i>cstA</i>	1.89	11.53	7.37	2.32E-08
<i>cyoC</i>	-1.02	12.02	-8.30	9.42E-10
<i>cyoD</i>	-0.74	11.56	-4.02	0.004019
<i>cysB</i>	0.37	9.19	3.20	0.02956
<i>cysD</i>	-0.45	12.76	-3.52	0.014764
<i>cysJ</i>	-0.72	8.98	-3.13	0.032496
<i>cysW</i>	-0.41	10.90	-3.18	0.030022
<i>dadA</i>	0.47	12.07	3.17	0.030472
<i>dapF</i>	-0.49	10.23	-3.51	0.01502
<i>dctA</i>	0.40	11.68	3.18	0.030022
<i>deoA</i>	0.51	10.94	3.18	0.030022
<i>deoC</i>	0.47	9.84	3.06	0.038442
<i>dnaB</i>	-0.81	10.46	-5.41	4.81E-05

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>eno</i>	-0.61	12.10	-3.24	0.027209
<i>entB</i>	-0.40	9.83	-3.13	0.032496
<i>fabG</i>	-0.74	11.60	-3.44	0.017113
<i>fabZ</i>	-0.57	13.52	-3.33	0.021852
<i>fimA</i>	-1.02	10.79	-5.09	0.000146
<i>fixA</i>	0.97	8.72	5.31	6.79E-05
<i>fldA</i>	-1.06	11.20	-4.89	0.000295
<i>flgC</i>	-0.63	11.83	-3.21	0.028785
<i>flgD</i>	-0.54	12.29	-3.37	0.020124
<i>fliZ</i>	-0.56	9.77	-4.20	0.002461
<i>folC</i>	-0.75	13.93	-4.14	0.002926
<i>ftn</i>	-0.41	9.96	-3.51	0.015042
<i>fusA</i>	-0.60	13.98	-4.69	0.000574
<i>gatA</i>	1.19	10.32	4.49	0.001068
<i>gatC</i>	0.73	11.23	2.98	0.045476
<i>gatD</i>	1.09	10.31	5.73	1.60E-05
<i>gatY</i>	1.06	11.46	6.13	3.24E-06
<i>gatZ</i>	1.48	13.77	6.20	2.57E-06
<i>gcd</i>	0.69	10.70	5.53	3.17E-05
<i>gcvH</i>	-0.57	9.46	-3.68	0.009969
<i>gcvT</i>	-0.70	9.80	-4.78	0.000436
<i>glcF</i>	0.92	10.32	3.58	0.012666
<i>glgA</i>	-0.65	10.26	-4.43	0.001254
<i>glnH</i>	0.92	10.86	4.67	0.000604
<i>gltA</i>	0.71	10.52	2.99	0.044013
<i>gltB</i>	-1.49	10.04	-7.85	4.65E-09
<i>gmk</i>	-0.47	10.33	-3.03	0.040747
<i>gpmB</i>	0.43	9.33	3.09	0.035773
<i>gshA</i>	-0.90	11.60	-7.00	9.73E-08
<i>guaB</i>	-0.65	9.16	-4.37	0.001434
<i>guaC</i>	-0.68	9.95	-3.61	0.011608
<i>hflK</i>	-0.52	12.70	-3.46	0.01668
<i>hisF</i>	-0.93	11.44	-5.83	1.12E-05
<i>hns</i>	1.21	9.74	5.45	4.23E-05
<i>holC</i>	-0.59	10.57	-4.74	0.000493
<i>htrE</i>	0.49	9.33	3.30	0.02364
<i>hydH</i>	-0.59	8.79	-3.48	0.015883
<i>icdA</i>	-0.69	11.87	-4.08	0.003534
<i>ileS</i>	-0.51	13.26	-3.20	0.029653
<i>ilvC</i>	-1.09	10.54	-4.60	0.000745
<i>ilvM</i>	-0.55	10.41	-3.20	0.02937
<i>intB</i>	0.38	9.45	3.14	0.032377
<i>kgpP</i>	0.82	11.39	5.76	1.45E-05

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>lgt</i>	-0.62	11.86	-3.40	0.018708
<i>lysS</i>	-0.54	11.78	-3.50	0.015286
<i>malX</i>	0.48	9.38	3.89	0.005942
<i>manZ</i>	0.72	9.09	4.60	0.000743
<i>mcrA</i>	0.49	8.68	3.15	0.03131
<i>mcrB</i>	0.54	9.28	3.11	0.034217
<i>mesJ</i>	-0.52	14.76	-3.03	0.040637
<i>mgIB</i>	0.63	10.44	3.95	0.005088
<i>mhpD</i>	-0.65	13.72	-3.18	0.030047
<i>mhpF</i>	0.59	10.02	3.34	0.021363
<i>mhpR</i>	0.66	10.71	3.65	0.010728
<i>modF</i>	0.56	9.79	4.29	0.001907
<i>motA</i>	-0.83	13.37	-4.41	0.001293
<i>mrcA</i>	-0.49	12.11	-3.02	0.041562
<i>mrdB</i>	-0.51	10.82	-4.66	0.000625
<i>murl</i>	-0.38	10.46	-3.18	0.030022
<i>napG</i>	0.61	10.57	3.45	0.017113
<i>narG</i>	0.57	8.97	3.88	0.005942
<i>nikC</i>	0.45	9.15	4.39	0.001387
<i>nlpA</i>	-0.36	9.43	-2.97	0.046377
<i>nlpD</i>	0.87	12.89	4.22	0.002293
<i>ntpA</i>	-0.59	11.15	-3.17	0.030472
<i>ompT</i>	-0.98	12.42	-5.12	0.000132
<i>pal</i>	-0.75	9.85	-4.59	0.000764
<i>pepA</i>	-0.49	9.36	-4.08	0.00354
<i>pepP</i>	-0.57	13.26	-3.54	0.013816
<i>pflB</i>	-0.42	9.05	-3.41	0.018397
<i>pflC</i>	-0.60	12.66	-2.98	0.044715
<i>pgk</i>	-0.74	11.14	-5.59	2.64E-05
<i>pgpA</i>	0.63	10.54	3.89	0.005914
<i>phoH</i>	0.53	10.20	3.57	0.013303
<i>pntA</i>	-0.68	11.08	-4.03	0.003938
<i>potA</i>	-0.45	13.25	-2.95	0.047287
<i>potC</i>	-0.73	12.34	-4.39	0.001399
<i>ppiA</i>	-0.56	8.96	-3.03	0.040851
<i>pqiB</i>	-0.57	11.59	-3.22	0.028551
<i>prfB</i>	-0.78	10.40	-4.47	0.001135
<i>priB</i>	-0.64	11.85	-3.63	0.011266
<i>priA</i>	-0.94	11.78	-5.56	2.95E-05
<i>prpB</i>	-0.55	13.66	-3.28	0.024609
<i>prpC</i>	0.50	8.40	3.01	0.042661
<i>ptr</i>	0.60	11.35	3.34	0.021716
<i>ptxA</i>	0.32	9.20	2.95	0.047287

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>purA</i>	-0.46	13.24	-3.09	0.035773
<i>purN</i>	-0.49	12.93	-3.11	0.034378
<i>purU</i>	-0.52	9.19	-3.74	0.008475
<i>pykF</i>	-0.80	10.66	-5.19	0.000106
<i>pyrG</i>	-0.71	10.45	-3.75	0.008454
<i>pyrH</i>	-0.92	9.61	-5.31	6.79E-05
<i>pyrI</i>	-0.75	11.25	-3.75	0.008454
<i>radC</i>	0.40	12.05	3.18	0.030022
<i>rbsB</i>	3.19	11.30	11.78	8.02E-16
<i>rfal</i>	-0.70	10.19	-4.09	0.003418
<i>rfbD</i>	-0.70	10.25	-3.55	0.013702
<i>rfbX</i>	-1.23	10.10	-6.90	1.46E-07
<i>rhaT</i>	-0.63	10.44	-4.85	0.00034
<i>rhoL</i>	-0.61	11.28	-3.41	0.018461
<i>rmf</i>	2.72	12.68	11.51	1.69E-15
<i>rnc</i>	-0.50	10.06	-3.71	0.009299
<i>rpe</i>	-0.26	15.19	-3.00	0.043719
<i>rplA</i>	-1.35	11.85	-7.90	3.98E-09
<i>rplB</i>	-0.56	12.01	-3.21	0.028785
<i>rplC</i>	-0.67	12.75	-4.96	0.000233
<i>rplD</i>	-1.04	13.64	-4.77	0.000452
<i>rplE</i>	-0.84	10.68	-4.54	0.000873
<i>rplF</i>	-0.90	10.52	-5.18	0.000107
<i>rplK</i>	-0.76	10.44	-4.89	0.000296
<i>rplL</i>	-1.20	12.02	-7.18	4.66E-08
<i>rplN</i>	-1.17	11.21	-7.10	6.69E-08
<i>rplP</i>	-0.59	12.19	-4.03	0.003938
<i>rplR</i>	-1.01	9.84	-5.75	1.50E-05
<i>rplU</i>	-0.61	12.71	-3.36	0.020504
<i>rplV</i>	-0.66	11.57	-4.46	0.00114
<i>rplW</i>	-1.53	11.43	-8.51	5.08E-10
<i>rplX</i>	-1.02	12.29	-7.30	3.05E-08
<i>rpmC</i>	-0.82	12.89	-4.03	0.003938
<i>rpmD</i>	-1.29	11.09	-7.97	3.16E-09
<i>rpmE</i>	-0.60	10.25	-4.01	0.004236
<i>rpmH</i>	-0.73	11.69	-4.08	0.003545
<i>rpmJ</i>	-0.85	11.96	-5.47	3.95E-05
<i>rpoA</i>	-0.54	10.85	-3.64	0.01083
<i>rpoB</i>	-0.61	9.62	-3.49	0.01559
<i>rpoZ</i>	-0.60	11.25	-5.24	8.77E-05
<i>rpsB</i>	-1.12	11.42	-4.44	0.00122
<i>rpsD</i>	-1.78	12.96	-8.68	2.78E-10
<i>rpsE</i>	-1.32	11.92	-7.51	1.68E-08

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung



Gen	M	A	t	P.Value
<i>rpsF</i>	-0.68	12.03	-3.50	0.015174
<i>rpsG</i>	-0.70	11.73	-4.48	0.001094
<i>rpsH</i>	-0.74	11.25	-4.38	0.001424
<i>rpsJ</i>	-1.26	11.88	-8.48	5.08E-10
<i>rpsK</i>	-1.14	11.73	-5.69	1.85E-05
<i>rpsL</i>	-0.97	12.09	-6.40	1.17E-06
<i>rpsM</i>	-1.35	11.23	-8.99	7.99E-11
<i>rpsN</i>	-1.19	12.72	-7.28	3.18E-08
<i>rpsP</i>	-0.97	10.69	-6.32	1.61E-06
<i>rpsQ</i>	-0.84	9.87	-5.18	0.000107
<i>rpsS</i>	-1.21	10.23	-6.16	3.00E-06
<i>rpsV</i>	1.13	10.60	5.68	1.88E-05
<i>sbcC</i>	0.43	12.98	3.02	0.041473
<i>sfmC</i>	0.51	8.78	3.35	0.020902
<i>sgcQ</i>	0.50	11.82	3.45	0.01704
<i>sgcX</i>	0.48	10.55	3.01	0.043021
<i>speE</i>	-0.58	9.57	-3.08	0.03676
<i>spoU</i>	0.70	8.65	3.55	0.013702
<i>sucA</i>	-0.43	9.66	-3.63	0.011266
<i>sugE</i>	0.43	8.49	3.09	0.035773
<i>talC</i>	0.37	9.67	3.00	0.043138
<i>tdcR</i>	0.56	8.95	3.86	0.006355
<i>thrB</i>	-0.95	10.36	-5.84	1.08E-05
<i>thrC</i>	-1.38	11.72	-8.35	8.34E-10
<i>tnaA</i>	2.79	10.57	9.17	4.51E-11
<i>tolB</i>	-0.65	10.88	-3.71	0.00936
<i>torA</i>	-0.37	9.20	-3.36	0.020701
<i>tpiA</i>	-0.62	10.10	-5.00	0.000205
<i>tpr</i>	0.52	9.81	3.19	0.030022
<i>tra8_1</i>	0.53	9.51	3.68	0.009969
<i>trg</i>	-0.40	11.00	-3.23	0.028025
<i>trmD</i>	-1.02	12.12	-6.59	5.43E-07
<i>trpB</i>	-1.29	11.15	-8.05	2.38E-09
<i>trpC</i>	-1.20	10.66	-7.37	2.32E-08
<i>trpD</i>	-0.48	9.64	-3.21	0.028875
<i>trpE</i>	-0.49	10.20	-3.33	0.022157
<i>trpL</i>	0.47	9.79	3.09	0.035794
<i>tufA</i>	-0.69	11.06	-4.43	0.001257
<i>ubiC</i>	0.71	11.54	3.14	0.032377
<i>ubiX</i>	0.36	9.19	3.05	0.039439
<i>uidA</i>	0.79	13.11	4.75	0.000472
<i>uidC</i>	0.48	9.34	4.69	0.000561
<i>unknown (12A4)</i>	0.40	9.56	3.30	0.023748

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>unknown (12E18)</i>	0.44	9.33	4.31	0.00179
<i>unknown (12G22)</i>	0.47	11.24	3.40	0.018708
<i>unknown (12H17)</i>	-0.51	9.05	-3.57	0.013171
<i>unknown (12H8)</i>	-0.59	10.86	-3.65	0.010728
<i>unknown (12M5)</i>	-0.90	10.82	-3.62	0.011558
<i>wbbl</i>	-0.79	10.34	-3.16	0.030976
<i>wecB</i>	-0.46	11.79	-3.07	0.037692
<i>wecE</i>	0.44	8.92	3.15	0.031335
<i>xyIB</i>	0.48	11.33	3.14	0.032377
<i>xyIE</i>	-0.50	11.20	-3.41	0.018641
<i>yadK</i>	0.57	8.64	3.28	0.02471
<i>yafA</i>	0.40	9.20	2.96	0.047287
<i>yafX</i>	0.73	8.76	4.63	0.000692
<i>yagD</i>	0.67	10.02	3.72	0.009121
<i>yahE</i>	0.51	9.00	3.70	0.009376
<i>yahN</i>	0.56	11.44	3.30	0.023631
<i>yahO</i>	0.72	9.69	3.44	0.017366
<i>yajQ</i>	0.39	11.73	3.54	0.013816
<i>ybaT</i>	-1.81	8.38	-7.44	2.03E-08
<i>ybeV</i>	0.43	9.73	3.30	0.023748
<i>ybeX</i>	-0.82	9.03	-3.17	0.03012
<i>ybfD</i>	0.64	10.14	4.60	0.000742
<i>ybfF</i>	-0.44	8.68	-3.16	0.030743
<i>ybgJ</i>	-0.62	10.88	-4.25	0.002072
<i>ybjW</i>	0.71	9.33	4.28	0.001921
<i>ycbQ</i>	0.57	8.85	3.32	0.022553
<i>ycbS</i>	0.70	8.78	4.99	0.00021
<i>ycbY</i>	0.41	9.11	3.48	0.015883
<i>ycdR</i>	0.47	8.80	3.39	0.01934
<i>yceD</i>	-0.81	10.74	-3.13	0.032496
<i>yceE</i>	1.19	9.95	3.89	0.005914
<i>ycfB</i>	-0.42	13.01	-2.96	0.047007
<i>ychA</i>	-0.48	9.50	-3.26	0.025523
<i>ychE</i>	0.47	10.72	3.09	0.035794
<i>ychG</i>	0.40	8.78	3.12	0.03309
<i>ychH</i>	1.20	9.84	7.50	1.71E-08
<i>ychP</i>	0.43	10.82	3.23	0.027951
<i>yciK</i>	-0.41	8.86	-2.95	0.047582
<i>yciW</i>	-0.61	9.00	-3.63	0.011266
<i>ycjT</i>	0.59	9.27	6.23	2.41E-06
<i>ydaH</i>	0.81	9.61	4.59	0.000764
<i>ydeF</i>	0.64	9.46	4.06	0.003717
<i>ydfE</i>	0.38	9.47	2.99	0.044277

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>ydgR</i>	0.56	9.54	3.17	0.03026
<i>ydhD</i>	-0.50	10.76	-2.93	0.049632
<i>ydiC</i>	-0.52	10.10	-2.98	0.045418
<i>ydjA</i>	-0.63	11.41	-4.26	0.002072
<i>ydjE</i>	0.30	8.65	3.30	0.023748
<i>ydjJ</i>	-0.45	9.00	-3.22	0.028403
<i>yeaB</i>	0.47	10.82	3.11	0.034252
<i>yeaD</i>	-0.40	9.17	-3.29	0.023752
<i>yeaR</i>	0.45	9.05	3.14	0.032356
<i>yeaT</i>	0.44	9.06	3.38	0.01989
<i>yedL</i>	-0.62	10.99	-4.28	0.001919
<i>yehE</i>	0.44	9.30	3.25	0.026897
<i>yehM</i>	0.47	9.11	3.18	0.030022
<i>yehY</i>	0.73	8.91	5.26	8.14E-05
<i>yfaO</i>	0.52	9.75	3.46	0.01668
<i>yfcG</i>	-0.90	12.10	-3.88	0.005942
<i>yfgB</i>	0.67	8.54	3.92	0.005532
<i>yfhA</i>	-0.64	11.08	-4.72	0.000518
<i>yfiM</i>	0.37	11.32	3.89	0.005942
<i>yfjY</i>	-0.73	8.59	-4.23	0.002283
<i>ygaE</i>	0.47	9.33	3.67	0.010228
<i>ygbB</i>	-0.65	11.35	-3.02	0.041952
<i>ygbP</i>	-0.66	9.83	-4.42	0.001257
<i>ygcU</i>	-0.66	10.78	-3.16	0.030758
<i>ygfQ</i>	0.45	11.71	3.18	0.030022
<i>yggH</i>	-0.43	10.22	-3.32	0.02242
<i>yggL</i>	-0.58	11.56	-3.39	0.01934
<i>ygiP</i>	0.46	9.76	3.99	0.004503
<i>yhaE</i>	0.39	10.50	2.96	0.047287
<i>yhaH</i>	0.43	11.53	3.36	0.020674
<i>yhaO</i>	0.37	10.60	2.99	0.044277
<i>yhbV</i>	-0.55	10.00	-4.19	0.002518
<i>yhcF</i>	-0.54	10.93	-3.40	0.018708
<i>yhcH</i>	0.47	10.21	4.03	0.003938
<i>yhdE</i>	-0.72	9.07	-3.68	0.009969
<i>yhgA</i>	0.42	9.91	3.56	0.01358
<i>yiiF</i>	0.42	12.81	3.18	0.030022
<i>yiiG</i>	0.57	8.73	3.69	0.009648
<i>yiiP</i>	-0.31	13.25	-2.94	0.048252
<i>yiiS</i>	0.35	9.87	3.04	0.040119
<i>yjcG</i>	0.60	9.61	3.23	0.028089
<i>yjcH</i>	0.84	10.06	5.50	3.50E-05
<i>yjeJ</i>	0.59	10.82	3.50	0.01508

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<i>P.Value</i>
<i>yjfF</i>	0.40	13.35	3.05	0.0389
<i>yjfR</i>	-0.48	10.94	-3.48	0.015883
<i>yjgR</i>	0.67	12.44	3.16	0.030758
<i>yjhE</i>	0.55	8.91	4.07	0.003559
<i>yjiO</i>	0.46	9.86	3.41	0.018397
<i>yjjV</i>	2.07	9.08	5.40	5.03E-05
<i>ykfA</i>	0.56	9.95	3.06	0.03797
<i>ymjA</i>	-0.41	8.98	-3.00	0.043199
<i>ynaE</i>	0.37	9.30	3.34	0.021716
<i>ynaF</i>	0.69	9.08	3.67	0.010206
<i>yniC</i>	-0.43	9.71	-3.99	0.004503
<i>yodB</i>	0.51	8.53	3.90	0.005914
<i>yohG</i>	0.65	10.73	4.14	0.002982
<i>yqeK</i>	0.74	8.11	5.09	0.000146
<i>yqiB</i>	0.44	11.41	3.37	0.020417
<i>yqiC</i>	0.62	13.17	3.25	0.026919
<i>yqjH</i>	0.43	13.28	3.44	0.017266
<i>yraM</i>	-0.45	9.25	-3.19	0.030022
<i>yraO</i>	0.45	9.01	3.16	0.030743
<i>yrbA</i>	-0.45	10.29	-3.13	0.032393
<i>yrdA</i>	-0.46	13.05	-3.46	0.016673
<i>yrfC</i>	0.36	8.80	3.01	0.042661
<i>yrfD</i>	0.43	12.84	3.36	0.020674
<i>ytfJ</i>	0.63	11.34	3.51	0.014929
<i>ytfK</i>	0.43	9.29	3.86	0.006306

