

**Globale Expressionsanalyse der Stringenten Kontrolle
in *Corynebacterium glutamicum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Olaf Brockmann-Gretza

aus Lübbecke

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	2
1	Die Gattung der Corynebakterien.....	2
1.1	Taxonomie der Corynebakterien	2
1.2	Die wirtschaftliche Bedeutung der Corynebakterien.....	3
1.3	Analyse des Genoms von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	4
1.4	Methoden zur transkriptionellen Analyse von <i>C. glutamicum</i>	6
1.5	Anwendungen von Mikroarrays bei <i>C. glutamicum</i>	8
1.6	Die Grundlagen der Stringenten Kontrolle in <i>Escherichia coli</i>	9
1.7	Die Komponenten der Stringenten Kontrolle in <i>Escherichia coli</i>	10
1.8	Die molekularen Grundlagen der Stringenten Kontrolle	13
1.9	Die pleiotropen Effekte der Stringenten Kontrolle in <i>E. coli</i>	14
1.10	Die Stringente Kontrolle in anderen Organismen	18
1.11	Die Stringente Kontrolle in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	19
2	Ziele der Arbeit	21
III	Material und Methoden.....	22
1	Bakterienstämme	22
2	Enzyme, Chemikalien und anderes Material	22
2.1	Enzyme und Marker	22
2.2	Chemikalien.....	23
2.3	Kits.....	24
2.4	Materialien	24
2.5	Geräte und Apparaturen	25
2.6	Software	26
3	Medien und Zusätze	26
3.1	Nährmedien.....	26
3.2	Zusätze zu den Nährmedien	27
4	Puffer und Lösungen	27
4.1	DNA-Isolierung und Reinigung	27
4.2	DNA-Amplifizierung mittels PCR	28
4.3	Elektrophorese.....	28
4.4	RNA-Isolierung	29

4.5	cDNA-Synthese und Markierung	30
4.6	Lösungen und Puffer zur Array-Hybridisierung	31
5	Kultivierung von Bakterien	32
5.1	Anzucht von Bakterien.....	32
5.2	Lagerung von Bakterien	32
5.3	Bestimmung des Bakterientiters	33
6	RNA-Arbeiten.....	33
6.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	33
6.2	DNase-Verdau von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i>	35
6.3	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i>	35
6.4	Auftrennung von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> mittels Gelelektrophorese	35
6.5	PCR-Kontrolle auf DNA	36
6.6	RNA-Konzentrationsbestimmung	36
6.7	Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA	37
6.8	Kontroll-Gel	39
6.9	Hybridisierung gegen Mikroarrays	40
6.10	Hybridisierung unter Deckgläschen.....	40
6.11	Waschen der Slides	41
6.12	Auswertung der hybridisierten Slides.....	41
6.13	Quantitative Real-Time PCR mit dem LightCycler.....	41
6.14	Auswertung der Expressionsanalyse	42
7	DNA-Analysen.....	43
7.1	Gesamt-DNA-Isolierung aus <i>C. glutamicum</i>	43
7.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
7.3	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten.....	45
IV	Ergebnisse.....	48
1	Analyse des <i>C. glutamicum</i> -Genoms auf Komponenten der Stringenten Kontrolle	48
2	Vergleich der Transkriptionsprofile eines <i>C. glutamicum rel</i> ⁺ - und eines <i>rel</i> -Stammes.....	49
3	Vergleich der Transkriptionsprofile nach Auslösen der Stringenten Kontrolle mittels DL-Serinhydroxamat.....	53

3.1	Zeitaufgelöste Analyse der Expression der Histidin- und Serin-Biosynthesegene in <i>C. glutamicum</i> RES 167.....	53
3.2	Validierung der <i>rel</i> -abhängigen Transkription von ausgewählten Genen	55
3.3	Vergleich der Transkriptionsprofile der <i>C. glutamicum rel</i> ⁺ - und <i>rel</i> -Stämme mittels Mikroarray-Hybridisierung	56
3.4	Gene, die der <i>rel</i> -abhängigen stringenten Kontrolle unterliegen (Klasse A).....	59
3.5	Gene, die <i>rel</i> -unabhängig in Antwort auf SHX-Zugabe reguliert werden (Klasse B).....	62
3.6	Gene, deren Transkription nur im <i>rel</i> -Stamm verändert sind (Klasse C)	62
V	Diskussion	64
1	Zeitlicher Verlauf der Transkriptionsänderung der Histidin- und Serinbiosynthesegene	65
2	Rel-abhängig und Rel-unabhängig regulierte Gene in <i>C. glutamicum</i>	66
2.1	Stringent regulierte Gene in <i>C. glutamicum</i> (Klasse A)	67
2.2	Rel-unabhängig regulierte Gene in <i>C. glutamicum</i> (Klasse B)	68
2.3	Nur im <i>rel</i> -Stamm differentiell regulierte Gene (Klasse C)	69
3	Modell der Stringenten Kontrolle in <i>C. glutamicum</i>	70
4	Ausblick.....	72
VI	Literatur	73
VII	Anhang	89
1	Verwendete Abkürzungen.....	89
2	Tabellen	91

I Zusammenfassung

Die Stringente Kontrolle ist die erste Reaktion eines Mikroorganismus auf Imbalancen im Stoffwechsel der Aminosäuren. Dabei wirkt das ungewöhnliche Nukleotid (p)ppGpp als globaler Regulator und re-programmiert die bakterielle Transkription. In dieser Arbeit wurde das von der stringenten Kontrolle regulierte, globale Netzwerk von *Corynebacterium glutamicum* charakterisiert.

Es wurden zunächst die Transkriptome einer *C. glutamicum rel*-Mutante, die kein (p)ppGpp synthetisieren kann und somit nicht in der Lage ist, die Stringente Kontrolle auszulösen, und seines *rel*⁺-Vorläuferstammes durch kompetitive Hybridisierung mit genomweiten DNA-Mikroarrays miteinander verglichen. Es zeigten sich komplexe Unterschiede: insgesamt waren 357 Gene im *rel*-Stamm differentiell transkribiert. In einem weiteren Ansatz wurde versucht, diese Komplexität zu reduzieren. Dazu wurde zunächst durch Addition von DL-Serinhydroxamat (SHX) zum *rel*⁺-Stamm die Stringente Kontrolle ausgelöst und der zeitliche Verlauf des Effekts auf die Transkription der Histidin- und Serinbiosynthesegene mittels *real-time* RT-PCR gemessen. Es zeigte sich, dass alle Gene der beiden Biosynthesen positiv stringent kontrolliert werden und dass der Effekt zehn Minuten nach Zugabe von SHX sein Maximum erreicht. Im Anschluss daran wurden die Transkriptome des *C. glutamicum rel*⁺- und *rel*-Stammes jeweils vor und 10 Minuten nach der Zugabe von SHX miteinander verglichen. Die differentiell exprimierten Gene wurden dann in drei Gruppen unterteilt: Klasse A enthält die Gene, die nur im *rel*⁺-Stamm reguliert sind (*rel*-abhängige Stringente Kontrolle). In dieser Gruppe sind das Gen für den alternativen Sigmafaktor *sigB* (positiv reguliert) sowie eine Reihe von Genen des Stickstoffmetabolismus (negativ reguliert) enthalten. Klasse B besteht aus den Genen, die als Antwort auf die Zugabe von SHX in beiden Stämmen differentiell reguliert sind (*rel*-unabhängige Kontrolle); die meisten Gene für ribosomale Proteine, die ausnahmslos negativ reguliert werden, sind hier enthalten. In Klasse C sind diejenigen Gene eingeordnet, die nur im *rel*-Stamm unterschiedlich transkribiert werden, wie z.B. mehrere globale Transkriptionsregulatoren, die möglicherweise mit für das komplexe Expressionsmuster im zunächst durchgeführten Mikroarray-Experiment verantwortlich sind. Damit konnten eine Reihe von Gemeinsamkeiten (Histidinsynthese, alternativer Sigmafaktor) wie auch Unterschiede (Stickstoff-Metabolismus, ribosomale Proteine) zur Stringenten Kontrolle im Modellorganismus *E. coli* gefunden werden.