Tab. 7.6:  
Zeitpunkt T6  
Fortsetzung

Tab. 7.7: Zeitpunkt T7. Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren *M*-, *A*-, *p*- und *t*-Werte, geordnet nach dem Gennamen

T7				
Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	<i>P.Value</i>
<i>accB</i>	-1.17	11.05	-6.84	2.71E-07
<i>aceA</i>	1.51	11.43	8.37	1.37E-09
<i>aceB</i>	0.83	12.84	4.25	0.00381
<i>aceE</i>	-0.71	9.80	-3.74	0.015857
<i>acs</i>	1.16	9.22	5.31	0.000103
<i>alaS</i>	-1.16	10.98	-7.07	1.43E-07
<i>aldA</i>	1.52	10.59	7.19	1.06E-07
<i>aroG</i>	-1.63	11.86	-6.51	1.02E-06
<i>atpA</i>	-1.00	11.34	-7.06	1.43E-07
<i>atpE</i>	-0.56	13.77	-3.78	0.014263

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>atpF</i>	-0.76	12.95	-5.30	0.000106
<i>atpH</i>	-0.90	11.15	-7.05	1.43E-07
<i>b0753</i>	0.71	10.10	3.83	0.012393
<i>b1153</i>	0.42	8.84	3.49	0.020498
<i>b1420</i>	0.85	9.09	4.72	0.000816
<i>b1462</i>	-0.47	9.35	-3.51	0.019379
<i>b1481</i>	0.86	9.39	4.09	0.006024
<i>b1518</i>	0.51	9.07	3.29	0.04996
<i>b1588</i>	0.78	9.60	3.68	0.018242
<i>b2341</i>	0.75	11.69	4.07	0.006321
<i>b2351</i>	-1.29	10.58	-5.67	2.79E-05
<i>b2446</i>	-0.99	8.54	-6.08	5.92E-06
<i>b2789</i>	0.40	9.63	3.46	0.021549
<i>bax</i>	0.96	9.86	4.99	0.000315
<i>bcp</i>	-0.55	9.31	-3.49	0.020498
<i>carA</i>	-1.50	10.13	-7.61	2.09E-08
<i>codA</i>	-0.75	10.16	-3.56	0.024727
<i>codA</i>	-0.74	10.16	-3.55	0.017781
<i>codB</i>	-0.77	10.77	-3.85	0.011978
<i>cspD</i>	1.52	10.30	5.56	4.09E-05
<i>cstA</i>	1.74	11.53	6.78	3.40E-07
<i>cyoB</i>	-0.59	12.11	-3.96	0.00896
<i>cyoB</i>	-0.52	12.11	-3.48	0.020937
<i>cyoC</i>	-0.86	12.02	-7.01	1.62E-07
<i>cysJ</i>	-0.80	8.98	-3.48	0.030964
<i>dapB</i>	-0.78	9.39	-4.04	0.006897
<i>dnaJ</i>	-0.63	9.38	-3.73	0.015857
<i>eutE</i>	0.52	8.56	4.78	0.000682
<i>fba</i>	-0.57	11.43	-3.59	0.023059
<i>flgC</i>	-0.99	11.83	-5.09	0.000224
<i>flgD</i>	-0.98	12.29	-6.16	4.34E-06
<i>flgE</i>	-0.87	11.19	-3.94	0.009217
<i>fliA</i>	-1.00	11.43	-3.47	0.030988
<i>fusA</i>	-1.03	13.98	-8.05	4.13E-09
<i>gatA</i>	1.64	10.32	5.44	6.34E-05
<i>gatD</i>	1.40	10.31	7.37	5.27E-08
<i>gatY</i>	1.19	11.46	6.88	2.49E-07
<i>gatZ</i>	1.40	13.77	5.84	1.42E-05
<i>gcvH</i>	-0.54	9.46	-3.45	0.032586
<i>glcB</i>	0.56	9.02	3.99	0.008074
<i>glcF</i>	0.87	10.32	3.38	0.038612
<i>glcG</i>	0.74	11.61	3.56	0.024727
<i>glhH</i>	0.98	10.86	4.97	0.000337

Tab. 7.7:  
Zeitpunkt T7  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>glnP</i>	0.52	10.89	3.60	0.022752
<i>gltA</i>	0.95	10.52	4.00	0.00791
<i>gltB</i>	-1.10	10.04	-5.06	0.000251
<i>glyA</i>	-0.39	9.87	-3.53	0.018481
<i>gshA</i>	-0.49	11.60	-3.78	0.014156
<i>guaC</i>	-0.66	9.95	-3.50	0.029475
<i>hupA</i>	-0.50	10.27	-3.47	0.02154
<i>ilvC</i>	-0.89	10.54	-3.74	0.015857
<i>kgtP</i>	0.81	11.39	5.64	3.00E-05
<i>malT</i>	0.52	10.69	3.41	0.035922
<i>melB</i>	0.48	9.29	3.55	0.017675
<i>mgIB</i>	0.68	10.44	4.23	0.004073
<i>nlpD</i>	1.48	12.89	7.15	1.15E-07
<i>nrdI</i>	0.69	8.92	4.91	0.000417
<i>ompT</i>	-1.56	12.42	-8.17	2.76E-09
<i>pflB</i>	-0.61	9.05	-3.71	0.016746
<i>pgk</i>	-0.67	11.14	-5.10	0.00022
<i>pntA</i>	-0.65	11.08	-3.85	0.011978
<i>potC</i>	-0.57	12.34	-3.42	0.035089
<i>prfB</i>	-0.76	10.40	-4.31	0.003175
<i>priB</i>	-0.73	11.85	-4.09	0.006039
<i>priA</i>	-0.62	11.78	-3.66	0.019224
<i>proW</i>	0.48	10.54	3.57	0.016552
<i>purU</i>	-0.76	9.19	-4.58	0.001269
<i>pyrH</i>	-0.78	9.61	-3.87	0.011368
<i>pyrI</i>	-0.74	11.25	-3.71	0.016746
<i>rbsB</i>	2.51	11.30	9.25	3.11E-11
<i>rfbA</i>	-0.68	9.96	-3.38	0.038612
<i>rfbB</i>	-0.69	10.90	-4.45	0.002055
<i>rfbD</i>	-0.84	10.25	-4.27	0.003634
<i>rfbX</i>	-1.08	10.10	-6.05	6.32E-06
<i>rmf</i>	2.32	12.68	9.83	4.60E-12
<i>rplA</i>	-1.18	11.85	-6.88	2.49E-07
<i>rplD</i>	-0.76	13.64	-3.51	0.019379
<i>rplE</i>	-0.93	10.68	-3.73	0.015961
<i>rplF</i>	-0.82	10.52	-4.77	0.000699
<i>rplK</i>	-0.71	10.44	-4.59	0.001268
<i>rplL</i>	-0.78	12.02	-4.70	0.000881
<i>rplM</i>	-0.63	10.56	-3.55	0.025819
<i>rplM</i>	-0.61	10.56	-3.49	0.020496
<i>rplN</i>	-0.64	11.21	-3.84	0.012254
<i>rplP</i>	-0.62	12.19	-4.20	0.004294
<i>rplR</i>	-0.78	9.84	-3.90	0.010602

Tab. 7.7:  
Zeitpunkt T7  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>rplU</i>	-0.76	12.71	-4.20	0.004294
<i>rplW</i>	-0.96	11.43	-5.36	8.70E-05
<i>rplX</i>	-0.51	12.29	-3.64	0.020295
<i>rpmD</i>	-0.98	11.09	-6.05	6.32E-06
<i>rpmJ</i>	-0.67	11.96	-4.31	0.003175
<i>rpoA</i>	-0.49	10.85	-3.32	0.045592
<i>rpoE</i>	0.95	9.94	4.34	0.002934
<i>rpsD</i>	-1.08	12.96	-5.26	0.000119
<i>rpsE</i>	-0.61	11.92	-3.49	0.029475
<i>rpsG</i>	-0.66	11.73	-4.21	0.004203
<i>rpsJ</i>	-0.98	11.88	-6.60	7.25E-07
<i>rpsK</i>	-1.15	11.73	-5.75	2.01E-05
<i>rpsL</i>	-0.60	12.09	-4.00	0.00791
<i>rpsM</i>	-1.07	11.23	-7.08	1.43E-07
<i>rpsN</i>	-0.76	12.72	-4.62	0.001153
<i>rpsP</i>	-0.64	10.69	-4.19	0.004453
<i>rpsV</i>	1.38	10.60	6.86	2.54E-07
<i>sgcX</i>	0.62	10.55	3.83	0.012393
<i>thrC</i>	-1.30	11.72	-7.86	8.48E-09
<i>tnaA</i>	2.34	10.57	7.61	2.09E-08
<i>tolB</i>	-0.61	10.88	-3.46	0.032081
<i>treB</i>	1.02	9.11	4.74	0.000768
<i>trmD</i>	-0.92	12.12	-5.96	8.74E-06
<i>trpB</i>	-1.54	11.15	-9.62	7.77E-12
<i>trpC</i>	-1.19	10.66	-7.36	5.27E-08
<i>ugd</i>	0.58	10.33	4.39	0.002501
<i>unknown (12A10)</i>	0.48	9.51	3.52	0.0279
<i>unknown (12C20)</i>	0.49	8.95	3.53	0.018543
<i>unknown (12E6)</i>	0.62	11.80	3.46	0.031995
<i>uxaC</i>	0.51	9.44	3.39	0.037318
<i>yahO</i>	0.74	9.69	3.53	0.027199
<i>ycbS</i>	0.49	8.78	3.47	0.02154
<i>ycfC</i>	-0.64	10.89	-3.40	0.036824
<i>yehA</i>	-0.61	9.50	-3.60	0.022888
<i>yehH</i>	1.25	9.84	6.88	2.49E-07
<i>yehJ</i>	-0.59	9.32	-3.61	0.022037
<i>ycjQ</i>	0.44	8.35	3.34	0.042252
<i>ydcF</i>	0.51	9.57	3.59	0.023086
<i>yeaA</i>	0.66	10.95	4.12	0.005545
<i>yeaR</i>	0.69	9.05	4.24	0.003985
<i>yeeO</i>	0.89	9.00	3.77	0.01446
<i>yfjA</i>	-0.73	12.79	-3.83	0.012393
<i>yggG</i>	0.57	11.09	3.36	0.04088

Tab. 7.7:  
Zeitpunkt T7  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>yggH</i>	-0.58	10.22	-3.94	0.009364
<i>yifM_1</i>	-0.71	8.99	-3.73	0.015857
<i>yjcG</i>	0.73	9.61	3.44	0.033183
<i>yjcH</i>	0.94	10.06	5.46	6.04E-05
<i>yjhB</i>	0.66	9.28	3.52	0.019159
<i>ynaE</i>	0.65	9.30	4.36	0.002793
<i>ynaF</i>	0.87	9.08	4.60	0.001202

**Tab. 7.7:**  
Zeitpunkt T7  
Fortsetzung

**Tab. 7.8: Zeitpunkt T8.** Signifikant differentiell exprimierte Gene, identifiziert über die Microarray-Analyse. Tabellarisch aufgelistet sind die Gene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  und einem fdr-angepassten p-Wert, sowie deren *M*-, *A*-, *p*- und *t*-Werte, geordnet nach dem Gennamen

T8				
Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>accB</i>	-1.00	11.05	-5.87	1.07E-05
<i>aceA</i>	1.91	11.43	10.54	2.65E-13
<i>aceB</i>	1.21	12.84	6.19	3.32E-06
<i>acnB</i>	0.56	8.99	3.59	0.016162
<i>acrF</i>	0.59	9.38	3.24	0.036467
<i>acs</i>	1.24	9.22	6.76	3.29E-07
<i>adk</i>	-0.70	10.44	-3.44	0.022344
<i>ahpC</i>	0.49	10.40	3.74	0.011521
<i>alaS</i>	-1.07	10.98	-6.51	9.06E-07
<i>aldA</i>	1.93	10.59	9.11	2.97E-11
<i>aroG</i>	-1.42	11.86	-5.67	2.39E-05
<i>atpA</i>	-1.19	11.34	-8.44	2.85E-10
<i>atpF</i>	-0.86	12.95	-5.98	7.49E-06
<i>atpH</i>	-0.80	11.15	-6.25	2.67E-06
<i>b0753</i>	0.61	10.10	3.27	0.034344
<i>b1199</i>	-0.42	10.85	-3.46	0.021549
<i>b1420</i>	0.92	9.09	5.10	0.00018
<i>b1446</i>	-0.48	9.61	-3.26	0.034651
<i>b1481</i>	1.05	9.39	5.64	2.59E-05
<i>b1518</i>	0.56	9.07	3.69	0.012328
<i>b1522</i>	-0.87	8.50	-4.89	0.000369
<i>b1588</i>	0.80	9.60	3.73	0.011592
<i>b1590</i>	0.54	8.86	3.33	0.02954
<i>b1724</i>	0.61	9.80	4.64	0.000857
<i>b1821</i>	0.52	8.90	3.27	0.033828
<i>b1976</i>	0.86	8.69	3.43	0.022971
<i>b2341</i>	0.89	11.69	4.83	0.000454
<i>b2351</i>	-0.93	10.58	-4.11	0.004012
<i>b2372</i>	0.54	9.01	4.18	0.003146



Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>b2377</i>	0.53	10.15	3.64	0.014237
<i>b2896</i>	0.44	11.56	3.43	0.022971
<i>b3022</i>	0.70	9.20	4.81	0.000482
<i>b3914</i>	0.49	9.34	3.24	0.036662
<i>bax</i>	1.01	9.86	5.98	7.56E-06
<i>bolA</i>	-0.61	10.04	-3.11	0.048382
<i>carA</i>	-1.80	10.13	-9.15	2.97E-11
<i>cdd</i>	-0.61	11.78	-3.84	0.008658
<i>codB</i>	-0.88	10.77	-4.37	0.001892
<i>crcA</i>	0.47	8.55	4.20	0.003053
<i>cspD</i>	1.49	10.30	5.46	5.03E-05
<i>cspE</i>	0.73	9.41	3.74	0.011433
<i>cstA</i>	2.08	11.53	8.13	1.06E-09
<i>cutC</i>	0.74	9.46	3.16	0.044277
<i>cyoC</i>	-0.49	12.02	-3.94	0.006509
<i>cysD</i>	-0.43	12.76	-3.34	0.029205
<i>cysJ</i>	-0.91	8.98	-4.67	0.000801
<i>dapB</i>	-0.70	9.39	-4.33	0.002054
<i>emrY</i>	0.56	8.61	4.10	0.004012
<i>fimA</i>	-0.69	10.79	-3.46	0.021852
<i>flgA</i>	-0.71	10.87	-3.76	0.010909
<i>flgB</i>	-1.32	12.97	-8.01	1.63E-09
<i>flgC</i>	-2.04	11.83	-10.46	2.65E-13
<i>flgD</i>	-1.44	12.29	-9.03	3.76E-11
<i>flgE</i>	-1.96	11.19	-8.85	5.49E-11
<i>flgG</i>	-0.98	9.65	-4.66	0.000815
<i>flgH</i>	-0.59	9.83	-3.20	0.039594
<i>flgJ</i>	-0.61	10.74	-4.18	0.003184
<i>flgK</i>	-0.77	9.63	-3.18	0.041376
<i>flhD</i>	-0.50	10.19	-3.12	0.048165
<i>fliA</i>	-2.42	11.43	-8.40	3.21E-10
<i>fliE</i>	-1.20	11.14	-5.47	5.03E-05
<i>fliM</i>	-1.04	10.15	-4.62	0.000886
<i>fliS</i>	-0.90	9.34	-5.16	0.000151
<i>fliZ</i>	-1.05	9.77	-6.89	2.02E-07
<i>focA</i>	-0.40	12.93	-3.33	0.02954
<i>ftn</i>	-0.51	9.96	-4.35	0.001976
<i>fusA</i>	-0.42	13.98	-3.31	0.030552
<i>gatA</i>	1.78	10.32	6.66	4.94E-07
<i>gatC</i>	1.06	11.23	4.33	0.002054
<i>gatD</i>	1.68	10.31	8.81	6.01E-11
<i>gatY</i>	1.55	11.46	8.95	4.42E-11
<i>gatZ</i>	1.49	13.77	6.23	2.84E-06

Tab. 7.8:  
Zeitpunkt T8  
Fortsetzung

Gen	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>t</i>	P.Value
<i>gcvH</i>	-0.65	9.46	-4.75	0.000599
<i>glcC</i>	0.52	9.94	3.58	0.016225
<i>glcF</i>	0.95	10.32	3.70	0.012169
<i>glnH</i>	1.05	10.86	5.30	8.73E-05
<i>glnP</i>	0.75	10.89	5.15	0.000151
<i>gltA</i>	1.27	10.52	5.37	6.93E-05
<i>gltB</i>	-1.15	10.04	-6.07	5.48E-06
<i>grxB</i>	0.60	9.06	3.72	0.011833
<i>gshA</i>	-0.43	11.60	-3.39	0.025896
<i>guaB</i>	-0.61	9.16	-3.59	0.016225
<i>hcaR</i>	0.86	9.69	5.94	8.58E-06
<i>hdhA</i>	0.41	9.87	3.68	0.012811
<i>hipA</i>	-0.61	9.35	-3.80	0.009836
<i>hisF</i>	-0.53	11.44	-3.36	0.02768
<i>ilvC</i>	-0.90	10.54	-3.80	0.009812
<i>kgtP</i>	1.23	11.39	8.61	1.42E-10
<i>malT</i>	0.55	10.69	3.59	0.016162
<i>metE</i>	-0.81	9.79	-3.42	0.023311
<i>mglB</i>	0.55	10.44	3.45	0.021956
<i>modB</i>	0.75	9.47	3.71	0.011921
<i>mutL</i>	1.04	11.42	5.06	0.000206
<i>nanT</i>	0.52	9.50	3.12	0.047487
<i>napH</i>	0.54	10.06	3.70	0.012169
<i>narV</i>	-0.72	9.36	-4.56	0.001054
<i>nikC</i>	0.43	9.15	3.72	0.011805
<i>nlpD</i>	1.83	12.89	8.85	5.49E-11
<i>nuoA</i>	0.84	10.27	4.26	0.002482
<i>ompT</i>	-0.64	12.42	-3.37	0.027032
<i>pal</i>	-0.51	9.85	-3.15	0.044277
<i>pbpC</i>	0.39	9.90	3.79	0.009954
<i>pflC</i>	-0.89	12.66	-4.38	0.001818
<i>pgk</i>	-0.72	11.14	-5.45	5.19E-05
<i>potC</i>	-0.63	12.34	-3.82	0.009422
<i>prfB</i>	-0.80	10.40	-4.58	0.001022
<i>proV</i>	1.14	9.83	7.21	5.30E-08
<i>purE</i>	-0.52	9.72	-3.64	0.014237
<i>purF</i>	-0.74	8.94	-4.33	0.002054
<i>pyrB</i>	-0.70	12.18	-3.85	0.008494
<i>pyrH</i>	-0.75	9.61	-4.33	0.002054
<i>pyrI</i>	-0.72	11.25	-3.58	0.016225
<i>rbsB</i>	2.47	11.30	9.11	2.97E-11
<i>rfbB</i>	-0.62	10.90	-4.00	0.005594
<i>rfbD</i>	-0.66	10.25	-3.37	0.027032