II Einleitung

1 Die Gattung der Corynebakterien

1.1 Taxonomie der Corynebakterien

Der Name der Corynebakterien entstammt dem griechischen (koryne = Keule) und bezieht sich auf die hantel- bzw. keulenförmige Morphologie der Zellen. Zum ersten Mal beschrieben wurden sie 1896 von Lehmann und Neumann, die mit *Corynebacterium diphtheriae* und *Corynebacterium xerosis* diese Gruppe der Bakterien gründeten. In einer neueren Einteilung werden sie in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* in der Sektion „Irregular nonsporing gram-positive rods“ als „Genus *Corynebacterium* Lehmann und Neumann 1896“ geführt (Collins und Cummins, 1986). Sie gehören der Gruppe der gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt an (Liebl, 1991). Erste chemotaxische Studien basierten auf der Zusammensetzung der Zellmembran, die Peptidoglykanstruktur mit *meso*-Diamonipimelat, dem Vorkommen von Mykolsäuren in der Membran sowie einer Analyse des Lipidprofils. Aufgrund von Ähnlichkeiten in Aufbau und Struktur der Zellwand wurden die Genera *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* in der sogenannten CMN-Gruppe zusammengefasst (Lechevalier und Lechavalier, 1970). Eine neuere Einteilung beruht auf der Analyse der 16S rRNA/rDNA Sequenz (Stackebrand *et al.*, 1997). Es wurde die neue Klasse der *Actinobacteria* vorgeschlagen, deren Mitglieder > 80% 16S rDNA Sequenzidentität besitzen. Nach der neuen Hierarchie gehören die Corynebakterien zum Genus *Corynebacterium*, Klasse *Actinobacteria*, Unterklasse *Actinobacteridae*, Ordnung *Actinomycetales*, Unterordnung *Corynebacterinae*, Familie *Corynebacteriaceae* (Abbildung II.1).

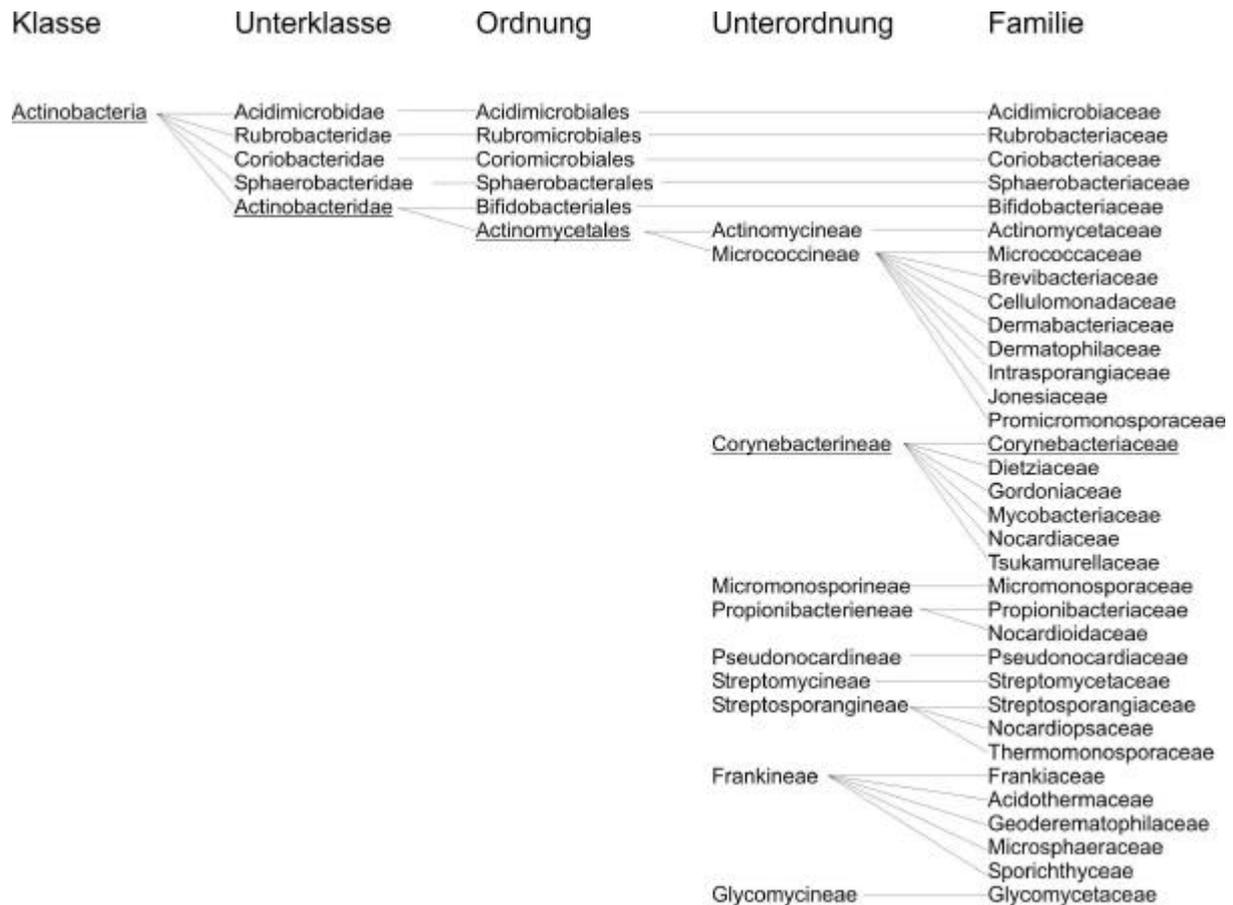


Abb. II.1: Hierarchische Einteilung der *Actinobacteria* nach Stackebrandt *et al.* (1997). Aus „Handbook of *Corynebacterium glutamicum*“ (2005).

1.2 Die wirtschaftliche Bedeutung der Corynebakterien

Ihre wirtschaftliche Bedeutung erlangten Mitglieder der Familie *Corynebacterium* durch ihre StoffwechsellLeistungen. Sie sind in der Lage Nukleotide (Ogata *et al.*, 1976), Antibiotika (Suzuki *et al.*, 1972), Oberflächenaktiva (Zajic *et al.*, 1977) oder Vitamin C-Vorstufen (Anderson *et al.*, 1985) zu bilden. Von besonderem Interesse ist allerdings die Fähigkeit einiger *Corynebacterium glutamicum*-Stämme L-Aminosäuren wie L-Glutamat, L-Lysin oder L-Aspartat in den Kulturüberstand abzugeben (z.B. Kinoshita *et al.*, 1957; Nakayama *et al.*, 1979; Teresawa *et al.*, 1985). Von großem wirtschaftlichen Interesse sind besonders die drei oben genannten L-Aminosäuren, da sie in der Industrie als Geschmacksverstärker (L-Glutamat), als Süßstoff (L-Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester, Aspartam®) oder als Futtermitteladditiv zur Steigerung des Nährwertes pflanzlichen Tierfutters (Leuchtenberger *et al.*,

1984) Einsatz finden. Die jährliche biotechnologische Produktion mittels verschiedener *C. glutamicum*-Stämme für die Aminosäure L-Lysin liegt bei ca. 550.000 Tonnen (Hermann, 2003).

1.3 Analyse des Genoms von *Corynebacterium glutamicum*

Um das *C. glutamicum*-Genom analysieren zu können, war es zwingend notwendig zunächst die Sequenz zu ermitteln. Grundsätzlich gibt es dabei zwei Strategien wie ein Genom sequenziert werden kann. Die erste Methode besteht in der Shotgun-Sequenzierung, die zweite in der Erstellung eines minimalen Sets an überlappenden Klonen, die anschliessend sequenziert werden. Für die zweite Methode bieten sich Cosmide bzw. BACs (*bacterial artificial chromosome*) als Vektoren an. Bei der Sequenzierung des *C. glutamicum* Genoms wurde zunächst eine Makrorestriktionskarte mit der Endonuklease *SwaI* mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) sowie eine Cosmidbank mit ca. 28-facher Abdeckung erstellt (Bathe *et al.*, 1996). Im ersten Anlauf sollte eine geordnete Karte minimal überlappender Cosmide erstellt werden. Dazu wurden Cosmide endständig markiert und die Proben mittels Southern-Hybridisierung gegen die gesamte Cosmidbank getestet. Durch ein iteratives Verfahren konnten von überlappenden Cosmiden Bereiche kontinuierlicher Abdeckung (Contigs) gebildet werden (Brockmann-Gretza, 1998). Insgesamt konnten 95 Cosmide in 16 Contigs angeordnet werden (Tauch *et al.*, 2002a). Die Cosmide wurden anschliessend im *shotgun*-Verfahren sequenziert. Um die noch verbleibenden Lücken zu schliessen, wurde eine BAC-Bank angelegt. Es wurden 35 zufällig ausgewählte BACs terminal ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit den aus der Cosmid-Sequenzierung bekannten Sequenzen verglichen. Lagen beide Enden in einer bekannten Sequenz, so galt eine Lücke als geschlossen; auf diese Weise konnten acht Lücken geschlossen werden. Daraufhin wurden markierte DNA-Proben der Contig-Enden hergestellt und gegen die BAC-Bank hybridisiert. Insgesamt wurden so 21 BACs gefunden, die die verbliebenen Lücken schlossen. Die BACs wurden dann ebenfalls im *shotgun*-Verfahren sequenziert (Tauch *et al.*, 2002a). Die Genomgrösse von *C. glutamicum* beträgt 3.282.708 bp und enthält nach automatischer sowie manueller Annotation 3002 Protein-kodierende Gene (Kalinowski *et al.*, 2003). Die automatische Annotation erfolgte mittels GenDB (Meyer *et al.*, 2003), das identi-

fizieren von potenziellen Genen durch CRITICA (Badger und Olson, 1999) sowie GLIMMER (Delcher *et al.*, 1999). Durch Homologievergleiche zu bekannten Proteinen konnten 2.489 potentiellen Genen Funktionen zugewiesen werden (Kalinowski *et al.*, 2002). Eine grafische Übersicht über das Genom gibt Abbildung II.2.

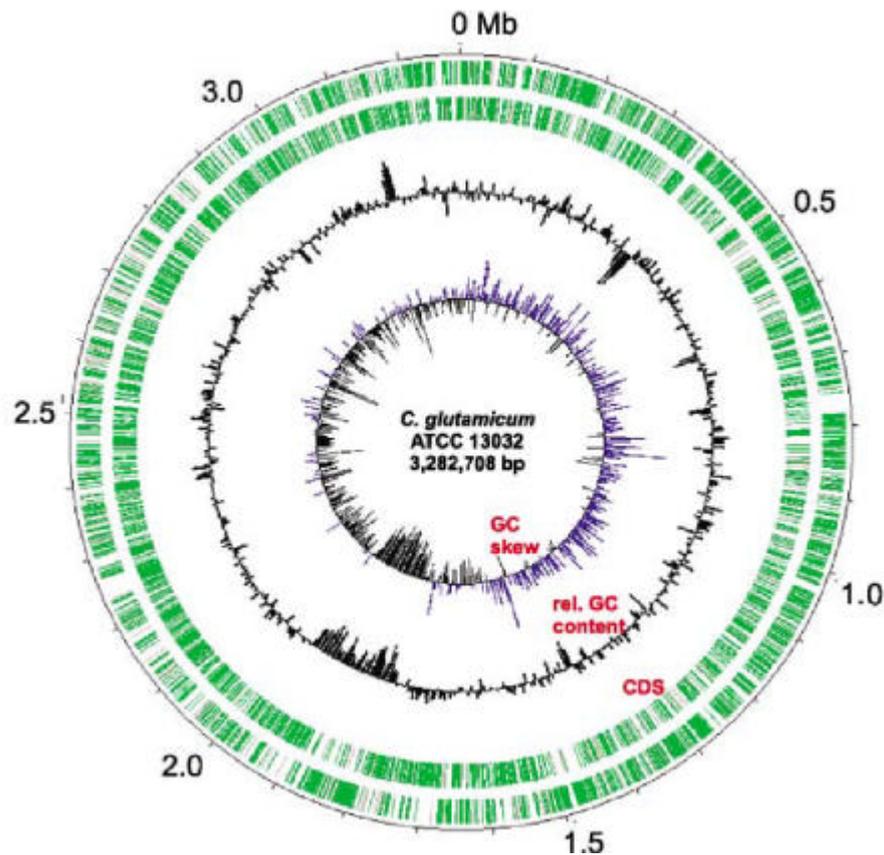


Abb. II.2: Zirkuläre Abbildung des *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 Genoms. Die einzelnen Kreise bezeichnen (von aussen nach innen): Kodiersequenzen (CDS) im bzw. gegen den Uhrzeigersinn, relativer GC-Gehalt und der GC-Skew (Grigoriev, 1998). Eine positive Abweichung vom mittleren GC-Gehalt ist durch Balken nach aussen, eine negative Abweichung durch Balken nach innen repräsentiert. In der GC-Skew Abbildung sind positive Werte in blau und negative Werte in rot dargestellt (Kalinowski *et al.*, 2003).

1.4 Methoden zur transkriptionellen Analyse von *C. glutamicum*

Nach der Sequenzierung und Annotation des Genoms ist es möglich, die Änderung der Transkriptionsstärke aller Gene auf globaler Ebene zu messen. Unter dem Begriff der Transcriptomics versteht man die globale Untersuchung aller mRNA-Moleküle, die zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen in einer Zelle exprimiert werden. Werden zwei solcher Zustände miteinander verglichen, so wird ein Expressionsmuster erhalten, das die Unterschiede in den Konzentrationen der vorhandenen Transkripte in beiden Zuständen widerspiegelt.

Eine Mikroarray-Hybridisierung beruht auf den gleichen Prinzipien wie ein Northern- oder Dot-Blot. In allen Fällen wird eine Nukleinsäure auf einer Oberfläche immobilisiert und durch eine markierte Sonde sichtbar gemacht. Bei einem Array wird eine Nukleinsäure mit bekannter Sequenz auf einer Oberfläche immobilisiert. Dabei kann es sich um PCR-Produkte oder Oligonukleotide handeln. Um Kreuzhybridisierungen auszuschließen, ist bei der Auswahl der Primer für die PCR-Produkte bzw. bei der Auswahl der Oligonukleotide zu beachten, dass die Sequenzen eindeutig sind, d.h. nur einmal im Genom vorkommen. Bei einem Gesamtgenom-Array repräsentiert dabei jede Sequenz eine Kodierregion des Organismus. Da die genaue Lage auf dem Array für jede Sequenz bekannt ist, lässt sich jedes erhaltene Hybridisierungssignal eindeutig einer Kodierregion zuordnen. Dabei ist die Signalstärke proportional zur Abundanz der gebundenen Sonde. Aus dem Quotienten der Signalstärken zweier Messungen errechnet sich das Verhältnis der beiden mRNA-Mengen der Proben zueinander. Dies bedeutet, dass die Transkriptomanalyse mittels Mikroarrays ein relativ quantifizierendes Verfahren ist. Es wird immer eine Testbedingung mit einer Kontrollbedingung verglichen.

Bei der Hybridisierung kommen in der Regel cDNA-Sonden zum Einsatz. Dafür wird die isolierte RNA mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Bei Eukaryoten werden dabei polyT-Primer und bei Prokaryoten *random primer* mit sechs bis neun Nukleotiden Länge verwendet. Bei der reversen Transkription werden entweder fluoreszenzmarkierte Nukleotide oder chemisch modifizierte Nukleotide eingesetzt, an die erst in einem zweiten Schritt die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt werden (Yu *et al.*, 2002). Für die Probe und die Kontrolle werden zwei unterschiedli-

che Farbstoffe, wie z.B. Cy3 und Cy5, benutzt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Farbstoffe können beide Proben auf einem Mikroarray gleichzeitig hybridisiert werden, was zu einer sehr guten Vergleichbarkeit führt, da beide Proben unter den gleichen Bedingungen hybridisiert werden. Anwendung finden Mikroarrays sowohl bei Eukaryoten als auch Prokaryoten bei der Untersuchung von Stress- und Umwelteinflüssen, vom Zellzyklus und von Regulationsnetzwerken. Dabei dienen Mikroarrayanalysen als globales Screening-System, um einen Überblick über das transkriptionale Verhalten aller Gene zu bekommen. Abbildung II.3 gibt eine Übersicht über den Verlauf eines Hybridisierungsexperimentes. In einem weiteren Schritt werden üblicherweise die Ergebnisse ausgewählter Gene mit dem sensitiveren Verfahren der real-time Reverse Transkriptase-PCR verifiziert.