Tab. 7.8:  
Zeitpunkt T8  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>rfbX</i>	-0.87	10.10	-4.89	0.000369
<i>rmf</i>	2.16	12.68	9.15	2.97E-11
<i>rnc</i>	-0.43	10.06	-3.15	0.044277
<i>rplA</i>	-0.96	11.85	-5.62	2.81E-05
<i>rplC</i>	-0.61	12.75	-4.48	0.001345
<i>rplK</i>	-0.55	10.44	-4.04	0.004928
<i>rplP</i>	-0.50	12.19	-3.37	0.026663
<i>rplU</i>	-0.59	12.71	-3.24	0.03688
<i>rplW</i>	-0.88	11.43	-4.90	0.000368
<i>rpmE</i>	-0.51	10.25	-3.39	0.025896
<i>rpoE</i>	0.83	9.94	4.30	0.002225
<i>rpsJ</i>	-0.61	11.88	-4.08	0.00437
<i>rpsK</i>	-0.64	11.73	-3.20	0.039594
<i>rpsM</i>	-0.65	11.23	-4.33	0.002054
<i>rpsN</i>	-0.74	12.72	-4.51	0.001268
<i>rpsP</i>	-0.69	10.69	-4.46	0.001436
<i>rpsS</i>	-0.91	10.23	-4.60	0.000932
<i>rpsV</i>	1.59	10.60	7.99	1.74E-09
<i>rseC</i>	-0.50	8.70	-3.44	0.022344
<i>sdhA</i>	0.61	11.13	3.72	0.011833
<i>sdhB</i>	0.54	9.69	3.61	0.015619
<i>sdhC</i>	0.89	9.33	4.38	0.001817
<i>sgcX</i>	0.59	10.55	3.64	0.014237
<i>smf_2</i>	0.58	8.86	4.57	0.001039
<i>srmB</i>	-0.74	8.60	-4.19	0.003075
<i>stpA</i>	-0.72	8.75	-4.40	0.001714
<i>thrB</i>	-0.74	10.36	-4.56	0.001039
<i>thrC</i>	-1.33	11.72	-8.03	1.55E-09
<i>tnaA</i>	2.72	10.57	8.95	4.42E-11
<i>tpiA</i>	-0.57	10.10	-4.64	0.000842
<i>treB</i>	1.62	9.11	8.88	5.49E-11
<i>trmD</i>	-0.78	12.12	-5.05	0.000214
<i>trpB</i>	-1.12	11.15	-7.00	1.35E-07
<i>trpC</i>	-0.76	10.66	-4.67	0.000789
<i>trpD</i>	-0.62	9.64	-4.15	0.003419
<i>ubiC</i>	0.86	11.54	3.75	0.010957
<i>ugd</i>	0.72	10.33	5.42	5.66E-05
<i>unknown (12D9)</i>	-0.41	8.62	-3.33	0.029582
<i>unknown (12E18)</i>	0.48	9.33	4.63	0.00086
<i>unknown (12H17)</i>	-0.53	9.05	-3.66	0.013275
<i>uxaC</i>	0.59	9.44	4.48	0.001345
<i>wcaB</i>	0.39	9.23	3.20	0.039537
<i>wcaF</i>	-0.50	9.27	-3.44	0.022344

Tab. 7.8:  
Zeitpunkt T8  
Fortsetzung

Gen	M	A	t	P.Value
<i>yabH</i>	-0.53	9.33	-3.22	0.038588
<i>yahC</i>	0.38	8.73	3.60	0.016087
<i>yahO</i>	0.69	9.69	3.27	0.033828
<i>ybcM</i>	0.52	8.85	4.30	0.002225
<i>ybgF</i>	-0.68	9.68	-3.95	0.006509
<i>ybgL</i>	0.62	9.74	3.80	0.009812
<i>ybiC</i>	-0.42	9.73	-3.30	0.031033
<i>ybjZ</i>	0.56	9.31	5.30	8.85E-05
<i>ycbK</i>	0.69	9.84	3.34	0.029237
<i>ycfJ</i>	0.81	10.70	3.44	0.022344
<i>ychH</i>	1.48	9.84	9.26	2.97E-11
<i>ycjT</i>	0.46	9.27	4.89	0.000369
<i>ydcF</i>	0.44	9.57	3.46	0.021549
<i>yeaA</i>	0.93	10.95	5.81	1.32E-05
<i>yeaD</i>	-0.54	9.17	-3.95	0.00642
<i>yeaF</i>	-0.61	10.09	-3.22	0.038663
<i>yeaR</i>	0.95	9.05	5.91	9.32E-06
<i>yehX</i>	0.42	9.92	3.37	0.027024
<i>yfbN</i>	0.35	9.02	3.32	0.029686
<i>yfiM</i>	0.38	11.32	4.02	0.00515
<i>yfjJ</i>	0.58	8.96	4.39	0.001762
<i>yfjP</i>	0.75	8.93	4.94	0.000321
<i>ygaU</i>	0.37	9.47	3.71	0.011833
<i>yggG</i>	0.70	11.09	4.09	0.004191
<i>yggH</i>	-0.50	10.22	-3.86	0.008494
<i>yghK</i>	0.38	9.85	3.32	0.030282
<i>yhcL</i>	0.43	9.36	3.23	0.037618
<i>yhgA</i>	0.37	9.91	3.19	0.040698
<i>yidF</i>	0.36	8.67	3.12	0.047827
<i>yidY</i>	0.43	9.64	3.21	0.039016
<i>yihI</i>	-0.39	10.19	-3.11	0.048805
<i>yihX</i>	0.51	9.18	4.27	0.002417
<i>yjcG</i>	0.88	9.61	4.71	0.000702
<i>yjcH</i>	1.06	10.06	6.97	1.43E-07
<i>yjdH</i>	0.53	9.74	3.71	0.011833
<i>yjeJ</i>	0.67	10.82	3.98	0.005885
<i>yjhD</i>	0.40	9.44	3.15	0.044277
<i>yjhE</i>	0.54	8.91	3.94	0.006509
<i>ymdD</i>	0.55	8.82	4.41	0.001708
<i>ymfE</i>	0.52	8.83	3.58	0.016225
<i>ymgA</i>	0.64	9.90	4.21	0.002966
<i>ynaF</i>	0.81	9.08	5.08	0.000193
<i>yojN</i>	-0.77	11.36	-3.13	0.046946

Tab. 7.8:  
Zeitpunkt T8  
Fortsetzung

---

<b>Gen</b>	<b><i>M</i></b>	<b><i>A</i></b>	<b>t</b>	<b>P.Value</b>
<b><i>yqiB</i></b>	0.48	11.41	3.71	0.011833
<b><i>ytfK</i></b>	0.54	9.29	4.41	0.001708

**Tab. 7.8:**  
**Zeitpunkt T8**  
**Fortsetzung**

## 7.2 Standardabweichung (doppelt)

**Tab. 7.9: Doppelte Standardabweichung.** Tabellarische Auflistung der Werte für die doppelte Standardabweichung der über die Microarray -Analyse in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz „als signifikant differentiell exprimiert“ identifizierten Gene

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>accB</i>	0.30	0.28	0.30	0.28	0.39	0.34	0.34	0.34
<i>aceA</i>	0.32	0.30	0.32	0.30	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>aceB</i>	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>aceE</i>	0.29	0.27	0.37	0.27	0.38	0.34	0.38	0.38
<i>aceF</i>	0.65	0.55	0.74	0.55	0.68	0.68	0.76	0.76
<i>aceK</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>acnB</i>	0.27	0.30	0.30	0.23	0.37	0.37	0.37	0.31
<i>acpD</i>	0.29	0.32	0.37	0.28	0.39	0.30	0.39	0.29
<i>acpP</i>	0.37	0.34	0.37	0.34	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>acrA</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>acrB</i>	0.23	0.21	0.29	0.21	0.30	0.30	0.35	0.26
<i>acrF</i>	0.36	0.27	0.32	0.27	0.37	0.32	0.44	0.37
<i>acs</i>	0.32	0.27	0.36	0.27	0.37	0.32	0.44	0.37
<i>ada</i>	0.31	0.31	0.34	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>adk</i>	0.36	0.33	0.36	0.33	0.46	0.40	0.40	0.40
<i>agaS</i>	0.27	0.20	0.27	0.27	0.28	0.25	0.28	0.28
<i>agaS-r</i>	0.27	0.23	0.30	0.23	0.31	0.28	0.31	0.31
<i>agaW</i>	0.22	0.18	0.22	0.18	0.26	0.23	0.26	0.26
<i>agaZ</i>	0.28	0.22	0.24	0.25	0.34	0.29	0.29	0.28
<i>ahpC</i>	0.23	0.21	0.26	0.21	0.30	0.26	0.26	0.26
<i>alaS</i>	0.29	0.27	0.29	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>aldA</i>	0.35	0.35	0.38	0.35	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>alpA</i>	0.22	0.22	0.22	0.28	0.30	0.23	0.29	0.23
<i>alr</i>	0.25	0.21	0.25	0.25	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>amiA</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>ampG</i>	0.23	0.23	0.25	0.23	0.31	0.31	0.28	0.28
<i>araA</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>araC</i>	0.39	0.31	0.34	0.31	0.40	0.40	0.47	0.40
<i>araG</i>	0.34	0.27	0.34	0.30	0.35	0.31	0.35	0.31
<i>araJ</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>argB</i>	0.34	0.31	0.34	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>argC</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>argG</i>	0.25	0.22	0.25	0.38	0.31	0.26	0.31	0.31
<i>argI</i>	0.39	0.36	0.43	0.36	0.50	0.44	0.44	0.44
<i>aroA</i>	0.31	0.29	0.31	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>aroB</i>	0.27	0.25	0.27	0.25	0.42	0.31	0.31	0.31
<i>aroG</i>	0.41	0.41	0.41	0.41	0.50	0.50	0.50	0.50
<i>aroK</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>aroP</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>artI</i>	0.33	0.33	0.37	0.31	0.43	0.37	0.43	0.37
<i>artQ</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>asnS</i>	0.25	0.29	0.29	0.37	0.71	0.39	0.39	0.71
<i>atpA</i>	0.25	0.23	0.25	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>atpE</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>atpF</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>atpG</i>	0.29	0.27	0.32	0.27	0.37	0.33	0.33	0.33
<i>atpH</i>	0.21	0.21	0.23	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>b0235</i>	0.31	0.28	0.34	0.28	0.39	0.40	0.35	0.35
<i>b0245</i>	0.31	0.28	0.34	0.28	0.39	0.35	0.39	0.35
<i>b0309</i>	0.35	0.39	0.39	0.46	0.64	0.40	0.47	0.40
<i>b0359</i>	0.28	0.23	0.28	0.28	0.29	0.26	0.35	0.29

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
b0380	0.33	0.33	0.36	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
b0499	0.18	0.18	0.18	0.18	0.23	0.23	0.23	0.23
b0753	0.36	0.30	0.41	0.30	0.38	0.42	0.37	0.37
b0817	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
b0832	0.34	0.31	0.34	0.31	0.43	0.38	0.38	0.38
b0834	0.24	0.23	0.30	0.22	0.31	0.28	0.31	0.28
b0844	0.24	0.20	0.24	0.20	0.28	0.24	0.28	0.28
b0959	0.17	0.17	0.21	0.16	0.22	0.19	0.20	0.19
b0967	0.26	0.24	0.26	0.24	0.34	0.29	0.29	0.29
b1016	0.26	0.24	0.26	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
b1052	0.21	0.21	0.23	0.23	0.38	0.29	0.28	0.29
b1057	0.28	0.26	0.31	0.26	0.36	0.31	0.32	0.31
b1085	0.42	0.34	0.42	0.43	0.46	0.45	0.81	0.46
b1153	0.28	0.19	0.24	0.19	0.29	0.25	0.29	0.24
b1171	0.21	0.19	0.21	0.21	0.34	0.26	0.26	0.26
b1199	0.20	0.20	0.20	0.20	0.24	0.24	0.24	0.24
b1202	0.89	0.44	0.46	0.89	0.62	0.60	0.60	0.40
b1240	0.26	0.26	0.26	0.26	0.31	0.31	0.31	0.31
b1297	0.26	0.24	0.29	0.24	0.34	0.30	0.34	0.30
b1345	0.28	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
b1354	0.36	0.28	0.28	0.31	0.88	0.38	0.49	0.38
b1372	0.23	0.19	0.23	0.19	0.26	0.23	0.26	0.23
b1399	0.20	0.20	0.20	0.20	0.24	0.24	0.24	0.24
b1420	0.31	0.28	0.35	0.31	0.36	0.32	0.36	0.36
b1422	0.27	0.23	0.31	0.23	0.42	0.32	0.42	0.42
b1445	0.26	0.24	0.29	0.24	0.33	0.29	0.33	0.33
b1446	0.26	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
b1462	0.21	0.19	0.23	0.19	0.27	0.23	0.27	0.27
b1481	0.33	0.30	0.41	0.30	0.42	0.37	0.42	0.37
b1518	0.27	0.22	0.30	0.22	0.31	0.31	0.31	0.31
b1522	0.22	0.22	0.26	0.22	0.63	0.63	0.35	0.36
b1553	0.46	0.41	0.41	0.41	0.49	0.48	0.47	0.56
b1578	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
b1588	0.37	0.31	0.41	0.31	0.43	0.37	0.43	0.43
b1590	0.31	0.23	0.31	0.26	0.38	0.29	0.39	0.32
b1605	0.24	0.20	0.24	0.20	0.28	0.25	0.25	0.25
b1631	0.25	0.22	0.25	0.20	0.26	0.23	0.30	0.26
b1667	0.29	0.27	0.32	0.27	0.37	0.33	0.37	0.33
b1669	0.46	0.32	0.36	0.72	0.88	0.49	0.90	0.88
b1673	0.29	0.28	0.32	0.32	0.39	0.30	0.39	0.39
b1690	0.27	0.25	0.30	0.25	0.34	0.30	0.34	0.30
b1695	0.25	0.25	0.29	0.29	0.26	0.31	0.31	0.31
b1720	0.26	0.25	0.30	0.30	0.73	0.32	0.31	0.26
b1722	0.27	0.23	0.31	0.23	0.32	0.38	0.32	0.32
b1724	0.23	0.22	0.26	0.22	0.30	0.27	0.26	0.26
b1730	0.51	0.46	0.46	0.43	0.60	0.52	0.59	0.59
b1758	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
b1775	0.34	0.26	0.34	0.34	0.47	0.30	0.46	0.35
b1811	0.29	0.26	0.29	0.24	0.33	0.29	0.39	0.33
b1820	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
b1821	0.28	0.27	0.31	0.27	0.38	0.33	0.38	0.32
b1828	0.35	0.35	0.35	0.35	0.42	0.42	0.42	0.42
b1843	0.28	0.28	0.28	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
b1965	0.31	0.28	0.31	0.28	0.35	0.35	0.35	0.34
b1971	0.45	0.37	0.41	0.40	0.56	0.47	0.56	0.55
b1973	0.33	0.33	0.33	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40
b1976	0.61	0.37	0.41	0.41	0.50	0.43	0.50	0.50

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>b2060</i>	0.28	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>b2073</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>b2074</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>b2083</i>	0.27	0.23	0.30	0.23	0.31	0.28	0.37	0.28
<i>b2084</i>	0.23	0.21	0.23	0.21	0.24	0.21	0.28	0.24
<i>b2086</i>	0.22	0.18	0.22	0.18	0.25	0.22	0.25	0.25
<i>b2097</i>	0.24	0.23	0.24	0.35	0.38	0.37	0.29	0.24
<i>b2099</i>	0.26	0.26	0.28	0.26	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>b2146</i>	0.27	0.24	0.27	0.27	0.28	0.24	0.33	0.28
<i>b2191</i>	0.28	0.26	0.28	0.26	0.36	0.32	0.32	0.32
<i>b2227</i>	0.29	0.33	0.33	0.33	0.40	0.34	0.40	0.34
<i>b2294</i>	0.26	0.24	0.29	0.24	0.30	0.29	0.33	0.30
<i>b2295</i>	0.30	0.28	0.30	0.28	0.38	0.34	0.34	0.34
<i>b2341</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>b2342</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>b2351</i>	0.40	0.37	0.40	0.37	0.52	0.46	0.46	0.46
<i>b2352</i>	0.32	0.30	0.36	0.32	0.41	0.37	0.42	0.50
<i>b2354</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>b2372</i>	0.25	0.20	0.22	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>b2375</i>	0.39	0.39	0.42	0.39	0.48	0.48	0.47	0.47
<i>b2377</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.30	0.30	0.29
<i>b2384</i>	0.33	0.33	0.33	0.43	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>b2430</i>	0.22	0.20	0.28	0.20	0.28	0.25	0.28	0.28
<i>b2446</i>	0.30	0.26	0.30	0.30	0.73	0.32	0.32	0.32
<i>b2450</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.40	0.35	0.35	0.35
<i>b2460</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>b2503</i>	0.30	0.26	0.39	0.60	0.74	0.32	0.42	0.42
<i>b2505</i>	0.26	0.26	0.29	0.26	0.30	0.30	0.36	0.30
<i>b2603</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>b2635</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>b2638</i>	0.21	0.21	0.28	0.21	0.29	0.26	0.29	0.26
<i>b2657</i>	0.30	0.22	0.30	0.25	0.40	0.31	0.31	0.40
<i>b2689</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.28	0.25	0.28	0.25
<i>b2736</i>	0.23	0.21	0.26	0.19	0.26	0.23	0.27	0.23
<i>b2740</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>b2756</i>	0.23	0.29	0.33	0.29	0.47	0.30	0.35	0.30
<i>b2789</i>	0.20	0.19	0.21	0.19	0.26	0.26	0.23	0.23
<i>b2832</i>	0.31	0.24	0.30	0.31	0.38	0.37	0.38	0.37
<i>b2833</i>	0.27	0.25	0.33	0.25	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>b2859</i>	0.23	0.19	0.21	0.23	0.28	0.29	0.28	0.28
<i>b2873</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>b2875</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>b2896</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.30	0.26	0.26
<i>b2981</i>	0.24	0.22	0.25	0.25	0.39	0.26	0.31	0.30
<i>b2999</i>	0.32	0.29	0.32	0.33	0.39	0.34	0.39	0.33
<i>b3022</i>	0.23	0.21	0.25	0.21	0.29	0.29	0.34	0.29
<i>b3023</i>	0.20	0.19	0.23	0.19	0.26	0.23	0.23	0.23
<i>b3042</i>	0.20	0.18	0.20	0.18	0.25	0.22	0.25	0.22
<i>b3836</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>b3914</i>	0.26	0.24	0.26	0.26	0.30	0.27	0.31	0.30
<i>b4285</i>	0.16	0.16	0.16	0.16	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>bax</i>	0.30	0.28	0.37	0.28	0.38	0.34	0.38	0.34
<i>bcp</i>	0.25	0.23	0.30	0.23	0.31	0.28	0.38	0.31
<i>bioF</i>	0.23	0.21	0.26	0.22	0.30	0.26	0.30	0.27
<i>bolA</i>	0.32	0.32	0.38	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>caiC</i>	0.27	0.26	0.27	0.40	0.43	0.33	0.32	0.27
<i>carA</i>	0.35	0.32	0.35	0.32	0.45	0.39	0.39	0.39
<i>carB</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29



Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>cdd</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>chaA</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>chaA-r</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>chaC</i>	0.27	0.20	0.27	0.20	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>cheR</i>	0.22	0.20	0.24	0.21	0.28	0.25	0.25	0.25
<i>chpB-r</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>clpA</i>	0.21	0.17	0.23	0.17	0.29	0.24	0.24	0.21
<i>clpX</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.37	0.29	0.29	0.29
<i>cmk</i>	0.27	0.25	0.28	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>codA</i>	0.37	0.34	0.37	0.34	0.48	0.42	0.42	0.42
<i>codB</i>	0.36	0.33	0.36	0.33	0.46	0.40	0.40	0.40
<i>cpdB</i>	0.27	0.25	0.34	0.25	0.35	0.31	0.35	0.31
<i>crcA</i>	0.26	0.22	0.26	0.33	0.63	0.35	0.27	0.23
<i>csiE</i>	0.26	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.33	0.29
<i>cspD</i>	0.48	0.45	0.49	0.45	0.55	0.55	0.55	0.55
<i>cspE</i>	0.34	0.34	0.38	0.38	0.44	0.39	0.52	0.39
<i>cspF</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>cspI</i>	0.30	0.27	0.33	0.27	0.38	0.34	0.38	0.38
<i>csrA</i>	0.29	0.27	0.36	0.29	0.37	0.33	0.37	0.37
<i>cstA</i>	0.42	0.42	0.42	0.42	0.51	0.51	0.51	0.51
<i>cutC</i>	0.37	0.37	0.46	0.34	0.47	0.42	0.48	0.47
<i>cvpA</i>	0.26	0.29	0.38	0.29	0.34	0.34	0.30	0.30
<i>cyaA</i>	0.18	0.18	0.20	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>cydA</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>cydB</i>	0.33	0.30	0.36	0.30	0.42	0.37	0.42	0.37
<i>cydD</i>	0.28	0.28	0.31	0.26	0.35	0.31	0.42	0.31
<i>cyoA</i>	0.23	0.23	0.25	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>cyoB</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>cyoC</i>	0.20	0.20	0.22	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>cyoD</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>cysB</i>	0.26	0.21	0.23	0.19	0.27	0.23	0.32	0.24
<i>cysC</i>	0.23	0.22	0.29	0.22	0.30	0.27	0.30	0.31
<i>cysD</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>cysH</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>cysI</i>	0.46	0.39	0.46	0.46	1.12	0.62	0.64	0.64
<i>cysJ</i>	0.30	0.33	0.37	0.38	0.39	0.46	0.46	0.39
<i>cysK</i>	0.26	0.24	0.32	0.26	0.34	0.30	0.34	0.34
<i>cysN</i>	0.23	0.25	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>cysP</i>	0.23	0.22	0.29	0.22	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>cysW</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.30	0.26	0.26	0.26
<i>dadA</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>dapB</i>	0.25	0.23	0.28	0.23	0.32	0.32	0.38	0.32
<i>dapF</i>	0.25	0.23	0.25	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>dbpA</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>dcm</i>	0.27	0.26	0.29	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>dctA</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>ddlA</i>	0.24	0.18	0.24	0.18	0.25	0.22	0.22	0.22
<i>degS</i>	0.34	0.34	0.38	0.34	0.43	0.38	0.43	0.43
<i>deoA</i>	0.28	0.26	0.28	0.26	0.36	0.32	0.32	0.32
<i>deoC</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.35	0.31	0.35	0.31
<i>dfp</i>	0.21	0.23	0.23	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>dgoA</i>	0.27	0.25	0.27	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>dgoK</i>	0.25	0.21	0.25	0.21	0.29	0.25	0.26	0.25
<i>dmsA</i>	0.24	0.23	0.28	0.28	0.67	0.29	0.37	0.29
<i>dnaB</i>	0.27	0.25	0.27	0.25	0.34	0.30	0.34	0.30
<i>dnaJ</i>	0.26	0.28	0.38	0.24	0.33	0.29	0.34	0.29
<i>dnaX</i>	0.21	0.20	0.21	0.20	0.27	0.24	0.28	0.24
<i>dniR</i>	0.24	0.21	0.24	0.24	0.59	0.33	0.26	0.34