Bei einer real-time RT-PCR wird im ersten Schritt die RNA mittels einer reversen

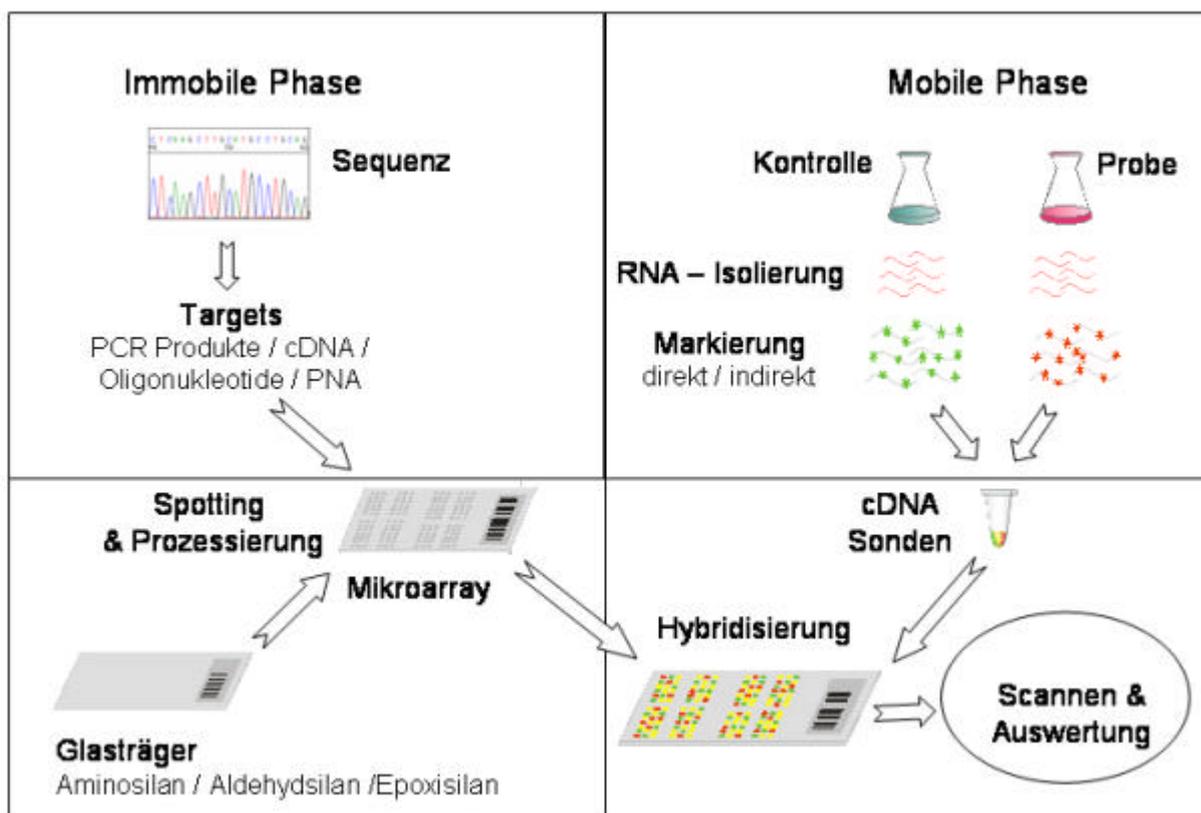


Abb. II.3: Grundsätzlicher Aufbau eines Array-Experimentes. Es sind die verschiedenen Abschnitte eines Experimentes gezeigt. Auf der linken Seite sind die Schritte zur Herstellung eines Arrays gezeigt, rechts die Sondenherstellung, Hybridisierung und Auswertung (nach Hüser, 2005b)

Transkription in eine cDNA umgeschrieben. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Methoden: (1) eine two-step RT-PCR, bei der die reverse Transkription in einem zusätzlichen Schritt vor der eigentlichen PCR durchgeführt wird und (2) eine one-step RT-PCR, bei der die reverse Transkription und die anschließende PCR direkt hintereinander in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die so erhaltene cDNA wird dann in einer PCR-Reaktion vervielfältigt, wobei nach jedem PCR-Zyklus eine quantitative Bestimmung des erhaltenen Produktes stattfindet. Je nach verwendeter Methode ist entweder ein Fluoreszenzfarbstoff im Reaktionsansatz enthalten, oder es werden fluoreszenzmarkierte Primer verwendet. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei der im Ansatz enthaltenen DNA und somit der eingesetzten RNA proportional. Aus der erhaltenen Fluoreszenzkurve kann entweder mittels eines Standards auf die absolute Anzahl an mRNA-Molekülen im Ansatz zurückgerechnet oder durch den Vergleich zweier Kurven das Verhältnis der in den Proben enthaltenen mRNA-Moleküle ermittelt werden. Durch die hohe Sensitivität, aber geringe Parallelisierbarkeit der real-time RT-PCR, eignet sie sich nicht als Screening-System, aber ist die geeignete Methode um Mikroarray-Ergebnisse zu validieren.

1.5 Anwendungen von Mikroarrays bei *C. glutamicum*

Nachdem das *C. glutamicum*-Genom sequenziert war, wurde zunächst ein Gesamtgenomarray in Form eines Makroarrays sowie zwei Mikroarrays, mit jeweils einer Auswahl an Genen, erstellt. Zunächst wurde das Wachstum von *C. glutamicum* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht (Hayashi *et al.*, 2002) und die Änderungen im Transkriptom während zweier Wachstumsphasen (Loos *et al.*, 2001) ermittelt. Mit den ersten Makroarrays wurden zunächst die Transkriptome während des Wachstums auf Acetat und Glukose verglichen, sowie die Änderung im Transkriptom im Zuge der Hitzeschockantwort gemessen (Muffler *et al.*, 2002). Im Laufe der Jahre sind dann von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Mikroarrays fertiggestellt worden, so dass die Anzahl der Untersuchungen angestiegen ist. Dabei spiegeln die Arten der Anwendungen das Einsatzgebiet der Mikroarrays sowie das spezielle Interesse an *C. glutamicum* als Aminosäureproduzent wieder. Es werden dabei globale Regulationsnetzwerke als auch Stressantworten oder die Netzwerke einzelner Regulatoren untersucht (Wendisch, 2003; Wendisch *et al.*, 2006).

1.6 Die Grundlagen der Stringenten Kontrolle in *Escherichia coli*

Historisch gesehen wurde ein Stopp der Akkumulation von stabiler RNA (rRNA und tRNA) als Antwort auf einen Aminosäuremangel (Sands und Roberts, 1952) entdeckt; dies war der erste Hinweis auf die Stringente Kontrolle. Anschliessende Untersuchungen ergaben, dass Mutationen in einem bestimmten Genlokus bei *E. coli* zu einer kontinuierlichen rRNA-Akkumulation bei einem Aminosäuremangel führten. Diese Antwort wurde im Vergleich zum Wildtyp „relaxiert“ genannt (Stent und Brenner, 1961). Entsprechend wurde der Genlokus *relA* genannt. Durch Untersuchungen von Stämmen mit Mutationen in der tRNA-Synthetase wurde festgestellt, dass nicht der Mangel an freien Aminosäuren sondern das Beladen der tRNAs das Signal für die Stringente Kontrolle ist (Neidhardt, 1963; Neidhardt, 1966). Weitere Studien mit *relA*-Mutanten ergaben das nicht nur ein Aminosäuremangel sondern auch andere Limitierungen wie etwa Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphatlimitierung zum Auslösen der stringenten Kontrolle führen können.

Ein weiteres Phänomen neben der Abnahme der Menge an stabiler RNA ist das Auftreten zweier ungewöhnlicher Guanosin-Nukleotide während eines Aminosäuremangels. Zunächst wurden diese als „magic spot I“ und „magic spot II“ bezeichnet und später als Guanosin-Tetraphosphat (ppGpp) und Guanosin-Pentaphosphat (pppGpp) identifiziert (Cashel, 1969; Cashel und Gallant, 1969) Beide zusammen werden mit dem Begriff (p)ppGpp bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass *relA*-Mutanten nicht mehr in der Lage waren (p)ppGpp während eines Aminosäuremangels zu synthetisieren. Dies führte zu der Annahme, dass (p)ppGpp ein Effektor der „stringenten Kontrolle“ sei.

Im Laufe der Jahre konnten alle weiteren an der Stringenten Kontrolle beteiligten Gene bzw. deren abgeleitete Proteine identifiziert werden und somit der (p)ppGpp Metabolismus in *E. coli* aufgeklärt werden (Abbildung II.4).

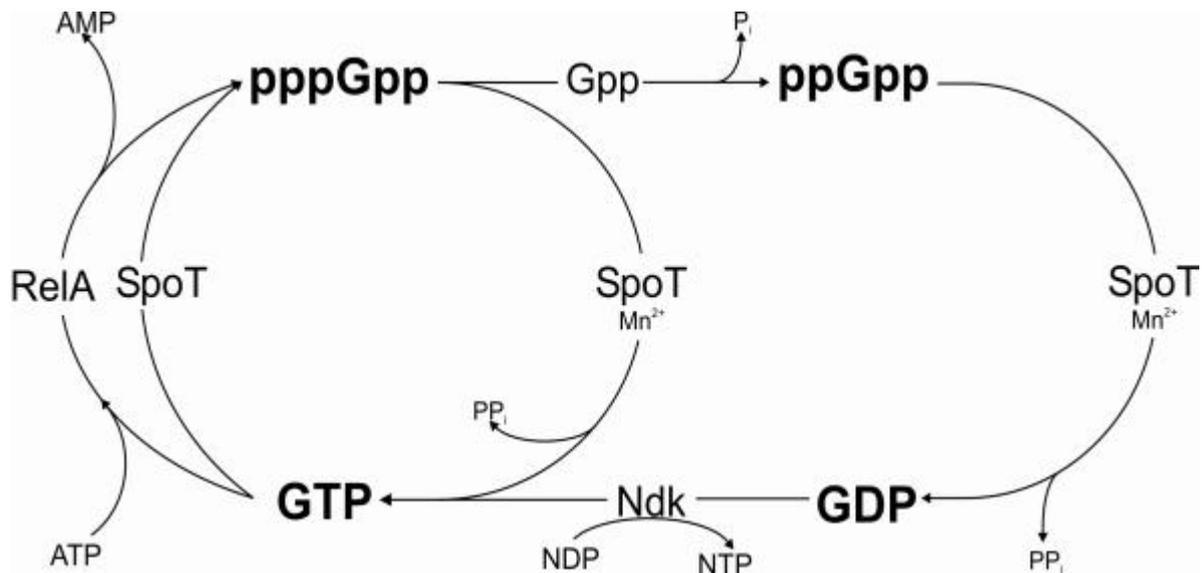


Abb. II.4: Schematische Übersicht über den zellulären (p)ppGpp Metabolismus von *E. coli*. Es sind nur die physiologisch relevanten Reaktionen aufgeführt. Die beteiligten Enzyme sind: (p)ppGpp Synthetase I (RelA), (p)ppGpp Synthetase II und (p)ppGpp-3'-Pyrophosphohydrolase (SpoT), pppGpp-5'-Phosphohydrolase (Gpp) und Nukleosid-5'-Diphosphokinase (Ndk) (nach Cashel *et al.*, 1996).

1.7 Die Komponenten der Stringenten Kontrolle in *Escherichia coli*

relA

Das *relA* Gen ist bei 60 min auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert und kodiert für die 77 kDa grosse (p)ppGpp Synthetase I (PS I) (Cochran und Byrne, 1974; Haseltine *et al.*, 1972). Das RelA Protein liegt Ribosomen-assoziiert vor, wobei aber nur ein geringer Teil der Ribosomen das Enzym gebunden hat (Justesen *et al.*, 1986); eine Untersuchung geht sogar von nur einem RelA Protein pro 200 Ribosomen aus (Pedersen und Kjeldgaard, 1977). Aufgereinigtes RelA Protein ist nicht in der Lage, ohne Ribosomen (p)ppGpp zu synthetisieren, aber eine Aktivierung durch Ethanol oder spezifische Proteine ist möglich. Daraus ergibt sich, dass das Aktivierungssignal vom Ribosom stammt und eine Konformationsänderung des RelA Proteins zur Folge hat (Christiansen und Nierhaus, 1976; Pedersen und Kjeldgaard, 1977). Tatsächlich führen Mutationen im *rplK* Gen, das das ribosomale L11 Protein kodiert, zu einem relaxierten Phänotyp (Friesen *et al.*, 1974). Liegt das RelA Protein an ein Ribosom gebunden vor, so kommt es bei Zugabe von mRNA, einer codon-spezifischen, unbeladenen tRNA, ATP und GTP *in vitro* zur (p)ppGpp Synthese (Haseltine und Bock,

1973; Pedersen *et al.*, 1973). Die Synthesereaktion generiert einen Transfer einer Pyrophosphatgruppe des β,γ -Phosphates des ATPs auf die Ribose-3'-Hydroxylgruppe des GTPs oder GDPs, woraus pppGpp bzw. ppGpp entsteht (Lipmann und Sy, 1976; Sy und Lipmann 1973). Die unbeladene tRNA bindet ohne den Elongationsfaktor EF-Tu direkt an die Akzeptorstelle des Ribosoms und es unterbleibt die Ribosomenwanderung während des Elongationsschrittes in der Proteinsynthese (Haseltine und Block, 1973; Haseltine *et al.*, 1972). Dieser auch „Ribosomenstillstand“ genannte Prozess wurde als erstes von Cashel und Gallant beschrieben (Cashel und Gallant, 1969). Es wird davon ausgegangen, dass stillstehende Ribosomen einen Zyklus von tRNA-Bindung und -Freisetzung sowie (p)ppGpp-Synthese solange durchlaufen bis aminoacylierte tRNAs wieder zur Verfügung stehen (Richter, 1976, 1979). Auf der Grundlage der Reaktionskinetiken und sowie des intrazellulären GDP bzw. GTP Pools kann davon ausgegangen werden dass pppGpp *in vivo* das Hauptreaktionsprodukt der (p)ppGpp Synthetase I ist (Cochran und Byrne, 1974; Pedersen und Kjeldgaard, 1977). Ferner konnte mit einem N-terminalen Fragment des RelA-Proteins (*relA*) gezeigt werden, dass dieses eine konstitutive, tRNA- und Ribosomen-unabhängige (p)ppGpp-Syntheseaktivität hat. Daraus lässt sich die Existenz von physikalisch und funktionell getrennten Domänen im RelA-Protein für die Ribosomenbindung und (p)ppGpp Synthese ableiten (Schreiber *et al.*, 1991)

spoT

Das *spoT* Gen ist bei 82 min auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert und kodiert für die 80 kDa grosse (p)ppGpp Synthetase II (PS II) (Fehr und Richter, 1981; Richter, 1979). Zunächst wurde SpoT als das Hauptenzym der (p)ppGpp Degradation identifiziert, die (p)ppGpp 3'-Pyrophosphohydrolase (Heinemeyer und Richter, 1977; Sy, 1977). Die Hydrolasereaktion ist Mn^{2+} -abhängig und katalysiert das Entfernen einer Pyrophosphatgruppe von ppGpp oder pppGpp mit GTP bzw. GDP und einem Pyrophosphat als Endprodukt (Heinemeyer und Richter, 1978; Heinemeyer *et al.*, 1978; Heinemeyer und Richter, 1977). Da *relA*-Null-Mutanten unter z.B. Glukosemangelbedingungen noch (p)ppGpp akkumulieren, muss noch ein alternativer Syntheseweg zur Verfügung stehen, die (p)ppGpp Synthetase II. Erst in *relA/spoT*-Doppelmutanten ist kein zelluläres (p)ppGpp mehr detektierbar (Xiao *et al.*, 1991). Sequenzanalysen zeigen, dass RelA und SpoT über einen weiten Bereich signifikante Aminosäurehomologien aufweisen (Metzger *et al.*, 1989), was die gemeinsame Synthetase-Aktivität

erklären würde. Bisher ist allerdings das Signal noch unbekannt, dass zwischen RelA- und SpoT-abhängiger (p)ppGpp-Synthese umschaltet. Im Gegensatz zur RelA-abhängigen (p)ppGpp Synthese, die unter Aminosäuremangel auftritt, wird die SpoT-abhängige (p)ppGpp-Akkumulation davon sogar inhibiert (Lagosky und Chang, 1980; 1981). Sie reagiert dagegen eher auf Schwankungen im Energiepool der Zelle, wie z.B. Glukosemangel (Friesen *et al.*, 1975; Gallant *et al.*, 1972).

rplK

Die Ribosomenabhängigkeit der (p)ppGpp-Synthese führte ursprünglich zu der Vermutung, dass Mutationen in ribosomalen Untereinheiten zu einem relaxierten Phänotyp führen könnten. Mutationen im *rplK* Gen, das für das L11-Protein der 50S-Ribosomenuntereinheit kodiert, führten *in vivo* und *in vitro* dann tatsächlich zu einer relaxierten RNA-Kontrolle (Friesen *et al.*, 1974). Ribosomen, die ein mutiertes RplK-Protein tragen, können zwar weiterhin das RelA-Protein binden, aber die Restaktivität zur (p)ppGpp Synthese liegt bei ca. 10% *in vitro* (Friesen *et al.*, 1974). Daraus lässt sich eine Übertragung des Aktivierungssignals auf das RelA-Protein via des RplK-Proteins ableiten (Friesen *et al.*, 1974; Parker *et al.*, 1976; Rampagnol und Davis, 1974).