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>dppA</i>	0.30	0.28	0.30	0.28	0.39	0.34	0.34	0.34
<i>dppD</i>	0.28	0.26	0.31	0.26	0.37	0.32	0.32	0.32
<i>dut</i>	0.21	0.20	0.23	0.20	0.27	0.24	0.24	0.24
<i>edd</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>emrY</i>	0.26	0.23	0.26	0.27	0.42	0.32	0.32	0.27
<i>eno</i>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>entA-r</i>	0.36	0.30	0.40	0.30	0.41	0.49	0.41	0.37
<i>entB</i>	0.23	0.21	0.28	0.21	0.29	0.26	0.29	0.26
<i>entC</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>eutE</i>	0.18	0.18	0.20	0.17	0.29	0.28	0.22	0.28
<i>exbB</i>	0.25	0.23	0.25	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>exbD</i>	0.23	0.22	0.26	0.22	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>exuR</i>	0.29	0.29	0.32	0.26	0.37	0.32	0.37	0.32
<i>fabD</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>fabF</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.34	0.25	0.33	0.25
<i>fabG</i>	0.35	0.35	0.35	0.35	0.43	0.43	0.43	0.43
<i>fabZ</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>fadL</i>	0.23	0.21	0.23	0.19	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>fadR</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>fabA</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>fdnI-r</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>fecA</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>fecR</i>	0.76	0.77	0.69	0.92	1.25	0.95	0.95	0.95
<i>fhiA</i>	0.24	0.21	0.21	0.19	0.26	0.33	0.26	0.22
<i>fhuA</i>	0.20	0.18	0.22	0.16	0.23	0.20	0.23	0.20
<i>fimA</i>	0.35	0.33	0.39	0.33	0.45	0.40	0.40	0.40
<i>fixA</i>	0.30	0.29	0.29	0.29	0.37	0.37	0.47	0.36
<i>fldA</i>	0.35	0.35	0.35	0.35	0.43	0.43	0.43	0.43
<i>flgA</i>	0.33	0.31	0.33	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>flgB</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>flgC</i>	0.32	0.32	0.35	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>flgD</i>	0.26	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>flgE</i>	0.39	0.36	0.39	0.36	0.44	0.44	0.44	0.44
<i>flgG</i>	0.37	0.34	0.46	0.34	0.48	0.42	0.48	0.42
<i>flgH</i>	0.32	0.30	0.33	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>flgJ</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>flgK</i>	0.40	0.40	0.40	0.40	0.49	0.49	0.49	0.49
<i>flhD</i>	0.28	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>fliA</i>	0.51	0.47	0.51	0.47	0.65	0.58	0.58	0.58
<i>fliD</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.28	0.25	0.25	0.25
<i>fliE</i>	0.36	0.36	0.36	0.36	0.44	0.44	0.44	0.44
<i>fliM</i>	0.40	0.37	0.40	0.37	0.51	0.45	0.46	0.45
<i>fliS</i>	0.27	0.27	0.34	0.25	0.35	0.35	0.41	0.35
<i>fliZ</i>	0.24	0.22	0.29	0.22	0.30	0.27	0.27	0.30
<i>focA</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>folC</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>fruA</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>ftn</i>	0.21	0.19	0.23	0.19	0.27	0.23	0.27	0.23
<i>ftsA</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>ftsZ</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>fusA</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>galP</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.34	0.33	0.33
<i>galT</i>	0.33	0.33	0.36	0.33	0.41	0.47	0.41	0.41
<i>gapA</i>	0.29	0.29	0.32	0.29	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>gapA-r</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.35	0.30	0.35	0.30
<i>gatA</i>	0.47	0.43	0.52	0.43	0.60	0.53	0.60	0.54
<i>gatB</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>gatC</i>	0.40	0.40	0.40	0.40	0.49	0.49	0.49	0.49

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>gatD</i>	0.34	0.31	0.37	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>gatY</i>	0.31	0.28	0.28	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>gatY-r</i>	0.33	0.33	0.36	0.33	0.46	0.40	0.40	0.40
<i>gatZ</i>	0.39	0.39	0.39	0.39	0.48	0.48	0.48	0.48
<i>gcd</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>gcvH</i>	0.24	0.22	0.30	0.22	0.31	0.31	0.31	0.27
<i>gcvT</i>	0.26	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.33	0.29
<i>glcB</i>	0.24	0.20	0.27	0.24	0.28	0.28	0.28	0.25
<i>glcC</i>	0.26	0.24	0.32	0.24	0.33	0.33	0.33	0.29
<i>glcF</i>	0.45	0.42	0.50	0.42	0.58	0.51	0.52	0.51
<i>glcG</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>glgA</i>	0.26	0.24	0.29	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>glgB</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>glgP</i>	0.23	0.21	0.25	0.21	0.29	0.26	0.29	0.26
<i>glk</i>	0.27	0.22	0.27	0.22	0.31	0.28	0.31	0.28
<i>glnB</i>	0.30	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.35
<i>glnH</i>	0.35	0.32	0.32	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>glnP</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>glnQ</i>	0.33	0.33	0.39	0.33	0.40	0.35	0.40	0.34
<i>glpF</i>	0.32	0.29	0.35	0.29	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>glpK</i>	0.29	0.29	0.40	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>gltA</i>	0.42	0.39	0.47	0.39	0.54	0.47	0.48	0.47
<i>gltB</i>	0.34	0.31	0.34	0.31	0.43	0.38	0.44	0.38
<i>gltP</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>glyA</i>	0.20	0.18	0.22	0.18	0.25	0.25	0.25	0.22
<i>gmk</i>	0.28	0.26	0.30	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>gnd</i>	0.26	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>gntP</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>goaG</i>	0.27	0.21	0.27	0.20	0.33	0.24	0.33	0.27
<i>gpmB</i>	0.23	0.21	0.26	0.20	0.27	0.28	0.32	0.24
<i>greB</i>	0.30	0.29	0.30	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>grxA</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.28	0.24	0.24	0.25
<i>grxB</i>	0.31	0.23	0.31	0.31	0.32	0.38	0.32	0.32
<i>gshA</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>guaA</i>	0.33	0.30	0.41	0.30	0.43	0.37	0.43	0.42
<i>guaB</i>	0.26	0.24	0.33	0.29	0.34	0.30	0.34	0.34
<i>guaC</i>	0.33	0.31	0.33	0.31	0.43	0.38	0.38	0.38
<i>gutM</i>	0.21	0.17	0.23	0.17	0.24	0.24	0.24	0.21
<i>hcaR</i>	0.28	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.33	0.29
<i>hcaR-r</i>	0.27	0.25	0.33	0.25	0.34	0.30	0.34	0.30
<i>hcaT</i>	0.28	0.28	0.31	0.26	0.36	0.32	0.42	0.31
<i>hdeA</i>	0.23	0.21	0.25	0.23	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>hdhA</i>	0.20	0.18	0.22	0.18	0.25	0.22	0.25	0.22
<i>hemG</i>	0.17	0.17	0.19	0.16	0.22	0.19	0.19	0.19
<i>hemL</i>	0.67	0.62	0.83	0.62	0.86	0.76	0.86	0.76
<i>hemM</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>hflC</i>	0.28	0.26	0.31	0.26	0.36	0.31	0.31	0.31
<i>hflK</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>hflX</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>hha</i>	0.26	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.33	0.33
<i>himD</i>	0.33	0.30	0.36	0.30	0.42	0.37	0.37	0.37
<i>hipA</i>	0.25	0.23	0.31	0.23	0.32	0.28	0.32	0.32
<i>hisC</i>	0.27	0.27	0.30	0.27	0.38	0.33	0.33	0.33
<i>hisF</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>hns</i>	0.32	0.27	0.32	0.27	0.58	0.45	0.38	0.45
<i>holC</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.29	0.25	0.25	0.25
<i>hpt</i>	0.25	0.23	0.27	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>hsdM-r</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>hsIJ</i>	0.27	0.25	0.28	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>hsIV</i>	0.25	0.23	0.27	0.23	0.32	0.32	0.32	0.28
<i>htgA</i>	0.34	0.25	0.34	0.25	0.41	0.31	0.35	0.35
<i>htrE</i>	0.29	0.24	0.29	0.24	0.34	0.30	0.34	0.34
<i>hupA</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>hupB</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>hupB-r</i>	0.28	0.28	0.30	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>hybC</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>hydH</i>	0.36	0.29	0.36	0.32	0.37	0.34	0.45	0.44
<i>hyfA</i>	0.22	0.20	0.24	0.20	0.25	0.29	0.29	0.25
<i>hyfB</i>	0.59	0.54	0.60	0.49	0.69	0.60	0.82	0.60
<i>hypF</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>icdA</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>idnT</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>ileS</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>ilvB</i>	0.31	0.31	0.33	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>ilvC</i>	0.39	0.39	0.42	0.39	0.55	0.47	0.47	0.47
<i>ilvG_1</i>	0.22	0.20	0.24	0.20	0.28	0.25	0.28	0.25
<i>ilvH</i>	0.25	0.25	0.27	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>ilvM</i>	0.31	0.28	0.31	0.28	0.39	0.35	0.35	0.35
<i>ilvN</i>	0.28	0.23	0.28	0.23	0.32	0.28	0.32	0.28
<i>infA</i>	0.31	0.31	0.34	0.31	0.39	0.38	0.38	0.38
<i>insB_2</i>	0.27	0.25	0.27	0.25	0.35	0.30	0.30	0.30
<i>intB</i>	0.22	0.20	0.27	0.20	0.28	0.24	0.28	0.24
<i>kdul</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>kgtP</i>	0.25	0.23	0.25	0.23	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>ksgA</i>	0.27	0.27	0.28	0.27	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>lamB</i>	0.36	0.36	0.36	0.36	0.45	0.45	0.45	0.45
<i>ldhA</i>	0.54	0.41	0.48	0.49	0.56	0.55	0.66	0.55
<i>lepB</i>	0.21	0.21	0.24	0.25	0.26	0.33	0.33	0.25
<i>lgt</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.36	0.37	0.36	0.36
<i>lig</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>livF</i>	0.44	0.44	0.49	0.41	0.57	0.51	0.57	0.57
<i>lldP</i>	0.28	0.23	0.31	0.23	0.32	0.28	0.38	0.32
<i>lldR</i>	0.34	0.29	0.29	0.29	0.40	0.35	0.40	0.35
<i>lrhA</i>	0.21	0.20	0.26	0.20	0.27	0.24	0.27	0.24
<i>lysP</i>	0.26	0.24	0.29	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>lysS</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>malE</i>	0.35	0.29	0.40	0.29	0.41	0.36	0.41	0.36
<i>malF</i>	0.36	0.30	0.36	0.30	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>malK</i>	0.33	0.30	0.36	0.30	0.50	0.37	0.42	0.37
<i>malM</i>	0.33	0.33	0.41	0.30	0.42	0.43	0.50	0.42
<i>malT</i>	0.25	0.25	0.30	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>malX</i>	0.24	0.22	0.27	0.20	0.28	0.24	0.33	0.28
<i>manX</i>	0.31	0.29	0.35	0.29	0.40	0.40	0.48	0.40
<i>manY</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>manZ</i>	0.27	0.22	0.30	0.27	0.32	0.31	0.37	0.31
<i>map</i>	0.27	0.22	0.27	0.23	0.31	0.27	0.31	0.27
<i>mcrA</i>	0.34	0.30	0.40	0.35	0.54	0.31	0.43	0.42
<i>mcrB</i>	0.31	0.28	0.34	0.28	0.39	0.35	0.39	0.35
<i>meiB</i>	0.23	0.21	0.26	0.19	0.27	0.24	0.32	0.27
<i>menG</i>	0.85	0.75	0.68	0.75	1.03	1.03	1.03	1.03
<i>mesJ</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>metA</i>	0.20	0.17	0.23	0.19	0.24	0.24	0.28	0.24
<i>metE</i>	0.42	0.39	0.52	0.39	0.54	0.47	0.47	0.47
<i>metF</i>	0.31	0.32	0.35	0.26	0.36	0.32	0.36	0.32
<i>mgIA</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>mgIB</i>	0.28	0.26	0.29	0.26	0.36	0.32	0.32	0.32

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>mgsA</i>	0.18	0.23	0.23	0.17	0.24	0.21	0.28	0.24
<i>mhpD</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>mhpD-r</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>mhpE</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>mhpF</i>	0.29	0.29	0.39	0.29	0.36	0.35	0.35	0.35
<i>mhpR</i>	0.32	0.30	0.30	0.30	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>minC</i>	0.31	0.28	0.34	0.28	0.40	0.35	0.40	0.35
<i>minD</i>	0.31	0.28	0.38	0.31	0.39	0.35	0.40	0.39
<i>mioC</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>modA</i>	0.41	0.41	0.41	0.41	0.51	0.51	0.51	0.51
<i>modB</i>	0.35	0.39	0.44	0.33	0.45	0.40	0.54	0.40
<i>modF</i>	0.23	0.21	0.25	0.21	0.29	0.26	0.26	0.26
<i>motA</i>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>mrca</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>mrdB</i>	0.19	0.18	0.19	0.18	0.25	0.22	0.22	0.22
<i>mrp</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>msrA</i>	0.23	0.21	0.28	0.21	0.29	0.25	0.29	0.25
<i>mukE</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>murl</i>	0.20	0.20	0.21	0.20	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>mutH</i>	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>mutL</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>nac</i>	0.28	0.28	0.30	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>nadA</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>nagE</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>nanT</i>	0.30	0.30	0.37	0.33	0.38	0.34	0.45	0.34
<i>napG</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>napH</i>	0.25	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>narG</i>	0.28	0.23	0.28	0.21	0.29	0.30	0.35	0.29
<i>narJ</i>	0.52	0.38	0.46	0.38	0.53	0.63	0.53	0.53
<i>narV</i>	0.25	0.22	0.27	0.22	0.31	0.28	0.31	0.32
<i>nikC</i>	0.20	0.20	0.22	0.17	0.23	0.20	0.27	0.23
<i>nlpA</i>	0.21	0.20	0.24	0.20	0.27	0.24	0.27	0.24
<i>nlpD</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>nmpC</i>	0.52	0.48	0.52	0.48	0.66	0.58	0.58	0.58
<i>nrdF</i>	0.32	0.32	0.33	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>nrdI</i>	0.23	0.20	0.23	0.20	0.24	0.37	0.28	0.24
<i>nrfB</i>	0.23	0.21	0.29	0.25	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>ntpA</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>nuoA</i>	0.35	0.32	0.38	0.32	0.45	0.39	0.40	0.39
<i>nuoB</i>	0.35	0.35	0.41	0.35	0.48	0.42	0.43	0.42
<i>nuoF</i>	0.29	0.29	0.32	0.29	0.35	0.35	0.36	0.35
<i>nusG</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>ompT</i>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>ompX</i>	0.22	0.22	0.24	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>otsB</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>oxyR</i>	0.19	0.19	0.23	0.17	0.24	0.21	0.24	0.21
<i>pabC</i>	0.30	0.26	0.31	0.40	0.75	0.41	0.33	0.32
<i>pal</i>	0.29	0.26	0.36	0.26	0.37	0.33	0.37	0.33
<i>pbpC</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.23	0.20	0.23	0.20
<i>pepA</i>	0.19	0.17	0.23	0.20	0.24	0.24	0.28	0.21
<i>pepP</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>pfkA</i>	0.35	0.35	0.39	0.46	0.63	0.49	0.63	0.41
<i>pfkB</i>	0.33	0.27	0.37	0.27	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>pflA</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>pflB</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.33	0.25	0.33	0.28
<i>pflC</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>pgk</i>	0.22	0.22	0.23	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>pgpA</i>	0.29	0.26	0.29	0.26	0.37	0.32	0.32	0.32

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>pheS</i>	0.28	0.26	0.31	0.26	0.36	0.31	0.42	0.36
<i>phnC</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.24	0.25	0.24	0.24
<i>phnK-r</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.28	0.28	0.28	0.24
<i>phoH</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>pntA</i>	0.28	0.28	0.27	0.27	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>potA</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>potC</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>ppiA</i>	0.27	0.24	0.30	0.27	0.37	0.37	0.47	0.31
<i>pqiB</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>prfB</i>	0.31	0.28	0.31	0.28	0.40	0.35	0.35	0.35
<i>priB</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>prlA</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>proV</i>	0.28	0.26	0.31	0.26	0.36	0.32	0.36	0.32
<i>proW</i>	0.22	0.22	0.22	0.24	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>prpB</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>prpC</i>	0.24	0.21	0.24	0.25	0.60	0.33	0.33	0.34
<i>prsA</i>	0.27	0.24	0.25	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>pspD</i>	0.32	0.29	0.36	0.32	0.37	0.32	0.44	0.37
<i>pssA</i>	0.22	0.19	0.25	0.19	0.26	0.23	0.26	0.23
<i>ptr</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>ptxA</i>	0.21	0.17	0.21	0.18	0.21	0.22	0.22	0.21
<i>purA</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>purE</i>	0.26	0.23	0.26	0.23	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>purF</i>	0.27	0.30	0.33	0.27	0.35	0.35	0.41	0.34
<i>purM</i>	0.36	0.36	0.36	0.36	0.44	0.44	0.44	0.44
<i>purN</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>purU</i>	0.21	0.23	0.31	0.23	0.42	0.28	0.33	0.32
<i>pykF</i>	0.25	0.25	0.27	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>pyrB</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37
<i>pyrC</i>	0.26	0.24	0.32	0.24	0.33	0.33	0.29	0.29
<i>pyrF</i>	0.33	0.37	0.37	0.43	1.05	0.45	0.45	0.45
<i>pyrG</i>	0.34	0.31	0.31	0.31	0.43	0.38	0.38	0.38
<i>pyrH</i>	0.31	0.28	0.34	0.29	0.40	0.35	0.40	0.35
<i>pyrI</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>queA</i>	0.26	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>radC</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>rbn</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>rbsB</i>	0.48	0.44	0.48	0.44	0.55	0.54	0.54	0.54
<i>recF</i>	0.23	0.21	0.25	0.21	0.29	0.26	0.29	0.26
<i>recJ</i>	0.41	0.33	0.41	0.31	0.42	0.38	0.50	0.42
<i>rfaI</i>	0.28	0.28	0.34	0.28	0.39	0.34	0.39	0.34
<i>rfaL</i>	0.22	0.22	0.27	0.22	0.28	0.27	0.27	0.27
<i>rfbA</i>	0.31	0.29	0.39	0.29	0.40	0.35	0.40	0.35
<i>rfbB</i>	0.28	0.25	0.26	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>rfbC</i>	0.27	0.22	0.27	0.22	0.28	0.43	0.78	0.34
<i>rfbD</i>	0.35	0.32	0.38	0.32	0.45	0.39	0.39	0.39
<i>rfbX</i>	0.32	0.29	0.32	0.29	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>rffG</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>rhaT</i>	0.23	0.21	0.23	0.21	0.29	0.26	0.26	0.26
<i>rhoL</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>ribA</i>	0.28	0.32	0.31	0.32	0.90	0.39	0.39	0.32
<i>ribD</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>ribH</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>rlpB</i>	0.42	0.47	0.47	0.40	0.55	0.54	0.64	0.54
<i>rmf</i>	0.39	0.39	0.39	0.39	0.47	0.47	0.47	0.47
<i>rmf-r</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>rnc</i>	0.20	0.20	0.21	0.20	0.27	0.27	0.24	0.27
<i>rnt</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.27	0.31	0.31	0.27