ndk

Das *ndk*-Gen kodiert für die Nukleosid-Diphosphat-Kinase, die GDP zu GTP umwandelt und damit für die Regeneration des Substrates für die pppGpp Synthese zuständig ist (Cashel *et al.* 1996). Dabei phosphoryliert das Ndk-Protein GDP durch Übertragung der γ -Phosphatgruppe des ATPs (Ginther und Ingraham, 1974). Obwohl noch andere Enzyme GDP zu GTP konvertieren können, wird *in vivo* dem *ndk* - Genprodukt die Hauptaktivität in der GTP-Regeneration im (p)ppGpp-Kreislauf zugeschrieben (Kari *et al.*, 1977).

gpp

Die Guanosine-Pentaphosphatase (pppGpp γ -Phosphohydrolase) wird durch das *gpp* Gen kodiert, das bei 84 Minuten auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert ist (Sommerville und Ahmed, 1979). Obwohl auch andere Enzyme diese Reaktion katalysieren können (Hamel und Cashel, 1973; Keasling *et al.* 1993) wird die Konvertierung von pppGpp zu ppGpp während der stringenten Kontrolle *in vivo* hauptsächlich

vom *gpp*-Genprodukt durchgeführt (Sommerville und Ahmed, 1979). Interessant ist die Ähnlichkeit der Gpp- und Ppx-Peptidsequenzen (Polyphosphat-Exonuklease; Reizer *et al.*, 1993), was zu einer wechselseitigen Substratverwertung führt, d.h. das Gpp eine Polyphosphat-Hydrolase Aktivität und Ppx eine pppGpp γ -Phosphohydrolase Aktivität besitzt (Keasling *et al.*, 1993). Wird die Notwendigkeit von (p)ppGpp bei der Bildung von Polyphosphat (polyP) bei einer durch Aminosäuremangel ausgelösten stringenten Kontrolle in Betracht gezogen (Kuroda *et al.*, 1997; Ault-Riche *et al.*, 1998), so deutet dies auf eine Verbindung zwischen dem (p)ppGpp-Metabolismus und dem Polyphosphat-Stoffwechsel hin (Kornberg *et al.*, 1999).

1.8 Die molekularen Grundlagen der Stringenten Kontrolle

Reicht das Verhältnis von aminoacylierten zu freien tRNAs nicht mehr aus um den Bedarf der Protein-Biosynthese zu decken, so kommt es zur Bildung von (p)ppGpp (Haseltine und Bock, 1973). Im Gegensatz zu Regulationsmechanismen, die auf aus Proteinen bestehenden Regulatoren basieren und die an die RNA-Polymerase (RNAP) bzw. an regulatorische Motive in der DNA-Sequenz binden, wirkt (p)ppGpp im Stadium der Transkriptionsinitiation. Insbesondere sind die Bildung des offenen Komplexes und/oder die ersten Schritte der RNA-Synthese davon betroffen (Cashel *et al.*, 1996; Wagner, 2002). Bindet (p)ppGpp an die RNAP, so kommt es zu einer Inhibition der Transkription zahlreicher Gene (z.B. rRNA, tRNA usw.) bzw. zu einer verstärkten Transkription eines zweiten Sets an Genen (z.B. Aminosäurebiosynthese-Gene) (Cashel *et al.* 1996; Chang *et al.*, 2002). Es ist davon auszugehen, dass die bestimmenden Faktoren inherant in den negativ regulierten Promotoren zu finden sind. Negativ regulierte Promotoren haben verschiedene Charakteristika: (1) das Vorhandensein einer GC-reichen „Diskriminator“-Sequenz zwischen der -10 Region und dem Transkriptionsstartpunkt (+1); (2) ein verkürzter 16 bp Spacer zwischen den -35 und -10 Elementen des Promotors; (3) nicht-kanonische Sequenz in der -35 Region; und (4) die Bildung kurzlebiger offener Komplexe (Barker *et al.*, 2001a, 2001b; Cashel *et al.*, 1996). Obwohl die Abhängigkeit der (p)ppGpp-abhängigen Kontrolle von diesen Faktoren für einige Promotoren bewiesen wurde (Barker *et al.*, 2001a, 2001b; Lamond und Travers, 1985; Mizushima-Sugano und Kaziro, 1985; Park *et al.*,

2002), gibt es auch zahlreiche Ausnahmen (Da Costa und Artz, 1997; Potrykus *et al.*, 2002; Zacharias *et al.*, 1989) und die Charakteristika sind auch nicht stark konserviert.

Untersuchungen mit markiertem (p)ppGpp ergaben, dass (p)ppGpp an die β -Untereinheit der RNAP bindet (Reddy *et al.*, 1995; Chatterji *et al.*, 1998). Es konnte ferner gezeigt werden, dass RNAPs mit Mutationen in der β -Untereinheit dieselben Promotoren kontrollierten wie RNAPs, die (p)ppGpp gebunden haben (Zhou und Jin, 1998). Es konnte auch gezeigt werden, dass ein Thio-Derivat von (p)ppGpp an das aminoterminal Ende der β' -Untereinheit der RNAP bindet (Toulokhonov *et al.*, 2001). In neuesten Untersuchungen konnte mittels kristallographischer Analysen des *Thermus thermophilus* RNAP-Holoenzym mit gebundenem (p)ppGpp die genaue Bindungsstelle identifiziert werden (Artsimovitch *et al.*, 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass das Guanodin-Tetraphosphat (ppGpp) an einer spezifischen Stelle in der Nähe des aktiven Zentrums der RNAP bindet. Die Bindung erfolgt über die Diphosphate im (p)ppGpp an stark konservierte Aminosäurereste (z.B. Arg β 879 und Arg β' 1029). Dabei ergeben sich aus der Struktur des RNAP/(p)ppGpp-Komplexes drei mögliche Arten der Regulation: (1) durch die Asymmetrie in der Bindung des ppGpp's an der Bindestelle kann es entweder zu einer Erleichterung oder Verlangsamung der Substratbindung und -katalyse kommen; (2) die Konkurrenz bei der Bindung an dieselben basischen Aminosäurereste (z.B. Arg β 879) zwischen (p)ppGpp und dem NTP kann eine Regulationsart sein (Jores und Wagner, 2003; Wagner, 2002); und (3) an die RNAP gebundenes (p)ppGpp kann mit den Cytosinen des nicht-kodierenden DNA-Stranges eine Basenpaarung eingehen und dadurch den Translokationsschritt verlangsamen und/oder die DNA/Protein-Interaktionen, die den offenen Komplex stabilisieren, stören und somit die Halbwertszeit senken. Dies führt zu einer Inhibition der Transkription (Artsimovitch *et al.*, 2004).

1.9 Die pleiotropen Effekte der Stringenten Kontrolle in *E. coli*

Bereits die ersten Vergleiche zwischen „relaxierten“ und „stringenten“ Stämmen während eines Aminosäuremangels zeigten vielfältige Unterschiede (siehe Tabelle II.1).

Untersuchungen der Proteinkomposition mit 2D-Gelanalyse und der stabilen RNA-Spezies ergaben, dass etwa die Hälfte aller Proteinspots verändert sind, wobei in etwa eine Gleichverteilung von positiv und negativ veränderten Proteinspots herrscht und die RNA-Spezies durchweg in ihrer Transkription inhibiert wurden (Furano und Witel, 1976; Ikemura und Dahlberg, 1973; Kingston *et al.*, 1981; Reeh *et al.*, 1976). In analogen Studien, in denen die (p)ppGpp-Akkumulation künstlich ausgelöst wurde oder in denen *relA*- oder *spoT*-Mutanten verwendet wurden, konnten die Ergebnisse bestätigt werden (Jones *et al.*, 1992; Schreiber *et al.*, 1991). Eine Übersicht über die pleiotropen Effekte der stringenten Kontrolle in *E. coli* gibt Tabelle II.1, die jedoch keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Eine weitere Schwierigkeit bei der Analyse ist die Unterscheidung zwischen direkten Effekten des gestiegenen (p)ppGpp-Spiegels und sekundären, daraus resultierenden indirekten Regulationseffekten (Cashel *et al.*, 1996; VanBogelen und Neidhardt, 1990). Trotzdem können die vielseitigen Effekte in einen physiologischen Zusammenhang gebracht werden. Die Stringente Kontrolle wird als Reaktion auf einen Mangelzustand gesehen, der einen Mangel an aminoacylierter tRNA zur Folge hat, und ermöglicht den Bakterienzellen sich an die ungünstige Situation zu adaptieren. Die Synthese von Proteinen und stabiler RNA, die während der Mangelsituation im Überschuss vorhanden sind, wird vermindert, um der Zelle das Überleben zu gewährleisten.