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>rpe</i>	0.14	0.14	0.14	0.14	0.17	0.17	0.17	0.17
<i>rpiA</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>rplA</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>rplB</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>rplC</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>rplD</i>	0.35	0.35	0.35	0.35	0.43	0.43	0.43	0.43
<i>rplE</i>	0.33	0.30	0.33	0.30	0.42	0.37	0.50	0.37
<i>rplF</i>	0.31	0.28	0.31	0.28	0.39	0.35	0.35	0.35
<i>rplI</i>	0.22	0.24	0.30	0.30	0.47	0.31	0.36	0.31
<i>rplK</i>	0.22	0.22	0.27	0.22	0.31	0.31	0.31	0.27
<i>rplL</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>rplM</i>	0.29	0.29	0.39	0.29	0.40	0.36	0.36	0.35
<i>rplN</i>	0.29	0.27	0.29	0.27	0.38	0.33	0.33	0.33
<i>rplN-r</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>rplP</i>	0.26	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>rplR</i>	0.31	0.29	0.34	0.29	0.40	0.35	0.40	0.35
<i>rplS</i>	0.36	0.42	0.36	0.55	0.46	0.58	0.46	0.46
<i>rplS-r</i>	0.21	0.21	0.24	0.21	0.24	0.29	0.29	0.29
<i>rplU</i>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>rplV</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>rplW</i>	0.30	0.29	0.32	0.29	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>rplX</i>	0.25	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>rplX-r</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>rplY</i>	0.45	0.45	0.45	0.45	0.55	0.55	0.55	0.55
<i>rpmA</i>	0.35	0.35	0.35	0.35	0.43	0.43	0.43	0.43
<i>rpmB</i>	0.34	0.32	0.38	0.32	0.44	0.39	0.39	0.39
<i>rpmC</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>rpmD</i>	0.26	0.26	0.29	0.27	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>rpmE</i>	0.25	0.25	0.27	0.25	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>rpmF</i>	0.22	0.20	0.24	0.20	0.28	0.25	0.28	0.25
<i>rpmH</i>	0.29	0.29	0.32	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>rpmJ</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>rpoA</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.30	0.29	0.29	0.29
<i>rpoB</i>	0.27	0.25	0.34	0.25	0.35	0.35	0.35	0.31
<i>rpoB-r</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.28	0.25	0.25	0.25
<i>rpoE</i>	0.34	0.32	0.42	0.31	0.44	0.38	0.44	0.38
<i>rpoZ</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>rpsB</i>	0.42	0.41	0.45	0.41	0.51	0.51	0.51	0.51
<i>rpsC</i>	0.21	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>rpsD</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.41	0.41	0.41	0.41
<i>rpsE</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>rpsF</i>	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>rpsG</i>	0.28	0.26	0.26	0.26	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>rpsH</i>	0.30	0.28	0.30	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>rpsJ</i>	0.26	0.24	0.24	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>rpsK</i>	0.35	0.33	0.35	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>rpsL</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>rpsM</i>	0.27	0.25	0.27	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>rpsN</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>rpsP</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>rpsQ</i>	0.26	0.26	0.31	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>rpsR</i>	0.18	0.18	0.20	0.18	0.25	0.23	0.25	0.22
<i>rpsS</i>	0.35	0.32	0.38	0.32	0.45	0.39	0.40	0.39
<i>rpsT</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.35	0.31	0.31	0.35
<i>rpsU</i>	0.30	0.28	0.30	0.28	0.38	0.34	0.38	0.34
<i>rpsV</i>	0.35	0.33	0.39	0.33	0.45	0.40	0.40	0.40
<i>rseC</i>	0.28	0.28	0.24	0.28	0.39	0.38	0.38	0.29
<i>rspB</i>	0.46	0.32	0.39	0.32	0.42	0.41	0.49	0.41

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>rus-r</i>	0.21	0.17	0.23	0.17	0.24	0.21	0.21	0.21
<i>sapA</i>	0.28	0.25	0.31	0.28	0.32	0.29	0.38	0.32
<i>sbcC</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>sbcD</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>sbmC</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>sdhA</i>	0.29	0.27	0.29	0.27	0.37	0.33	0.33	0.33
<i>sdhA-r</i>	0.30	0.27	0.30	0.27	0.38	0.33	0.33	0.33
<i>sdhB</i>	0.26	0.24	0.29	0.24	0.30	0.30	0.40	0.30
<i>sdhC</i>	0.32	0.29	0.40	0.32	0.40	0.41	0.48	0.40
<i>sdhD</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>seqA</i>	0.41	0.38	0.46	0.38	0.53	0.53	0.63	0.53
<i>serA</i>	0.23	0.21	0.28	0.21	0.29	0.25	0.29	0.25
<i>serS</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>sfmC</i>	0.29	0.26	0.34	0.26	0.46	0.31	0.46	0.30
<i>sfmF-r</i>	0.23	0.20	0.26	0.20	0.27	0.24	0.32	0.27
<i>sfmH</i>	0.24	0.20	0.22	0.21	0.28	0.25	0.28	0.25
<i>sfsA</i>	0.32	0.30	0.35	0.30	0.41	0.36	0.41	0.36
<i>sgcQ</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>sgcX</i>	0.26	0.26	0.27	0.26	0.37	0.32	0.33	0.32
<i>slyB</i>	0.44	0.44	0.44	0.44	0.53	0.53	0.53	0.53
<i>smf_2</i>	0.24	0.22	0.24	0.22	0.25	0.25	0.39	0.25
<i>smg</i>	0.22	0.22	0.23	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>smpB</i>	0.26	0.24	0.32	0.24	0.33	0.29	0.33	0.33
<i>sodA</i>	0.17	0.19	0.16	0.16	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>speB</i>	0.20	0.19	0.25	0.19	0.26	0.23	0.26	0.26
<i>speD</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>speE</i>	0.31	0.31	0.42	0.31	0.43	0.38	0.44	0.51
<i>spoU</i>	0.27	0.27	0.36	0.31	0.49	0.39	0.38	0.39
<i>spr</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>srlA</i>	0.29	0.21	0.29	0.22	0.30	0.36	0.30	0.30
<i>srlE</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.28	0.25	0.28	0.28
<i>srlR</i>	0.17	0.16	0.21	0.16	0.22	0.19	0.22	0.22
<i>srmB</i>	0.33	0.28	0.28	0.33	0.46	0.44	0.80	0.35
<i>sspA</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.29	0.26	0.26	0.26
<i>stpA</i>	0.27	0.24	0.27	0.27	0.34	0.33	0.33	0.33
<i>sucA</i>	0.21	0.19	0.26	0.19	0.27	0.24	0.27	0.27
<i>sucD</i>	0.29	0.26	0.31	0.26	0.37	0.32	0.37	0.32
<i>sugE</i>	0.23	0.22	0.26	0.27	0.37	0.28	0.28	0.28
<i>talC</i>	0.22	0.20	0.27	0.20	0.28	0.25	0.28	0.25
<i>tdcR</i>	0.28	0.23	0.31	0.25	0.32	0.29	0.32	0.32
<i>thiF</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>thrA</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.30	0.30	0.30
<i>thrB</i>	0.29	0.27	0.32	0.27	0.37	0.33	0.33	0.33
<i>thrC</i>	0.29	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>tig</i>	0.20	0.20	0.24	0.20	0.28	0.24	0.28	0.24
<i>tnaA</i>	0.59	0.50	0.54	0.50	0.61	0.61	0.61	0.61
<i>tolA</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>tolB</i>	0.31	0.29	0.31	0.29	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>topB</i>	0.33	0.33	0.33	0.33	0.40	0.41	0.40	0.40
<i>torA</i>	0.24	0.18	0.24	0.20	0.30	0.22	0.25	0.25
<i>torS</i>	0.58	0.25	0.29	0.38	0.41	0.40	0.41	0.40
<i>tpiA</i>	0.20	0.20	0.24	0.20	0.28	0.25	0.25	0.25
<i>tpr</i>	0.29	0.26	0.27	0.26	0.37	0.32	0.32	0.32
<i>tra5_1</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>tra8_1</i>	0.25	0.25	0.28	0.23	0.32	0.29	0.38	0.32
<i>treA</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>treB</i>	0.31	0.29	0.35	0.35	0.36	0.32	0.43	0.36
<i>trg</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25



Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>trmD</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>trmD-r</i>	0.44	0.44	0.44	0.44	0.60	0.60	0.60	0.60
<i>trpB</i>	0.28	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>trpC</i>	0.29	0.26	0.29	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>trpC-r</i>	0.24	0.22	0.24	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>trpD</i>	0.27	0.25	0.33	0.25	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>trpE</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>trpL</i>	0.27	0.25	0.30	0.27	0.35	0.31	0.35	0.31
<i>trs5_1</i>	0.38	0.35	0.38	0.35	0.43	0.43	0.43	0.43
<i>trs5_5</i>	0.37	0.37	0.40	0.37	0.46	0.46	0.46	0.46
<i>truB</i>	0.22	0.20	0.24	0.20	0.28	0.24	0.25	0.24
<i>tufA</i>	0.26	0.26	0.28	0.26	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>ubiC</i>	0.37	0.37	0.40	0.37	0.46	0.46	0.46	0.46
<i>ubiX</i>	0.20	0.17	0.22	0.20	0.23	0.23	0.27	0.23
<i>udp</i>	0.24	0.22	0.27	0.22	0.31	0.27	0.27	0.27
<i>ugd</i>	0.22	0.22	0.26	0.22	0.30	0.26	0.26	0.26
<i>ugpC</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>uidA</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>uidC</i>	0.22	0.16	0.22	0.16	0.23	0.20	0.23	0.20
<i>unknown</i>	0.27	0.20	0.27	0.20	0.27	0.24	0.27	0.24
<i>unknown</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>unknown</i>	0.23	0.20	0.23	0.20	0.27	0.24	0.27	0.24
<i>unknown</i>	0.19	0.19	0.22	0.19	0.26	0.31	0.26	0.23
<i>unknown</i>	0.30	0.30	0.33	0.30	0.42	0.37	0.37	0.37
<i>unknown</i>	0.30	0.25	0.30	0.27	0.31	0.37	0.31	0.28
<i>unknown</i>	0.24	0.21	0.24	0.24	0.29	0.37	0.68	0.29
<i>unknown</i>	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>unknown</i>	0.20	0.20	0.24	0.24	0.25	0.32	0.25	0.25
<i>unknown</i>	0.54	0.49	0.60	0.60	0.74	0.75	0.63	0.62
<i>unknown</i>	0.23	0.17	0.23	0.17	0.23	0.21	0.28	0.21
<i>unknown</i>	0.26	0.22	0.30	0.22	0.31	0.27	0.27	0.27
<i>unknown</i>	0.31	0.29	0.34	0.29	0.40	0.40	0.40	0.35
<i>unknown</i>	0.29	0.29	0.32	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>unknown</i>	0.53	0.39	0.48	0.39	0.55	0.55	0.48	0.49
<i>unknown</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>unknown</i>	0.28	0.28	0.28	0.33	0.34	0.29	0.34	0.29
<i>unknown</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>unknown</i>	0.28	0.26	0.28	0.26	0.36	0.32	0.32	0.32
<i>unknown</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>unknown</i>	0.41	0.40	0.40	0.40	0.50	0.50	0.50	0.50
<i>uvrB</i>	0.66	0.45	0.51	0.56	0.70	0.59	0.69	0.69
<i>uxaB</i>	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>uxaC</i>	0.22	0.21	0.29	0.21	0.30	0.30	0.30	0.26
<i>wbbH</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>wbbI</i>	0.44	0.41	0.41	0.41	0.51	0.50	0.50	0.50
<i>wbbJ</i>	0.35	0.32	0.39	0.32	0.45	0.39	0.45	0.40
<i>wcaB</i>	0.19	0.19	0.23	0.17	0.24	0.28	0.28	0.24
<i>wcaF</i>	0.25	0.23	0.33	0.25	0.29	0.26	0.34	0.29
<i>wcaJ</i>	0.21	0.20	0.24	0.20	0.27	0.24	0.24	0.24
<i>wecB</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>wecE</i>	0.18	0.20	0.27	0.20	0.23	0.28	0.28	0.23
<i>wzzE</i>	0.27	0.23	0.23	0.27	0.28	0.28	0.65	0.37
<i>xerC</i>	0.24	0.22	0.30	0.22	0.31	0.31	0.31	0.27
<i>xerD</i>	0.28	0.28	0.33	0.33	0.80	0.44	0.44	0.34
<i>xylB</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>xylE</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>xylF</i>	0.28	0.25	0.28	0.21	0.29	0.26	0.34	0.29
<i>yaaA</i>	0.19	0.17	0.22	0.16	0.22	0.20	0.26	0.22

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yaaI</i>	0.23	0.19	0.21	0.19	0.37	0.28	0.29	0.24
<i>yabH</i>	0.29	0.27	0.32	0.27	0.33	0.33	0.37	0.33
<i>yabQ</i>	0.25	0.23	0.27	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>yadF</i>	0.27	0.25	0.28	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>yadK</i>	0.22	0.20	0.22	0.22	0.35	0.35	0.27	0.27
<i>yadT</i>	0.48	0.24	0.24	0.31	0.59	0.33	0.59	0.59
<i>yaeT</i>	0.30	0.28	0.38	0.30	0.39	0.34	0.35	0.34
<i>yafA</i>	0.24	0.24	0.30	0.30	0.31	0.27	0.37	0.31
<i>yafX</i>	0.30	0.30	0.30	0.27	0.38	0.32	0.37	0.38
<i>yafZ</i>	0.30	0.25	0.30	0.25	0.34	0.31	0.35	0.34
<i>yagD</i>	0.30	0.30	0.32	0.30	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>yagN</i>	0.41	0.38	0.51	0.38	0.52	0.47	0.53	0.52
<i>yagY</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yahC</i>	0.20	0.18	0.23	0.18	0.58	0.25	0.25	0.21
<i>yahE</i>	0.26	0.23	0.26	0.26	0.28	0.28	0.32	0.27
<i>yahN</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>yahO</i>	0.37	0.34	0.46	0.34	0.48	0.42	0.42	0.42
<i>yaiE</i>	0.35	0.26	0.31	0.26	0.42	0.32	0.42	0.36
<i>yaiV</i>	0.60	0.46	0.46	0.76	0.82	0.82	0.63	0.54
<i>yajK</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>yajQ</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>ybaA</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>ybaJ</i>	0.73	0.37	0.47	0.73	0.90	0.51	0.90	0.90
<i>ybaT</i>	0.39	0.58	0.46	0.47	1.12	0.49	1.12	0.64
<i>ycbJ</i>	0.19	0.19	0.24	0.18	0.25	0.22	0.29	0.22
<i>ycbM</i>	0.24	0.21	0.24	0.19	0.24	0.25	0.29	0.24
<i>ycbR</i>	0.19	0.19	0.23	0.22	0.23	0.26	0.23	0.23
<i>ycbT</i>	0.33	0.32	0.39	0.33	0.53	0.52	0.34	0.40
<i>ycbU</i>	0.28	0.28	0.32	0.37	0.50	0.34	0.39	0.38
<i>ybeJ</i>	0.26	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.33	0.29
<i>ybeK</i>	0.27	0.24	0.29	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>ybeR</i>	0.37	0.32	0.37	0.38	0.52	0.50	0.39	0.39
<i>ybeT</i>	0.37	0.31	0.37	0.34	0.44	0.43	0.43	0.39
<i>ybeV</i>	0.23	0.21	0.25	0.21	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>ybeX</i>	0.37	0.37	0.41	0.49	0.44	0.52	0.51	0.43
<i>ybeZ</i>	0.44	0.50	0.43	0.44	0.53	0.68	0.53	0.52
<i>ybfB</i>	0.22	0.20	0.22	0.32	0.36	0.35	0.35	0.23
<i>ybfD</i>	0.25	0.23	0.27	0.23	0.32	0.28	0.28	0.28
<i>ybfF</i>	0.27	0.24	0.27	0.32	0.33	0.28	0.33	0.28
<i>ybfH</i>	0.33	0.30	0.36	0.30	0.42	0.37	0.37	0.37
<i>ybgF</i>	0.27	0.25	0.33	0.25	0.34	0.30	0.34	0.34
<i>ybgJ</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>ybgL</i>	0.29	0.27	0.36	0.27	0.37	0.33	0.44	0.33
<i>ybiC</i>	0.22	0.21	0.28	0.21	0.29	0.25	0.35	0.25
<i>ybjD</i>	0.47	0.42	0.47	0.47	0.58	0.57	0.48	0.57
<i>ybjW</i>	0.32	0.24	0.26	0.24	0.34	0.33	0.33	0.33
<i>ybjX</i>	0.22	0.21	0.28	0.21	0.29	0.29	0.29	0.25
<i>ybjZ</i>	0.17	0.17	0.18	0.15	0.21	0.19	0.25	0.21
<i>ycaK</i>	0.24	0.23	0.27	0.22	0.31	0.27	0.27	0.27
<i>ycaN</i>	0.35	0.31	0.35	0.41	0.57	0.55	0.42	0.36
<i>ycbK</i>	0.37	0.34	0.37	0.34	0.47	0.41	0.42	0.41
<i>ycbQ</i>	0.33	0.25	0.33	0.29	0.34	0.35	0.34	0.34
<i>ycbS</i>	0.28	0.28	0.32	0.28	0.45	0.28	0.33	0.28
<i>ycbY</i>	0.26	0.23	0.30	0.23	0.26	0.24	0.27	0.27
<i>yccV</i>	0.34	0.35	0.51	0.41	0.98	0.43	0.43	0.43
<i>ycdR</i>	0.23	0.24	0.24	0.24	0.28	0.27	0.32	0.27
<i>ycdS</i>	0.24	0.24	0.32	0.28	0.29	0.29	0.33	0.25
<i>ycdU</i>	0.33	0.27	0.30	0.28	0.38	0.33	0.38	0.38