Einer der ersten Effekte eines erhöhten intrazellulären (p)ppGpp-Spiegels war eine rapide Abnahme der rRNA- und tRNA-Synthese. Da die Synthese stabiler RNA direkt mit der Wachstumsrate eines Mikroorganismus korreliert, kann angenommen werden, dass (p)ppGpp direkt Einfluss auf die Wachstumsrate nimmt (Chatterji und Qjha, 2001). Im Zuge weiterer Untersuchungen hat sich jedoch gezeigt, dass die Rolle von (p)ppGpp als Regulator der rRNA-Synthese erweitert werden muss. Neben der Reduktion der Ribosomen- und Proteinbiosynthese kommt es zu Veränderungen im Peptidoglycan-, Phospholipid-, Nukleotid- sowie der Fettsäurebiosynthese (Cashel *et al.*, 1996; Nunn und Cronan, 1974; Vanderwel, 1984). Es kommt zu einem Umleiten der Transkription weg von Genen, die für ein schnelles Wachstum und Vermehrung nötig sind, hin zu Genen, die für ein langfristiges Überleben der Zelle notwendig sind. Dabei wird die Synthese-Kapazität für makromolekulare Vorstufen sowie die Degradationskapazität für potenzielle Kohlenstoffquellen erhöht. Unter den positiv stringent kontrollierten Genen sind einige Gene bzw. Operons aus der Aminosäurebiosynthese-

se zu finden (Cashel *et al.*, 1996; s. Tabelle II.1). Ebenfalls kann eine gesteigerte Expression der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beobachtet werden, obwohl die tRNA-Synthese reduziert wurde (Gruneberg-Manago, 1996). Es liegt die Vermutung nahe, dass dies zur Vorbereitung für die Zeit dient, in der die limitierenden Aminosäuren wieder verfügbar sind und der normale Stoffwechsel wieder aufgenommen wird (Cashel *et al.*, 1996). Da es im Zuge eines Aminosäuremangels verstärkt zur Bildung unfertiger Polypeptide kommt, ist eine erhöhte Transkription von Genen für Chaperone und Proteasen festzustellen. Dies beschleunigt den Abbau der nicht-funktionalen Peptide. Diese dienen ferner als alternative Aminosäurequelle (Neidhardt *et al.*, 1984; Voellmy und Goldberg, 1980). Ein weiterer Zusammenhang zwischen der stringenten Kontrolle und dem Überleben der Zellen unter Mangelbedingungen besteht in der (p)ppGpp-abhängigen Expression des Genes *rpoS*, das für den alternativen Sigma-Faktor σ^S kodiert (Gentry *et al.*, 1993). Ferner beeinflusst (p)ppGpp die Competition der einzelnen Sigma-Faktoren untereinander, in der Art, dass alternative Sigma-Faktoren in der Gegenwart von (p)ppGpp *in vivo* signifikant besser gegen σ^{70} konkurrieren (Laurie *et al.*, 2003; Jishage *et al.*, 2002). Es konnte weiter eine Abhängigkeit der Transkription von RpoS-abhängigen Promotoren von (p)ppGpp, selbst bei einem Überschuss von RpoS, festgestellt werden (Kvint *et al.*, 2000). Dadurch kommt es zu einer Induktion der Transkription der „Stationärphasen-Gene“, damit zu einer erhöhten Resistenz der Zelle gegenüber den Stressfaktoren und letztendlich zum Überleben in Mangelperioden (Nyström, 1998). Die Stringente Kontrolle ist somit die erste Instanz der Zelle, um schnell auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren, Ressourcen zu sparen und somit unter Stressbedingungen zu überleben (Chatterji und Ojha, 2001). Abbildung II.5 gibt einen Überblick über die von (p)ppGpp beeinflussten Biosynthesewege.

Zelluläre Funktion	Auswirkungen		Referenz
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
rRNA-Synthese	-	-	Borek <i>et al.</i> , 1959
Synthese ribosomaler Proteine			
Transkription	-	-	Cashel <i>et al.</i> , 1996
Translation	-	-	Cashel <i>et al.</i> , 1996
tRNA-Transkription	-	-	Stent und Brenner, 1961
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	+	+	Gruneberg-Manago, 1996
Proteinbiosynthese			
IF-3 (InfC)		-	Elhardt <i>et al.</i> , 1982
EF-TuA (TufA)	(-)		Reeh <i>et al.</i> , 1976
EF-TuB (TufB)	-	-	Reeh <i>et al.</i> , 1976
EF-Ts, EF-G (Tsf, FusA)	-		Furano und Witel, 1976
RNA-Polymerase-Untereinheiten			
RpoA, B, C (α , β , β' -Untereinheit)	(-)	-	Lidemann <i>et al.</i> , 1979
RpoD (σ^{70} -Untereinheit)	(+)		Grossmann <i>et al.</i> , 1985
RpoH (σ^H -Untereinheit)	+		Grossmann <i>et al.</i> , 1985
RpoS (σ^S -Untereinheit)	+		Gentry <i>et al.</i> , 1993
Nukleotid-Stoffwechsel			
Adenosylsuccinat-Synthase (PurA)	-	-	Pao und Dyess, 1981
IMP-Dehydrogenase (GuaB)	-	-	Pao und Dyess, 1981
Aspartat-Transcarbamyltransferase (PyrBI)	-	-	Nomura <i>et al.</i> , 1982
Aminosäurestoffwechsel			
Arginin-Synthese (ArgECBH, ArgF, ArgI)		+	Zidwick <i>et al.</i> , 1984
Glutamat/Glutamin-Synthese (GltB, GlnA, Gdh)	+		Sales und Brenchley, 1982
Histidin-Synthese (HisD, HisB, HisG)	+	+	Rudd <i>et al.</i> , 1985
Isoleucin/Valin-Synthese (IlvA, IlvB)	+	+	Freundlich, 1977
Lysin-Synthese (LysA, LysC, DapB, Asd)	+		Patte <i>et al.</i> , 1980
Methionin-Synthese (MetC, MetF, MetK)	+		Somerville und Ahmed, 1977
Threonin-Synthese (ThrA, ThrB, ThrC)	+		Kliachko <i>et al.</i> , 1983
Hitzeschock-Proteine			
Protease La (Lon)	+		Voellmy und Goldberg, 1980
RpoH, DnaK, GroEL	+		Grossmann <i>et al.</i> , 1985
Phospholipid-Synthese	-		Nunn und Cronan, 1974
Peptidoglycan-Synthese	-		Vanderwel und Ishiguro, 1984
DNA-Synthese			
<i>oriC</i>	-		Herman <i>et al.</i> , 1994
<i>oriColE1</i>	-		Herman <i>et al.</i> , 1994
<i>oriI</i>	-		Herman <i>et al.</i> , 1994
<i>oriK</i>	-		von Meyenburg <i>et al.</i> , 1987

Tabelle II.1: Tabellarische Übersicht einer Auswahl der negativen (-) oder positiven (+) pleiotropen Effekte der stringenten Kontrolle in *E. coli in vivo* oder wenn (p)ppGpp *in vitro* zugegeben wurde. Ist eine Klammer um das entsprechende Zeichen, so handelt es sich um einen schwachen Effekt.