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yceD</i>	0.46	0.42	0.46	0.42	0.59	0.52	0.52	0.52
<i>yceE</i>	0.54	0.50	0.54	0.50	0.69	0.61	0.69	0.61
<i>yceI</i>	0.29	0.27	0.29	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>yceK</i>	0.25	0.23	0.28	0.23	0.32	0.28	0.29	0.28
<i>yceO</i>	0.32	0.28	0.32	0.33	0.79	0.44	0.79	0.45
<i>ycfB</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>ycfC</i>	0.33	0.31	0.33	0.31	0.43	0.38	0.38	0.38
<i>ycfJ</i>	0.42	0.38	0.46	0.38	0.53	0.47	0.47	0.47
<i>ycfL</i>	0.27	0.27	0.29	0.25	0.34	0.30	0.41	0.30
<i>ycfM</i>	0.35	0.32	0.35	0.32	0.44	0.39	0.44	0.44
<i>ycgJ</i>	0.40	0.37	0.40	0.37	0.45	0.45	0.52	0.45
<i>ycgN</i>	0.24	0.22	0.24	0.22	0.27	0.28	0.27	0.27
<i>ycgR</i>	0.33	0.30	0.33	0.30	0.38	0.38	0.37	0.37
<i>ycaA</i>	0.26	0.24	0.29	0.24	0.34	0.30	0.34	0.34
<i>ycaE</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>ycaF</i>	0.31	0.26	0.35	0.26	0.36	0.31	0.36	0.36
<i>ycaG</i>	0.21	0.19	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.22
<i>ycaH</i>	0.28	0.26	0.31	0.26	0.36	0.32	0.36	0.32
<i>ycaJ</i>	0.26	0.24	0.32	0.24	0.33	0.29	0.33	0.33
<i>ycaK</i>	0.77	0.68	0.69	0.58	0.79	0.94	0.94	0.79
<i>ycaP</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>ycaK</i>	0.30	0.30	0.35	0.36	0.37	0.28	0.37	0.31
<i>ycaW</i>	0.29	0.26	0.33	0.29	0.34	0.34	0.40	0.34
<i>ycjL</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>ycjO</i>	0.28	0.26	0.35	0.26	0.36	0.31	0.36	0.36
<i>ycjQ</i>	0.25	0.21	0.25	0.49	0.60	0.26	0.26	0.60
<i>ycjT</i>	0.21	0.17	0.18	0.18	0.21	0.19	0.25	0.19
<i>ycjW</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>ycjZ</i>	0.22	0.18	0.23	0.20	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>ydaA</i>	0.27	0.22	0.25	0.22	0.31	0.27	0.27	0.27
<i>ydaH</i>	0.25	0.21	0.21	0.21	0.46	0.35	0.30	0.35
<i>ydaO</i>	0.23	0.20	0.23	0.23	0.28	0.36	0.28	0.23
<i>ydbD</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>ydbO</i>	0.26	0.26	0.28	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>ydcF</i>	0.28	0.20	0.28	0.20	0.28	0.25	0.28	0.25
<i>ydcH</i>	0.30	0.25	0.30	0.25	0.35	0.35	0.35	0.31
<i>ydeB</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>ydeF</i>	0.28	0.26	0.31	0.26	0.36	0.32	0.31	0.31
<i>ydfE</i>	0.27	0.20	0.25	0.20	0.34	0.25	0.28	0.25
<i>ydfH</i>	0.37	0.31	0.41	0.31	0.43	0.50	0.43	0.43
<i>ydgO</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>ydgR</i>	0.34	0.29	0.35	0.29	0.40	0.36	0.35	0.35
<i>ydhD</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>ydiC</i>	0.31	0.28	0.34	0.28	0.35	0.35	0.35	0.35
<i>ydjA</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>ydjE</i>	0.20	0.17	0.23	0.20	0.56	0.18	0.24	0.20
<i>ydjJ</i>	0.27	0.22	0.27	0.28	0.28	0.28	0.33	0.25
<i>yeaA</i>	0.26	0.28	0.31	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>yeaB</i>	0.27	0.25	0.25	0.25	0.35	0.31	0.31	0.31
<i>yeaD</i>	0.21	0.21	0.27	0.21	0.27	0.24	0.28	0.27
<i>yeaF</i>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.43	0.38	0.43	0.38
<i>yeaG</i>	0.32	0.24	0.32	0.24	0.40	0.30	0.34	0.34
<i>yeaM</i>	0.25	0.22	0.29	0.22	0.40	0.23	0.31	0.26
<i>yeaR</i>	0.31	0.28	0.31	0.28	0.32	0.29	0.33	0.32
<i>yeaT</i>	0.28	0.23	0.28	0.25	0.30	0.26	0.35	0.29
<i>yeaZ</i>	0.24	0.22	0.27	0.22	0.31	0.27	0.31	0.27
<i>yebi</i>	0.26	0.22	0.29	0.22	0.30	0.27	0.30	0.27
<i>yebJ</i>	0.36	0.33	0.36	0.33	0.46	0.40	0.40	0.40

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yebL</i>	0.29	0.29	0.32	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>yedL</i>	0.26	0.24	0.24	0.24	0.33	0.29	0.29	0.29
<i>yedU</i>	0.32	0.32	0.36	0.32	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>yeeO</i>	0.45	0.40	0.40	0.40	0.47	0.47	0.47	0.47
<i>yeeX</i>	0.26	0.26	0.31	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>yehE</i>	0.27	0.24	0.30	0.22	0.31	0.27	0.37	0.31
<i>yehM</i>	0.28	0.26	0.32	0.24	0.33	0.29	0.39	0.33
<i>yehX</i>	0.22	0.20	0.24	0.20	0.28	0.25	0.25	0.25
<i>yehY</i>	0.26	0.23	0.23	0.26	0.32	0.28	0.32	0.27
<i>yeiC</i>	0.23	0.21	0.25	0.21	0.29	0.25	0.34	0.25
<i>yeiL</i>	0.24	0.24	0.24	0.20	0.28	0.24	0.33	0.28
<i>yeiM</i>	0.23	0.23	0.25	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>yejE</i>	0.25	0.25	0.29	0.25	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>yfaO</i>	0.27	0.25	0.27	0.24	0.34	0.30	0.34	0.30
<i>yfbB</i>	0.20	0.20	0.25	0.19	0.25	0.23	0.31	0.30
<i>yfbN</i>	0.23	0.17	0.23	0.21	0.24	0.21	0.24	0.21
<i>yfcG</i>	0.38	0.38	0.38	0.38	0.46	0.46	0.46	0.46
<i>yfdM</i>	0.31	0.29	0.29	0.29	0.40	0.35	0.40	0.36
<i>yfeC</i>	0.31	0.25	0.31	0.25	0.32	0.29	0.32	0.32
<i>yfgB</i>	0.28	0.28	0.28	0.33	0.35	0.34	0.35	0.35
<i>yfhA</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>yfhJ</i>	0.34	0.32	0.43	0.32	0.44	0.44	0.44	0.44
<i>yfiA</i>	0.29	0.29	0.35	0.29	0.41	0.36	0.36	0.36
<i>yfiM</i>	0.15	0.15	0.15	0.15	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>yfiQ</i>	0.29	0.24	0.27	0.25	0.30	0.30	0.34	0.30
<i>yfiJ</i>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>yfiJ</i>	0.23	0.23	0.25	0.23	0.26	0.41	0.27	0.26
<i>yfiP</i>	0.29	0.24	0.30	0.22	0.30	0.27	0.36	0.30
<i>yfiY</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.44	0.35	0.35	0.34
<i>ygaE</i>	0.22	0.18	0.25	0.18	0.25	0.25	0.25	0.23
<i>ygaF</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>ygaH</i>	0.25	0.21	0.29	0.21	0.29	0.26	0.29	0.29
<i>ygaM</i>	0.34	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>ygaU</i>	0.17	0.17	0.19	0.16	0.22	0.23	0.27	0.20
<i>ygbB</i>	0.35	0.35	0.35	0.35	0.43	0.43	0.43	0.43
<i>ygbM</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>ygbP</i>	0.26	0.26	0.29	0.24	0.34	0.30	0.34	0.30
<i>ygcA</i>	0.20	0.18	0.20	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>ygcE</i>	0.24	0.18	0.24	0.18	0.24	0.24	0.24	0.29
<i>ygcF</i>	0.30	0.23	0.26	0.23	0.31	0.41	0.31	0.31
<i>ygcU</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.47	0.42	0.47	0.42
<i>ygfQ</i>	0.23	0.23	0.25	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>ygfT</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>yggG</i>	0.30	0.28	0.30	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>yggH</i>	0.23	0.21	0.26	0.21	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>yggL</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.39	0.34	0.34	0.34
<i>yggR</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>yggX</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>yghK</i>	0.20	0.19	0.25	0.19	0.26	0.23	0.26	0.23
<i>yghT</i>	0.20	0.23	0.24	0.29	0.57	0.32	0.25	0.32
<i>ygiP</i>	0.23	0.19	0.23	0.19	0.26	0.23	0.26	0.23
<i>ygiX</i>	0.20	0.20	0.24	0.20	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>ygiL</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>ygiO</i>	0.37	0.28	0.37	0.33	0.39	0.39	0.45	0.45
<i>yhaE</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.26	0.26	0.26
<i>yhaF</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.33	0.29	0.33	0.29
<i>yhaH</i>	0.21	0.21	0.23	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yhaK</i>	0.21	0.19	0.23	0.19	0.27	0.23	0.27	0.23

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yhaL</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>yhaO</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>yhaU</i>	0.23	0.22	0.26	0.22	0.30	0.26	0.36	0.30
<i>yhbG</i>	0.24	0.22	0.30	0.22	0.31	0.27	0.31	0.27
<i>yhbL</i>	0.25	0.24	0.25	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>yhbV</i>	0.23	0.22	0.22	0.22	0.30	0.26	0.26	0.27
<i>yhcF</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>yhcH</i>	0.21	0.19	0.23	0.19	0.27	0.24	0.24	0.24
<i>yhcL</i>	0.23	0.19	0.26	0.19	0.26	0.23	0.27	0.26
<i>yhcR</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.28	0.28	0.25	0.25
<i>yhdE</i>	0.31	0.28	0.38	0.33	0.39	0.39	0.46	0.39
<i>yhdR</i>	0.30	0.31	0.31	0.35	0.43	0.43	0.43	0.36
<i>yhdY</i>	0.31	0.26	0.26	0.31	0.75	0.33	0.42	0.33
<i>yheT</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23
<i>yhfQ</i>	0.78	0.71	0.86	0.71	0.98	0.88	0.98	0.87
<i>yhgA</i>	0.21	0.19	0.23	0.19	0.27	0.23	0.27	0.23
<i>yhgJ</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.28	0.25	0.28	0.28
<i>yhhA</i>	0.22	0.22	0.24	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>yhhX</i>	0.14	0.14	0.14	0.14	0.17	0.17	0.17	0.17
<i>yhiJ</i>	0.36	0.31	0.46	0.71	0.50	0.48	0.87	0.87
<i>yhiO</i>	0.25	0.23	0.25	0.23	0.31	0.28	0.31	0.28
<i>yhiW</i>	0.26	0.24	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.30
<i>yhiX</i>	0.21	0.19	0.23	0.19	0.27	0.23	0.27	0.23
<i>yhjE</i>	0.23	0.22	0.30	0.23	0.31	0.27	0.31	0.27
<i>yiaB</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>yiaC</i>	0.24	0.24	0.26	0.24	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>yiaV</i>	0.23	0.22	0.23	0.22	0.30	0.26	0.30	0.26
<i>yiaY</i>	0.26	0.22	0.26	0.22	0.31	0.27	0.27	0.27
<i>yibD</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24
<i>yicG</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.24	0.24	0.24	0.20
<i>yidF</i>	0.22	0.22	0.26	0.22	0.35	0.35	0.27	0.23
<i>yidL</i>	0.45	0.42	0.50	0.42	0.58	0.58	0.51	0.58
<i>yidY</i>	0.26	0.22	0.30	0.22	0.30	0.27	0.30	0.27
<i>yifM_1</i>	0.37	0.27	0.37	0.32	0.38	0.34	0.38	0.38
<i>yihE</i>	0.25	0.23	0.25	0.23	0.32	0.28	0.32	0.28
<i>yihI</i>	0.21	0.21	0.25	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>yihX</i>	0.26	0.20	0.27	0.23	0.27	0.24	0.32	0.24
<i>yiiD</i>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>yiiF</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yiiG</i>	0.30	0.26	0.30	0.30	0.31	0.31	0.36	0.36
<i>yiiM</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>yiiP</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>yiiS</i>	0.20	0.19	0.22	0.19	0.26	0.23	0.26	0.23
<i>yijP</i>	0.23	0.19	0.26	0.21	0.27	0.27	0.31	0.27
<i>yjaB</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>yjbB</i>	0.22	0.21	0.25	0.21	0.29	0.25	0.29	0.25
<i>yjbF</i>	0.30	0.22	0.26	0.22	0.30	0.27	0.30	0.27
<i>yjcG</i>	0.37	0.31	0.37	0.31	0.43	0.37	0.43	0.37
<i>yjcH</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.34	0.30	0.34	0.30
<i>yjcP</i>	0.40	0.37	0.40	0.45	0.47	0.56	0.55	0.46
<i>yjdG</i>	0.27	0.22	0.27	0.24	0.28	0.28	0.33	0.28
<i>yjdH</i>	0.25	0.23	0.31	0.23	0.32	0.28	0.32	0.28
<i>yjdL</i>	0.27	0.25	0.30	0.25	0.34	0.30	0.34	0.34
<i>yjeB</i>	0.20	0.18	0.22	0.18	0.25	0.22	0.23	0.23
<i>yjeJ</i>	0.28	0.28	0.30	0.28	0.34	0.34	0.34	0.34
<i>yjfC</i>	0.27	0.24	0.27	0.24	0.43	0.33	0.33	0.28
<i>yjfF</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yjfH</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>yjfO</i>	0.33	0.30	0.36	0.30	0.42	0.37	0.38	0.37
<i>yjfP</i>	1.06	0.94	0.94	1.06	1.09	1.09	1.32	0.98
<i>yjfR</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>yjgB</i>	0.38	0.38	0.42	0.38	0.47	0.47	0.47	0.47
<i>yjgH</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>yjgR</i>	0.34	0.34	0.34	0.34	0.42	0.42	0.42	0.42
<i>yjhB</i>	0.33	0.33	0.41	0.31	0.42	0.37	0.50	0.37
<i>yjhD</i>	0.20	0.19	0.22	0.18	0.26	0.23	0.26	0.26
<i>yjhE</i>	0.26	0.23	0.26	0.23	0.32	0.27	0.32	0.27
<i>yjhF</i>	0.28	0.28	0.28	0.31	0.39	0.33	0.38	0.32
<i>yjhH</i>	0.31	0.25	0.28	0.28	0.32	0.32	0.39	0.32
<i>yjhP</i>	0.27	0.27	0.30	0.23	0.31	0.37	0.37	0.37
<i>yjhS</i>	0.26	0.24	0.28	0.24	0.33	0.29	0.33	0.29
<i>yjiK</i>	0.27	0.27	0.27	0.27	0.33	0.33	0.33	0.33
<i>yjiO</i>	0.26	0.22	0.26	0.22	0.31	0.27	0.31	0.27
<i>yjiR</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.21	0.21	0.21	0.21
<i>yjjV</i>	0.73	0.64	0.73	0.55	0.75	0.77	0.75	0.76
<i>yjjW</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yjjY</i>	0.24	0.19	0.24	0.21	0.25	0.25	0.29	0.25
<i>ykfA</i>	0.32	0.30	0.35	0.30	0.41	0.36	0.37	0.36
<i>ymcA</i>	0.38	0.30	0.34	0.34	0.39	0.46	0.40	0.39
<i>ymdD</i>	0.24	0.21	0.24	0.24	0.30	0.22	0.30	0.25
<i>ymfE</i>	0.23	0.28	0.33	0.26	0.34	0.26	0.34	0.29
<i>ymfH</i>	0.28	0.25	0.28	0.34	0.81	0.30	0.35	0.29
<i>ymgA</i>	0.27	0.25	0.27	0.25	0.35	0.35	0.31	0.31
<i>ymgC</i>	0.29	0.26	0.29	0.29	0.36	0.27	0.36	0.30
<i>ymjA</i>	0.23	0.21	0.26	0.20	0.27	0.27	0.32	0.27
<i>ynaE</i>	0.24	0.18	0.24	0.21	0.25	0.22	0.30	0.25
<i>ynaF</i>	0.31	0.25	0.31	0.23	0.32	0.38	0.38	0.32
<i>ynbE</i>	0.26	0.26	0.26	0.24	0.34	0.30	0.30	0.29
<i>yniC</i>	0.19	0.17	0.19	0.17	0.21	0.22	0.21	0.21
<i>yodB</i>	0.21	0.21	0.21	0.32	0.35	0.26	0.26	0.26
<i>yohG</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.31	0.31	0.31	0.31
<i>yohK</i>	0.21	0.21	0.22	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yojI</i>	0.18	0.18	0.19	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22
<i>yojN</i>	0.40	0.40	0.40	0.40	0.49	0.49	0.49	0.49
<i>ypfI</i>	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>yphD</i>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.32	0.32	0.32	0.32
<i>ypjA</i>	0.32	0.24	0.28	0.25	0.29	0.29	0.34	0.29
<i>yqeK</i>	0.28	0.27	0.28	0.43	0.52	0.29	0.52	0.30
<i>yqgF</i>	0.21	0.21	0.23	0.21	0.28	0.24	0.28	0.24
<i>yqhE</i>	0.22	0.18	0.22	0.18	0.25	0.22	0.25	0.23
<i>yqiB</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yqjB</i>	0.51	0.47	0.51	0.47	0.58	0.58	0.66	0.58
<i>yqjC</i>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.38	0.38	0.38	0.38
<i>yqjE</i>	0.25	0.22	0.27	0.22	0.25	0.29	0.29	0.29
<i>yqjH</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>yraK</i>	0.24	0.20	0.27	0.20	0.28	0.25	0.28	0.28
<i>yraM</i>	0.18	0.17	0.23	0.17	0.24	0.28	0.21	0.21
<i>yraO</i>	0.24	0.24	0.27	0.21	0.28	0.28	0.33	0.28
<i>yrbA</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>yrbH</i>	0.22	0.20	0.22	0.20	0.25	0.24	0.24	0.24
<i>yrbI</i>	0.22	0.21	0.22	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>yrbK</i>	0.23	0.23	0.25	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28
<i>yrdA</i>	0.22	0.24	0.22	0.22	0.27	0.27	0.27	0.27
<i>yrfC</i>	0.23	0.23	0.23	0.28	0.29	0.24	0.29	0.24
<i>yrfD</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.26	0.26	0.26	0.26
<i>yrfF</i>	0.31	0.26	0.34	0.26	0.36	0.31	0.36	0.36

Tab. 7.9 Fortsetzung: Doppelte Standardabweichung.

Gen	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>ytfI</i>	0.38	0.38	0.41	0.38	0.52	0.46	0.46	0.46
<i>ytfJ</i>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.36	0.36	0.36	0.36
<i>ytfK</i>	0.19	0.19	0.24	0.21	0.25	0.22	0.29	0.25
<i>yzgL</i>	0.18	0.18	0.19	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22

## 7.3 „Sonstige Proteine“ sowie Hypothetische Proteine

**Tab. 7.10: Sonstige Proteine.** Gene, die für Proteine kodierten, die in keine der physiologischen Gruppen Anabolismus, Katabolismus, Stressantwort, Proteinbiosynthese, ZKW sowie Bewegung einteilbar waren, waren in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz signifikant differentiell exprimiert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  identifiziert worden. Signifikante Hochregulation: Werte rot unterlegt, signifikante Herunterregulation: Werte grün unterlegt. Werte: Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichung siehe Tab. 7.9

Gen	Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>acpD</i>	Azoreduktase	0.06	-0.24	-0.19	0.10	-0.01	-0.48	-0.09	-0.14
<i>fldA</i>	Flavodoxin 1	-0.06	-0.24	-0.40	-0.64	-0.76	-1.06	-0.61	-0.53
<i>glcF</i>	UE von Glycolat Oxidase	0.33	2.33	1.31	1.78	1.35	0.92	0.87	0.95
<i>greB</i>	Transkription Elongation Faktor	-0.18	-0.17	-0.60	0.21	0.03	-0.25	0.07	-0.10
<i>hdhA</i>	UE von 7-Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase	0.11	0.36	0.49	0.11	0.01	-0.10	0.05	0.41
<i>hemM</i>	Äussere Membran Lipoprotein	0.04	-0.14	-0.52	-0.29	-0.06	-0.43	-0.16	-0.31
<i>insB_2</i>	IS1 Protein InsB	0.08	0.20	0.62	0.10	0.24	0.44	0.34	0.47
<i>intB</i>	Prophage P4 Integrase	-0.07	0.34	0.28	0.23	0.39	0.38	0.29	0.26
<i>lig</i>	DNA Ligase	0.07	0.36	0.17	0.35	0.52	0.25	0.28	0.17
<i>mcrA</i>	Typ IV sequenzspezifische Desoxyribonuclease	0.10	0.21	0.23	-0.18	-0.05	0.49	-0.13	0.27
<i>menG</i>	Inhibitor von Ribonuklease E (RNase E)	0.07	0.01	1.31	-0.03	-0.03	0.07	0.02	-0.03
<i>mukE</i>	UE von MukB-MukE-MukF Komplex	-0.04	-0.10	-0.48	-0.09	-0.27	0.32	-0.05	-0.15
<i>nlpA</i>	Lipoprotein-28	0.04	0.08	0.01	-0.10	-0.26	-0.36	-0.16	-0.04
<i>nrdI</i>	Nukleosid/Nukleotid Konversion	-0.04	0.21	0.32	0.18	0.35	0.40	0.69	0.26
<i>ntpA</i>	dATP Pyrophosphohydrolase	-0.25	-0.41	-0.28	-0.09	-0.24	-0.59	-0.28	0.10
<i>ompX</i>	äussere Membran Protein X	0.03	-0.39	-0.60	-0.29	-0.11	-0.04	-0.18	0.02
<i>pal</i>	UE verschiedener Systeme (Tol/Pal/Colicin)	-0.08	-0.52	-0.81	-0.30	-0.54	-0.75	-0.58	-0.51
<i>pflA</i>	pyruvate formate-lyase activating enzyme	0.06	0.28	0.34	0.02	0.13	-0.01	0.08	0.00
<i>pntA</i>	UE von Pyridin Nukleotide Transhydrogenase	-0.02	-0.57	-0.38	-0.44	-0.66	-0.68	-0.65	-0.39
<i>pqiB</i>	Protein B	-0.11	-0.36	-0.40	-0.22	-0.27	-0.57	-0.38	-0.42
<i>pspD</i>	Phagenschockprotein	0.29	0.45	0.06	0.39	0.17	0.05	0.07	0.20
<i>rhoL</i>	rho Operon leader Peptid	-0.12	-0.29	-0.46	-0.19	0.02	-0.61	-0.18	-0.04
<i>smpB</i>	kleines Protein B	-0.05	-0.20	-0.37	-0.47	-0.36	-0.09	-0.23	-0.34
<i>talC</i>	Fructose 6-Phosphat Aldolase 2	0.08	-0.03	0.13	0.00	0.04	0.37	0.07	-0.01
<i>tolA</i>	UE von Tol-Pal Cell Envelope Komplex	-0.17	-0.46	-0.26	-0.25	-0.49	-0.51	-0.28	-0.30
<i>tolB</i>	UE von Tol-Pal Cell Envelope Komplex	-0.07	-0.20	-0.13	-0.36	-0.57	-0.65	-0.61	-0.35
<i>tra8_1</i>	Transposase von IS30	-0.09	-0.40	0.17	0.01	0.02	0.53	-0.09	0.05
<i>uidC</i>	Membran-assoziiertes Protein	0.07	-0.03	0.28	0.24	0.27	0.48	0.09	-0.02
<i>yajQ</i>	Nukleotid Bindeprotein	0.06	-0.16	0.14	0.00	-0.18	0.39	0.06	0.08
<i>ybgF</i>	UE von Tol-Pal Cell Envelope Complex	0.08	-0.18	-0.42	-0.15	-0.21	-0.33	-0.18	-0.68
<i>ybjW</i>	hybrid-cluster Protein / Hydroxylamin Reduktase	0.08	-0.17	0.04	0.14	0.04	0.71	0.04	-0.19
<i>ydiC</i>	Scaffold Protein	-0.11	-0.24	-0.14	-0.01	-0.09	-0.52	-0.15	0.05
<i>yiaB</i>	Inneres Membranprotein	0.01	0.12	0.33	-0.01	0.00	-0.05	0.00	0.04
<i>ynaF</i>	Nukleotid Bindeprotein	0.48	0.64	0.68	0.89	0.83	0.69	0.87	0.81
<i>yqhE</i>	$\beta$ -Keto Ester Reduktase / 2,5-Diketo-D-Gluconat F	0.04	-0.03	0.35	0.10	0.13	0.11	0.10	-0.02
<i>sfmH</i>	involved in fimbrial assembly	0.08	0.13	0.58	0.44	0.22	0.27	0.17	0.20
<i>fimA</i>	UE von Fimbrin	-0.06	0.09	-0.17	-0.36	-0.59	-1.02	-0.60	-0.69
<i>tpr</i>	Kernprotein	-0.14	-0.20	-0.11	-0.06	-0.09	0.52	-0.02	-0.20
<i>cysC</i>	Adenylsulfat Kinase Schwefelassimilation	-0.07	-0.52	-0.55	-0.54	-0.47	-0.31	-0.49	-0.46
<i>cysD</i>	sulfate adenyltransferase UE	0.00	-0.35	-0.42	-0.13	-0.40	-0.45	-0.27	-0.43
<i>cysH</i>	3'-phospho-adenylsulfate reductase	-0.03	-0.42	-0.25	-0.22	-0.10	-0.16	0.01	-0.31
<i>cysI</i>	Flavin/Sulfit Reduktase (NADPH) UE Sulfat Assim	0.03	-0.19	-0.82	0.12	-0.28	-0.23	-0.03	-0.37
<i>cysJ</i>	Flavin/Sulfit Reduktase (NADPH) UE Sulfat Assim	-0.15	-1.35	-1.75	-0.73	-1.06	-0.72	-0.80	-0.91
<i>cysN</i>	sulfate adenyltransferase UE	0.03	-0.09	-0.42	-0.08	0.06	-0.04	-0.20	-0.34



**Tab. 7.11: Hypothetische Proteine.** Hypothetische Proteine und Proteine mit noch unbekannter Funktion waren in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz signifikant differentiell exprimiert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,05$  identifiziert worden. Signifikante Hochregulation: Werte rot unterlegt, signifikante Herunterregulation: Werte grün unterlegt. Werte: Koeffizienten des Linearen Modells. Standardabweichung siehe Tab. 7.9

Gen	Funktion	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>agaS</i>	Putative Tagatose-6-phosphat Aldose/Ketose Isomerase	-0.06	0.03	0.10	-0.01	0.10	<b>0.47</b>	0.08	0.04
<i>b0235</i>	hypothetisches Protein	0.00	0.26	<b>0.70</b>	0.20	0.10	-0.22	0.21	-0.09
<i>b0309</i>	hypothetisches Protein	<b>0.67</b>	-0.21	-0.05	-0.25	-0.14	-0.01	0.15	-0.19
<i>b0359</i>	Putative Transferase	0.08	0.17	0.13	-0.11	0.04	<b>0.41</b>	0.09	-0.09
<i>b0380</i>	hypothetisches Protein	0.12	-0.13	<b>-0.22</b>	<b>0.52</b>	0.48	0.32	0.23	-0.03
<i>b0499</i>	hypothetisches Protein	-0.02	-0.05	<b>0.27</b>	0.10	0.08	-0.02	0.01	-0.02
<i>b0753</i>	hypothetisches Protein	0.14	<b>0.57</b>	<b>0.37</b>	<b>0.59</b>	0.34	0.47	<b>0.71</b>	<b>0.61</b>
<i>b0817</i>	Putatives Toxin	0.06	0.06	<b>-0.39</b>	0.07	-0.08	-0.24	0.02	-0.27
<i>b0834</i>	Konserviertes Protein	-0.06	-0.15	-0.01	<b>-0.37</b>	-0.23	-0.20	0.01	0.19
<i>b0844</i>	Konserviertes Protein mit Phosphatase ähnlicher Domäne	-0.09	0.14	0.04	-0.17	0.02	<b>0.41</b>	0.18	0.28
<i>b0959</i>	Konserviertes Protein	-0.07	<b>0.27</b>	0.04	-0.07	0.13	0.14	0.05	0.15
<i>b0967</i>	Putative Methyltransferase	-0.15	-0.11	<b>-0.25</b>	<b>-0.37</b>	-0.39	-0.08	-0.20	-0.12
<i>b1016</i>	hypothetisches Protein der OFeT Transport Familie	-0.08	-0.15	<b>-0.38</b>	<b>-0.37</b>	-0.14	0.13	-0.08	-0.24
<i>b1052</i>	hypothetisches Protein	0.17	0.21	-0.11	-0.11	-0.16	<b>-0.47</b>	-0.15	-0.27
<i>b1057</i>	hypothetisches Protein	0.11	0.28	<b>0.61</b>	<b>0.85</b>	<b>0.62</b>	0.38	0.47	0.35
<i>b1085</i>	hypothetisches Protein	0.11	-0.14	<b>-0.37</b>	<b>-0.75</b>	0.72	-0.09	0.48	0.04
<i>b1153</i>	hypothetisches Protein	0.02	0.15	0.11	<b>-0.30</b>	-0.17	0.05	0.13	<b>0.42</b>
<i>b1171</i>	hypothetisches Protein	-0.04	-0.13	-0.18	-0.19	-0.10	<b>-0.45</b>	0.16	<b>-0.25</b>
<i>b1199</i>	Dihydroxyaceton Kinase	0.07	-0.14	-0.14	0.05	-0.13	-0.35	-0.23	<b>-0.42</b>
<i>b1202</i>	Putatives Adhäsions- und Penetrationsprotein	0.09	-0.29	<b>-1.25</b>	0.07	-0.04	0.09	0.21	-0.03
<i>b1240</i>	hypothetisches Protein	0.05	-0.11	0.06	0.28	0.13	<b>0.87</b>	0.09	-0.15
<i>b1297</i>	Putative Glutamin Synthetase	0.05	<b>0.37</b>	<b>1.46</b>	<b>1.43</b>	<b>0.87</b>	0.32	0.33	0.22
<i>b1345</i>	Putative Transposase	-0.13	<b>-0.40</b>	-0.20	-0.34	-0.25	0.13	-0.27	-0.02
<i>b1354</i>	hypothetisches Protein	0.04	0.01	<b>0.45</b>	0.13	0.19	<b>0.68</b>	0.47	0.52
<i>b1372</i>	Putatives Membranprotein	0.02	0.04	<b>0.35</b>	-0.12	0.03	0.20	0.23	0.19
<i>b1422</i>	Putativer Tr5anskriptionsregulator vom LYSR-Typus	0.24	0.22	0.25	<b>0.44</b>	0.24	0.11	0.20	0.56
<i>b1445</i>	hypothetisches Protein	0.05	0.05	-0.25	-0.22	-0.10	<b>-0.52</b>	-0.18	-0.39
<i>b1446</i>	hypothetisches Protein	0.07	-0.13	-0.19	0.21	-0.10	0.05	0.04	<b>-0.48</b>
<i>b1462</i>	Putatives Enzym	0.00	-0.12	-0.24	-0.13	-0.01	-0.10	-0.13	<b>-0.47</b>
<i>b1481</i>	hypothetisches Protein	0.08	0.10	-0.08	0.10	0.40	0.39	<b>0.86</b>	<b>1.05</b>
<i>b1518</i>	konserviertes hypothetisches Protein	0.07	<b>0.58</b>	0.35	<b>0.71</b>	<b>0.80</b>	<b>0.56</b>	<b>0.51</b>	<b>0.56</b>
<i>b1522</i>	Putatives Transportprotein	-0.30	-0.22	0.00	0.14	-0.03	0.02	0.08	<b>-0.87</b>
<i>b1553</i>	hypothetisches Protein	0.09	0.15	<b>0.67</b>	-0.06	-0.01	0.02	0.06	0.08
<i>b1578</i>	hypothetisches Protein	0.08	0.32	<b>0.45</b>	0.14	0.23	0.00	0.14	0.22
<i>b1667</i>	konserviertes hypothetisches Protein	0.36	0.26	<b>0.49</b>	0.32	<b>0.73</b>	0.33	0.30	0.13
<i>b1669</i>	Konserviertes Protein	<b>-1.28</b>	-0.09	0.08	0.07	0.11	0.12	0.18	0.09
<i>b1673</i>	Putative Oxidoreduktase	-0.04	0.19	0.22	-0.21	0.06	<b>-0.45</b>	-0.05	-0.13
<i>b1690</i>	MFS Transporter uncharakterisiert	-0.05	0.22	-0.32	<b>0.42</b>	0.14	-0.04	0.14	-0.08
<i>b1695</i>	Putative Acyl-CoA Dehydrogenase	0.00	<b>-0.47</b>	-0.03	0.23	0.09	0.00	0.13	-0.12
<i>b1720</i>	hypothetisches Protein	-0.01	0.03	-0.01	<b>-0.51</b>	-0.10	-0.03	-0.08	0.04
<i>b1722</i>	konserviertes hypothetisches Protein	-0.02	-0.11	0.16	-0.14	-0.21	<b>0.77</b>	-0.13	-0.11
<i>b1724</i>	konserviertes hypothetisches Protein	0.17	0.20	0.36	<b>0.54</b>	<b>0.53</b>	0.29	0.41	<b>0.61</b>
<i>b1730</i>	Putatives Enzym	0.11	0.19	<b>1.05</b>	-0.02	0.02	0.63	0.10	0.37
<i>b1758</i>	Putative Cytochrom Oxidase	-0.13	0.07	<b>0.30</b>	-0.14	-0.20	0.22	0.03	0.31
<i>b1775</i>	MFS Transporter uncharakterisiert	0.12	<b>0.45</b>	0.37	-0.23	0.19	-0.12	-0.23	0.13
<i>b1811</i>	konserviertes hypothetisches Protein	0.14	0.06	0.04	-0.02	-0.04	<b>0.46</b>	-0.05	0.04
<i>b1820</i>	konserviertes Protein	-0.07	-0.05	0.08	0.14	-0.12	<b>-0.54</b>	0.01	0.12
<i>b1821</i>	Putatives Membranprotein	0.04	<b>0.44</b>	0.17	0.13	0.06	<b>0.68</b>	0.17	<b>0.52</b>
<i>b1828</i>	MFS Transporter uncharakterisiert	-0.15	0.12	0.09	-0.03	-0.32	<b>0.68</b>	0.15	0.00
<i>b1843</i>	konserviertes hypothetisches Protein	-0.01	0.00	-0.06	-0.09	-0.12	<b>-0.51</b>	-0.02	-0.11
<i>b1965</i>	Putatives äusseres Membranprotein	0.08	0.37	<b>0.55</b>	0.32	0.20	<b>0.62</b>	0.29	0.42
<i>b1971</i>	Putative Reduktase	0.36	0.10	<b>0.94</b>	0.00	-0.10	-0.06	0.14	-0.15
<i>b1976</i>	konserviertes hypothetisches Protein	0.73	<b>0.87</b>	<b>1.05</b>	<b>1.12</b>	<b>0.85</b>	0.47	0.38	<b>0.86</b>
<i>b2073</i>	konserviertes Protein	-0.17	-0.06	-0.22	0.08	0.27	<b>-0.50</b>	-0.16	-0.05
<i>b2083</i>	hypothetisches Protein	0.05	0.10	<b>0.48</b>	-0.06	0.05	0.04	0.09	0.20
<i>b2084</i>	hypothetisches Protein	0.17	0.04	<b>0.35</b>	<b>-0.36</b>	0.05	0.17	0.13	-0.07
<i>b2086</i>	konserviertes Protein	-0.29	0.02	<b>0.51</b>	0.01	0.25	<b>0.40</b>	0.28	0.31
<i>b2099</i>	Putative Glycohydrolase	0.08	0.15	0.22	0.06	0.19	<b>0.47</b>	0.02	0.18
<i>b2146</i>	Putative Dihydrothymine Dehydrogenase	0.32	<b>0.72</b>	<b>0.41</b>	<b>0.50</b>	0.18	0.17	0.38	0.07
<i>b2191</i>	hypothetisches Protein	0.11	0.19	<b>0.45</b>	0.08	0.29	0.34	0.12	0.19
<i>b2227</i>	hypothetisches Protein	-0.04	-0.18	-0.17	-0.27	-0.01	<b>0.51</b>	0.09	-0.07
<i>b2294</i>	konserviertes hypothetisches Protein	-0.03	-0.06	<b>-0.76</b>	-0.18	-0.18	<b>-0.62</b>	-0.17	-0.15

#### 7.4 Beschreibung der Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse

**Tab. 7.12: Regulatoren, die über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert wurden.** Angegeben ist sowohl das Gen als auch eine Beschreibung. Fett-gedruckte Gene (*yeiL*, *hns*, *gutM*, *lrhA*, *malT*, *glcC* und *fadR*) wurden sowohl über die Microarray-Analyse als auch über die Regulator-Analyse identifiziert. Die Informationen sind der EcoCyc Datenbank ([www.EcoCyc.org](http://www.EcoCyc.org) - Stand: Dezember 2005) entnommen.

Regulator (Gen)	Beschreibung
<i>argR</i>	ArgR stellt neben dem <i>carAB</i> Operon das zweite Regulatorelement der Arginin Biosynthese dar, es weist einen inhibitorischen Effekt auf die Expression auf und gehört zur ArgR Familie.
<i>crp</i>	CRP ist ein dualer Transkriptionsregulator und gehört zur CRP Familie. Er ist der bedeutendste globale Regulator von Katabolit-sensitiven Operonen und kontrolliert seine eigene Synthese. Dieser Regulator induziert eine starke Entwindung der DNA und ist an der Regulation von mehr als 200 Genen beteiligt.
<b><i>fadR</i></b>	FadR ist ein dualer DNA-bindender Transkriptionsregulator des Fettsäuremetabolismus. Dieses Protein kontrolliert die Expression einer Reihe von Genen verantwortlich für den Fettsäuretransport und der Fettsäure-Oxidation ( <i>fadBA</i> , <i>fadD</i> , <i>fadL</i> und <i>fadE</i> ). Es aktiviert die Transkription von mindestens drei an der Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren beteiligten Genen ( <i>fabA</i> , <i>fabB</i> und <i>iclR</i> ). Es gehört zur GntR Familie der Transkriptionsfaktoren.
<i>fnr</i>	FNR ist ein dualer DNA-bindender Transkriptionsregulator welcher die Transkription vieler an der fermentativen und anaeroben Atmung beteiligter Gene stimuliert. Zusätzlich unterdrückt er die Transkription einiger Gene, die nur während des aeroben Wachstums von Nöten sind. Dieses System ist nur bei der anaeroben Energiegewinnung aktiviert. FNR gehört zur CRP Familie der Transkriptionsfaktoren.
<i>fruR = cra</i>	FruR (Cra) ist ein dualer Transkriptionsregulator welcher die Regulation einer Vielzahl von Operonen des Zentralen Kohlenstoffwechsels beeinflusst. Er hat sowohl eine reprimierende ( <i>nirBDC-cysG</i> , <i>fruBKA</i> , <i>ptsHI-crr</i> und <i>edd-eda</i> ) als auch eine aktivierende Funktion ( <i>aceBAK</i> , <i>icdA</i> , <i>pckA</i> und <i>ppsA</i> ). Er gehört zur GalR/LacI Familie der Transkriptionsfaktoren.
<i>fur</i>	Fur ist ein negativer Transkriptionsregulator, welcher an der Regulation einer Vielzahl von Operonen verantwortlich für den Eisentransport ( <i>fecANCDE</i> , <i>fecIR</i> und <i>fhuACDB</i> ) einschließlich einiger Proteine der äußeren Membran, beteiligt ist. Er gehört zur Fur Familie der Transkriptionsfaktoren.

**Tab. 7.12: Regulatoren, die über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert wurden.**  
**Fortsetzung**

<b>Regulator</b>	<b>Beschreibung</b>
<i>gcvA</i>	GcvA ist ein dualer DNA-bindender Transkriptionsregulator, welcher die Transkription von Genen des Glycin Abbaus induziert ( <i>gcvTHP</i> ). Zusätzlich ist er ein negativer Autoregulator seiner eigenen Biosynthese. GcvA aktiviert das Operon in Anwesenheit von Glycin und unterdrückt es bei Mangel. GcvR und GcvA zusammen modulieren die Transkription des Operons in Abhängigkeit der Glycin- und Purinkonzentration innerhalb der Zelle. Er gehört zur LysR Familie der Transkriptionsregulatoren.
<i>gcvR</i>	GcvR ist als negativer Transkriptionsregulator bei der Regulation des Operons für den Glycin Abbau involviert ( <i>gcvTHP</i> ). Siehe auch <i>gcvA</i> .
<b><i>glcC</i></b>	GlcC ist ein Aktivator der Glycolatverwertung. Er gehört zur GntR Familie der Transkriptionsfaktoren. GlcC aktiviert die Expression des <i>glcDEFGBA</i> Operons. Zusätzlich ist er ein negativer Autoregulator seiner eigenen Biosynthese.
<b><i>gutM</i></b>	GutM ist ein aktivierender DNA-bindender Transkriptionsregulator der Glucitolverwertung. Dieses Protein kann keiner der bekannten Transkriptionsfaktorfamilien zugeordnet werden.
<b><i>hns</i></b>	H-NS ist ein Nukleoid-assoziiertes, DNA bindendes Protein. Es besitzt fast ausschließlich reprimierende Funktion. H-NS spielt eine bedeutende Rolle bei der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Hinzu kommt eine Bedeutung bei der Anpassung an verschiedene Stressreize. Es gehört zur Histon-ähnlichen Familie der Transkriptionsregulatoren.
<i>ihf</i>	Dieses Protein gehört zur HI-HN-S Familie. IHF induziert Knicke in der DNA und wird bei der sequenzspezifischen Rekombination, Replikation, Transkriptions- und Translationskontrolle benötigt. IHF wird zur normalen Expression von <i>fimA</i> , dem wichtigsten Strukturelement der Mannose-bindenden Pili, benötigt.
<b><i>lrhA</i></b>	LrhA gehört zur LysR Familie der Transkriptionsregulatoren. Dieser Regulator ist an der Expressionskontrolle der NADH Dehydrogenase Gene beteiligt. Er moduliert die Aktivität von SprE (Hnr). LrhA ist negativ autoreguliert und unterdrückt das <i>flhDC</i> Operon.
<b><i>malT</i></b>	MalT gehört zur LuxR/UhpA Familie. Es ist in die Expressionskontrolle von Genen der Maltoseverwertung involviert und bindet Maltotriose sowie ATP. Es aktiviert die Transkription von <i>malS</i> und <i>malEFG</i> , <i>malK-lamB-malM</i> , und <i>malPQ</i> .
<i>melR</i>	MelR gehört zur AraC/XylS Familie. Dieser Regulator kontrolliert einige Gene des Melobiosekatabolismus. Er ist negativ autoreguliert und aktiviert die Transkription des <i>melAB</i> Operons.

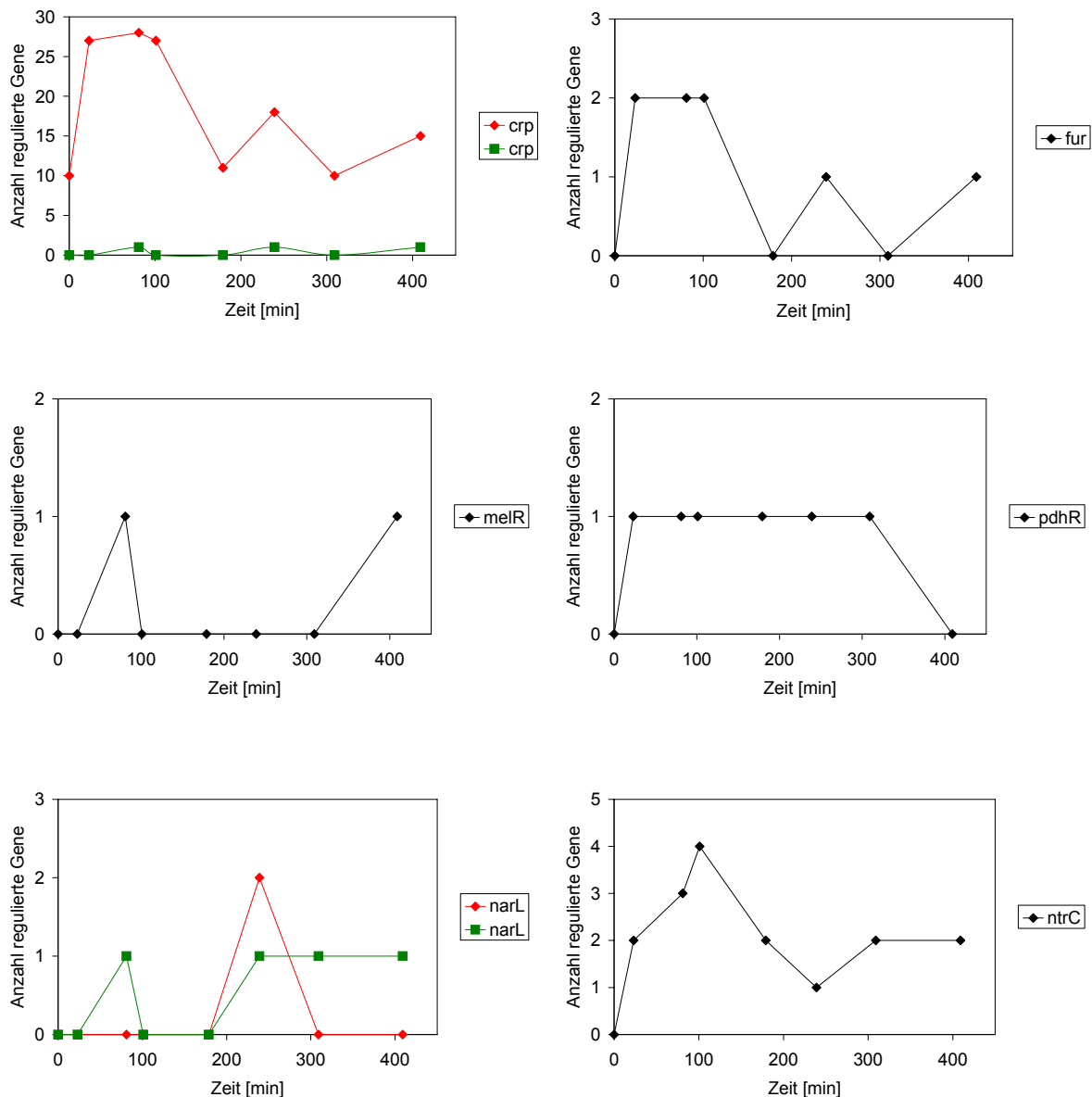
**Tab. 7.12: Regulatoren, die über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert wurden.**  
**Fortsetzung**

Regulator	Beschreibung
<i>narL</i>	NarL gehört zur LuxR/UhpA Familie. Dieser Regulator ist Bestandteil eines Zwei-Komponenten Regulationssystems und kontrolliert die Expression von beteiligten Genen der fermentativen und anaeroben Energiegewinnung. Er aktiviert/reprimiert einige Operone als Antwort auf die NarX und NarQ vermittelte Nitrat/Nitrit Signalinduktion. In diesem aktiviertem Zustand kann Phospho-NarL sowohl als Aktivator der Nitrat- und Nitrit Reduktase Transkription als auch als Repressor der Fumarat Reduktase Transkription fungieren. Beides führt zur Verwendung von Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor während der anaeroben Atmung. In Anwesenheit von Nitrit wird NarL nur von Phospho-NarQ phosphoryliert. Das Sensorprotein NarX fungiert als Phospho-NarL Phosphatase unter diesen Bedingungen, welche den Phosphorylierungszustand des Sensors NarQ bis zu einem gewissen Grade widerspiegelt. Überexpression verursacht den Fremdstoff Resistenz Phänotyp.
<i>ntrC</i>	NtrC gehört zur EBP Familie. Dieser Regulator ist ein Mitglied des Zwei-Komponenten NtrB/NtrC Regulationssystems und kontrolliert als Aktivator (als Tetramer) die Expression einiger Gene, welche bei der Stickstoff-Assimilation eine Rolle spielen. Er interagiert mit GlnL und aktiviert Sigma54 Promotoren. NtrC reguliert <i>glnALG</i> und <i>glnHPQ</i> Operone, aktiviert das <i>nac</i> Gen und das <i>glnK-amtB</i> Operon, und unterdrückt das <i>glnLG</i> Operon.
<i>pdhR</i>	PdhR gehört zur GntR Familie. Der Regulator kontrolliert Strukturgene des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes. PdhR aktiviert das <i>lctPRD</i> Operon, wohingegen es seine eigene Expression durch die Repression des vollständigen <i>pdhR-aceEF-lpdA</i> Operons autoreguliert.
<i>purR</i>	PurR gehört zur GalR/LacI Familie. Dieser Regulator kontrolliert viele Gene der <i>de novo</i> Biosynthese der Purin-Nukleotide und unterdrückt die Transkription vieler Operone und Gene wie z.B. <i>codBA</i> , <i>cvpA-purF-ubiX</i> , <i>gcvTHP</i> , <i>glnB</i> , <i>guaBA</i> , <i>purC</i> , <i>purEK</i> , <i>purHD</i> , <i>purMN</i> , <i>ycfC-purB</i> und andere.
<i>rscB</i>	Das Regulatorprotein RscB ist Bestandteil der Zwei -Komponenten RcsC/RcsB Systems. Einmal aktiviert stellt RscB einen positiven Regulator für die Kapselsynthese und Zellteilung dar. Die Kapselbiosynthese wird durch die Heterodimerisierung von RscB mit RscA eingeleitet. RcsB aktiviert unabhängig die <i>fts</i> Gene. Es gehört zur LuxR/UhpA Familie. Eine Überproduktion verursacht einen Resistenz-Phänotyp und beeinflusst die Expression von Efflux-Systemen.
<i>rtcR</i>	RtcR gehört zur EBP Familie. Dieser sigma54-abhängige Regulator reguliert Strukturgene der RNA Phosphat Zykase. RtcR reguliert positiv das <i>rtcBA</i> Operon.
<i>sdiA</i>	Das SdiA Protein gehört zur LuxR/UhpA Familie und reguliert einige Gene, die für die Zellteilung verantwortlich sind.

**Tab. 7.12: Regulatoren, die über die Regulator-Analyse als „aktiv“ identifiziert wurden.**  
**Fortsetzung**

<b>Regulator</b>	<b>Beschreibung</b>
<i>trpR</i>	TrpR gehört zur TrpR Familie. Es reguliert einige an der Tryptophan-Biosynthese beteiligten Gene. TrpR bindet L-Tryptophan und unterdrückt die Transkription von <i>aroH</i> , <i>aroL-yaiA-aroM</i> , <i>mtr</i> , <i>trpLEDCBA</i> und <i>trpR</i> .
<i>tyrR</i>	TyrR gehört zur EBP Familie. Es reguliert einige an der Biosynthese und dem Transport aromatischer Aminosäuren beteiligten Gene. Die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind TyrR Effektoren. Dieses Protein reguliert folgende Gene und Operone negativ: <i>aroP</i> , <i>aroL-yaiA-aroM</i> , <i>aroG</i> , <i>tyrR</i> , <i>aroF-tyrA</i> und <i>tyrB</i> . Positiv wird <i>mtr</i> und <i>tyrP</i> reguliert.
<i>uidR</i>	UidR kontrolliert die Expression des <i>uidRABC</i> Operons zusammen mit UxuR (Blanco, 1987). UidR wird von seinem eigenen Produkt reprimiert und wird durch den Katabolismus beeinflusst. (Blanco <i>et al.</i> , 1985). Dieser Regulator ist bei der Kontrolle einiger für die Aufnahme von C-Quellen verantwortlicher Gene beteiligt. Er beinhaltet eine HTH tetR-Typ DNA-Bindedomäne.
<i>ulaR</i>	UlaR ist ein Repressor des <i>sga</i> Operons sowie von <i>yjfr</i> .
<i>xylR</i>	XylR gehört zur AraC/XylS Familie. Er ist an der Expressionsregulation von Genen der Xylose-Verwertung beteiligt. XylR aktiviert die <i>xyIAB</i> und <i>xyIFGHR</i> Operone.
<i>yeiL</i>	YeiL ist das dritte Mitglied der CRP/FNR Familie in <i>E. coli</i> und stellt einen positiven DNA-bindenden Regulator des Nukleosidmetabolismus dar. Die Aktivität von YeiL verläuft vermutlich ähnlich zu FNR und wird möglicherweise von sensorischen Eisen-Schwefel Clustern und/oder durch reversible Disulfidbrückenbildung beeinflusst. Die YeiL Expression ist erhöht während der stationären Phase, ist RpoS-abhängig und positiv autoreguliert, positiv aktiviert durch Lrp (und IHF in Abwesenheit von FNR) und negativ reguliert durch FNR (Anjum <i>et al.</i> , 2000).

## 7.5 Aktivitätsprofile der Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse



**Abb. 7.1: Aktive Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse.** Dargestellt ist für die einzelnen Zeitpunkte T1 - T8 (hier angegeben als die Zeit nach Glukose-Limitierung (T1 entspricht 0 min, T2 entspricht 23 min, T3 entspricht 81 min, T4 entspricht 101 min, T5 entspricht 179 min, T6 entspricht 239 min, T7 entspricht 309 min und T8 entspricht 409 min nach Limitierung)) die Anzahl der potentiell regulierten Gene aus 353 Genen, deren Operone zu 50% oder mehr als „differentiell exprimiert“ durch die Microarray-Analyse in mindestens einem Zeitpunkt gegenüber der Referenz gefunden wurden. Sind zwei Kurven in den Abbildungen zu sehen, dann war der Regulator sowohl als Aktivator als auch als Repressor aktiv. Die grüne Kurve zeigt eine Repressor-Aktivität, die rote Kurve eine Aktivator-Aktivität an.

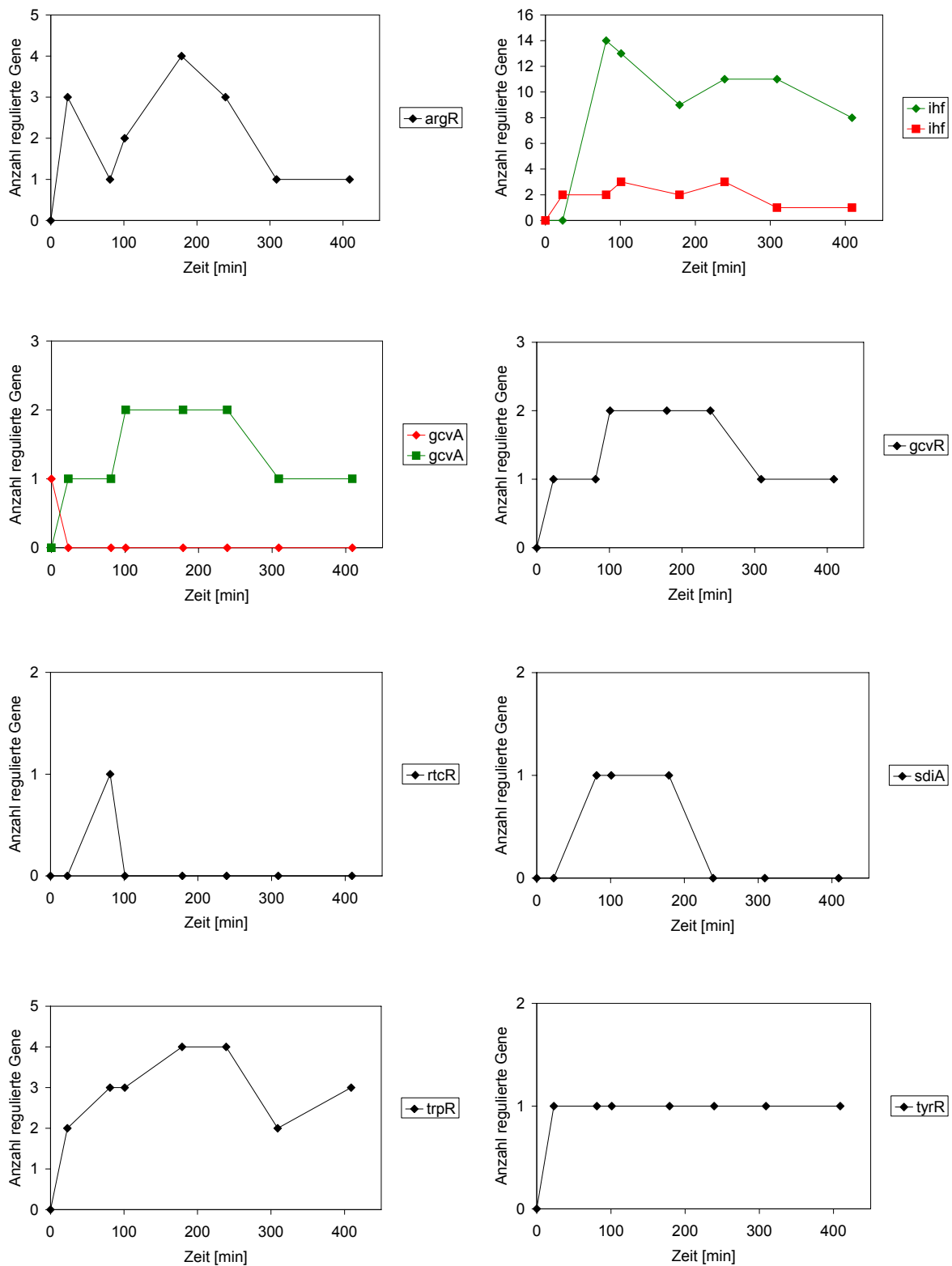


Abb. 7.1 Fortsetzung: Aktive Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse.

## 7. Anhang

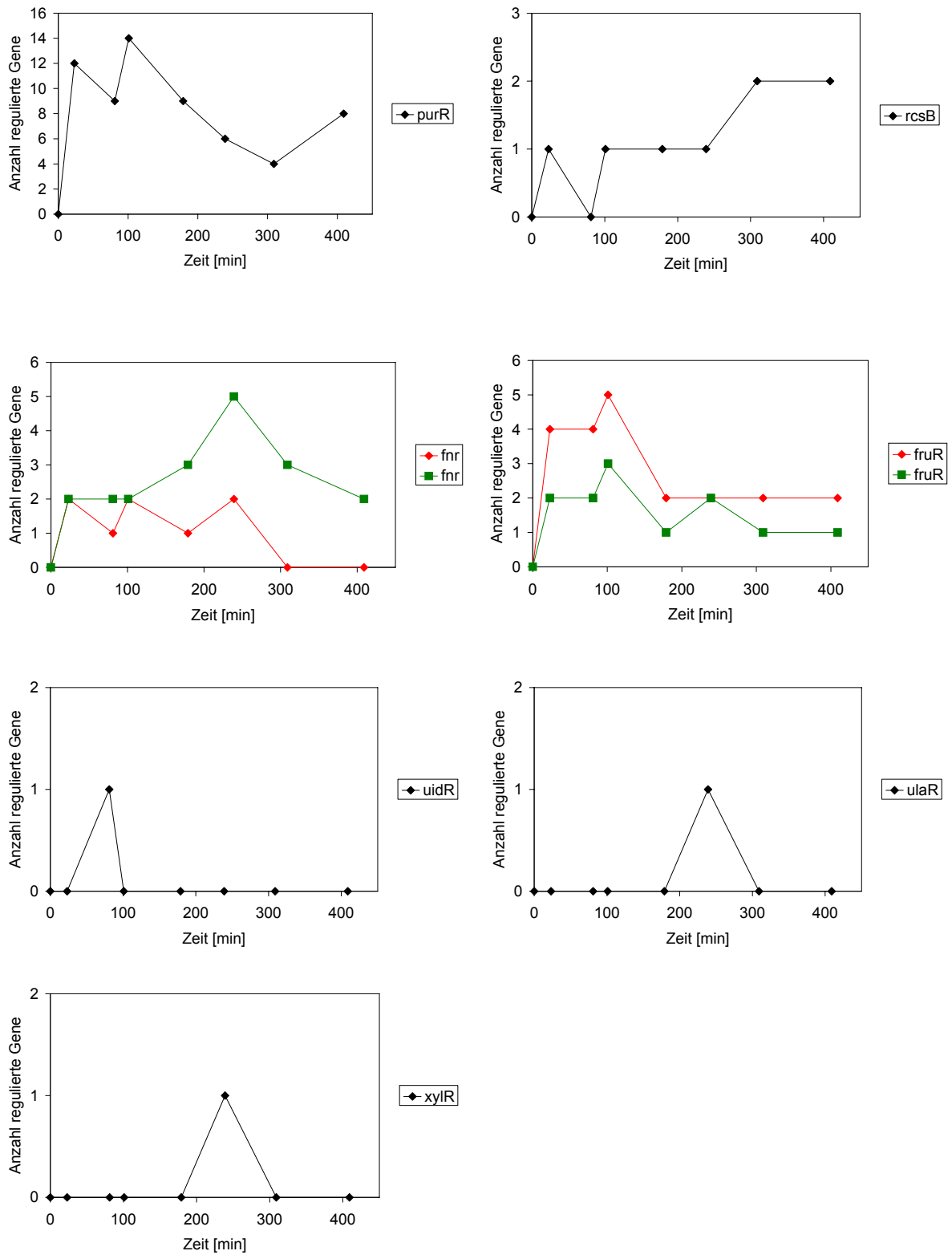


Abb. 7.1 Fortsetzung: Aktive Regulatoren, identifiziert über die Regulator-Analyse.



## 8 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name Karin Lemuth  
 Geburtsdatum 08.12.1975  
 Geburtsort Stuttgart  
 Staatsangehörigkeit Deutsch  
 Anschrift Griegstr. 27  
 70195 Stuttgart

### Schulbildung

1982-1986 Grundschule in Stuttgart (Merzschule)

1986-1995 Gymnasium in Stuttgart (Merzschule)  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

01.10.1996-28.02.2003 Studium der Technischen Biologie an der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart

12/2000 – 4/2001 Studienarbeit „ Ontogenese der circadianen und circannualen Melatoninrhythmik beim Europäischen Feldhamster (*Cricetus cricetus*)“ am Biologischen Institut (Abteilung für Tierphysiologie), Universität Stuttgart

6/2002 – 2/2003 Diplomarbeit „ Das Geruchsbindeprotein OBP-1F aus der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) zur wirkungsbezogenen Analytik von Wasser – Etablierung eines Assays zum Nachweis von OBP-1F im Mikrotiterplattenformat, Heterologe Expression in *Escherichia coli* sowie auf der Zelloberfläche von *Saccharomyces cerevisiae*, Erstellung einer Geruchsbindeprotein – Datenbank“ am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart  
 Abschluss: Diplom-Biologe (t.o.)

28.02.2003

### Promotion

Seit 1.04.2003 Promotion am Institut für Technische Biochemie in Stuttgart unter Betreuung von Prof. Dr. R. D. Schmid, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart

---

(Karin Lemuth)

Stuttgart im April 2006