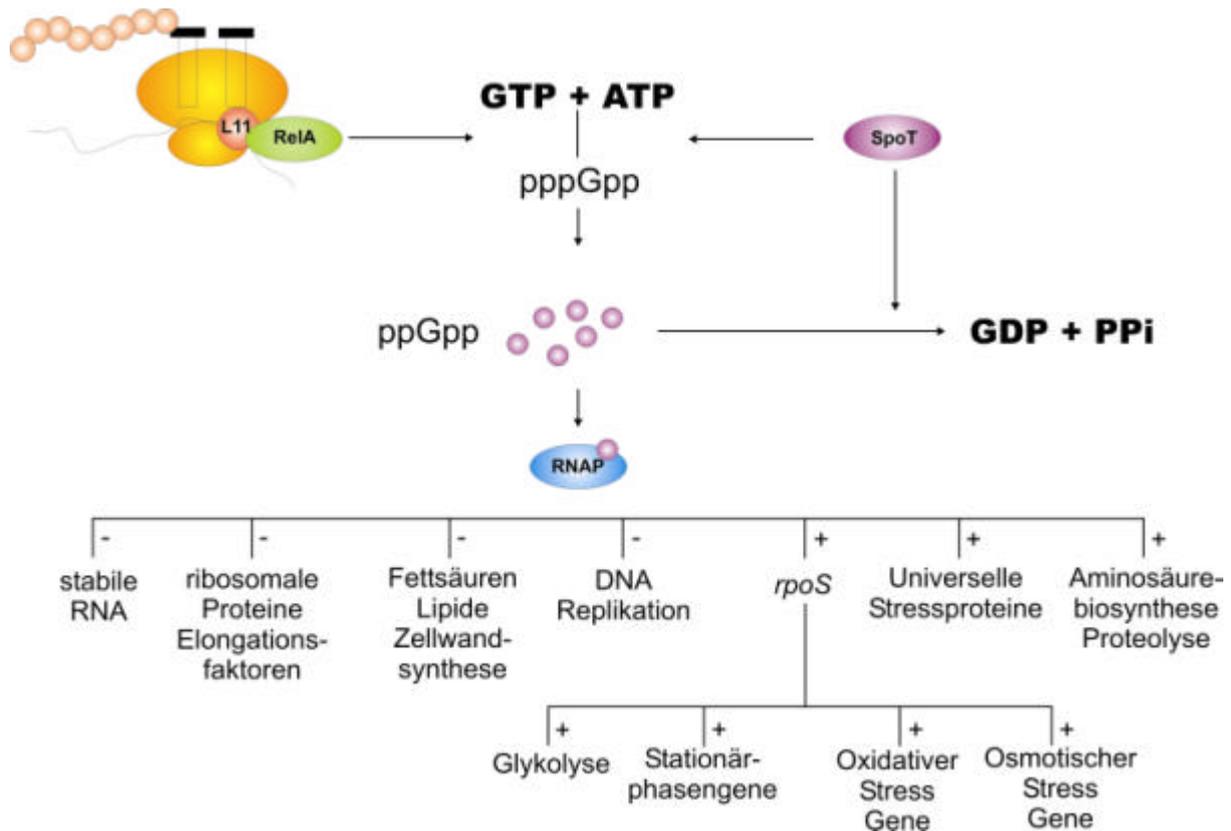


Abb. II.5: Übersicht über die pleiotropen Effekte der stringenten Kontrolle in *E. coli*. Abgebildet sind die positiven und negativen Effekte des (p)ppGpp's sowie die weiterführenden Auswirkungen einer verstärkten *rpoS*-Transkription.

1.10 Die Stringente Kontrolle in anderen Organismen

Obwohl die meisten Erkenntnisse über die Stringente Kontrolle aus *E. coli* stammen, wurden auch in anderen Organismen die am (p)ppGpp-Metabolismus beteiligten Gene gefunden. Ferner wurden in einigen Organismen die Effekte von (p)ppGpp auf den Metabolismus bzw. die Synthese der stabilen RNA-Spezies untersucht, u.a. in *Salmonella typhimurium* (Davidson und Williams, 1979; Martin, 1968; Rudd *et al.*, 1985), *Vibrio sp.* (Flärdh *et al.*, 1994), *Legionella pneumophila* (Hammer und Swanson, 1999), *Bacillus subtilis* (Eymann *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1980; Swanton und Edlin, 1972; Weinen *et al.*, 1979), *Mycobacterium tuberculosis* (Primm *et al.*, 2000) sowie einigen *Streptomyces*-Spezies (Strauch *et al.*, 1991; Ochi, 1990). Die weite Verbreitung *relA/spoT*-homologer Gene in den verschiedenen Spezies lässt den

Schluss zu, dass das Regulationssystem der stringenten Kontrolle konserviert in allen bzw. den meisten Prokaryoten vorliegt.

Mit der Fertigstellung mehrerer Sequenzierprojekte gram-positiver Organismen, wie z.B. *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich *et al.*, 1996), *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) und *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) hat sich gezeigt, dass diese nur über ein *relA/spoT*-homologes Gen verfügen. In *B. subtilis* sowie *Streptomyces coelicolor* A3(2) konnte durch funktionale Genanalysen gezeigt werden, dass die betreffenden Gene für bifunktionale Proteine kodieren, die über eine (p)ppGpp-Synthetase- sowie eine (p)ppGpp-Hydrolaseaktivität verfügen (Mechold *et al.*, 1996; Wendrich und Marahiel, 1997). Es kann also davon ausgegangen werden, dass in einigen, vorwiegend gram-positiven Organismen, ein einzelnes Gen die Funktion der beiden *E. coli relA*- und *spoT*-Gene übernimmt (Mechold *et al.*, 1996; Martinez-Costa *et al.*, 1998; Wendrich und Marahiel, 1997).

Neben dem Vorkommen von *relA/spoT*-homologen Genen in Prokaryoten wurde durch das Yeast-Two-Hybrid System in *Arabidopsis thaliana* ein RelA/SpoT homologes Protein gefunden, das mit dem RPP5-Protein der Pflanzenabwehr interagiert. Das *AtRSH* Gen konnte *E. coli relA*⁻ und *S. coelicolor relA*⁻ Stämme komplementieren; dies bedeutet dass das Gen funktional konserviert ist (van der Biezen *et al.*, 2000).

1.11 Die Stringente Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*

Zu Beginn der Untersuchungen der stringenten Kontrolle in *C. glutamicum* wurde mittels degenerierten Primern ein *relA/spoT*-homologes Genfragment durch eine PCR amplifiziert und anschliessend kloniert (Schäfer A., Universität Bielefeld). Weiterführende Untersuchungen beinhalteten Messungen der intrazellulären (p)ppGpp-Konzentration in *C. glutamicum* sowie Expressionsstudien in *E. coli*. Eine Deletion des *rel*-Genes resultierte in dem Verlust der (p)ppGpp-Akkumulation. Eine Expression des *C. glutamicum rel*-Genes in *E. coli* konnte dagegen eine Wachstumsinhibition, hervorgerufen durch eine Überexpression des *E. coli relA*-Genes, aufheben. Beide Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass das *rel*-Gen in *C. glutamicum* für ein bifunktionales Protein kodiert (Wehmeier *et al.*, 1998). Eine Mutante mit einer *in-*

frame Deletion im *rplK*-Gen, das für das ribosomale L11-Protein kodiert, konnte als Reaktion auf einen artifiziellen Aminosäuremangel kein (p)ppGpp mehr synthetisieren. Das *rplK*-Gen ist demzufolge ebenfalls essentiell für die Stringente Kontrolle in *C. glutamicum* (Wehmeier *et al.*, 2001). Ein phänotypischer Vergleich des *C. glutamicum* Wildtyps mit der *rel*-Deletionsmutante zeigte eine Bedürftigkeit für die Aminosäuren Histidin und Serin, sowie eine relaxierte *rrn*-Expression unter Aminosäuremangelbedingungen (Tauch *et al.*, 2001). Dies deutet auf einen Einfluss der stringenten Kontrolle auf die Aminosäurebiosynthese und die Effektorfunktion des (p)ppGpp's in der stringenten Kontrolle hin.

2 Ziele der Arbeit

Die Stringente Kontrolle ist der erste und wichtigste Regulationsmechanismus bei auftretenden Stress- oder Mangelsituationen. Nach der Identifikation und Charakterisierung des *rel*-Gens als das in *C. glutamicum* für die Stringenten Kontrolle verantwortliche Gen, war es das Ziel dieser Arbeit, stringent kontrollierte Gene auf globaler Ebene mit Methoden der Transcriptomics zu identifizieren und zu charakterisieren. Dazu sollte die Stringente Kontrolle künstlich durch Zugabe des Aminosäureanaloges D,L-Serinhydroxamat ausgelöst werden. Die Messungen sollten sowohl im Wildtyp (*rel*⁺) als auch in einer Drei-Mutante (*rel*⁻) durchgeführt und die erhaltenen Datensätze mit den bereits bekannten Daten aus anderen Organismen verglichen werden.

III Material und Methoden

1 Bakterienstämme

Stämme	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	ATCC
RES 167	Restriktionsdefekte Mutante von ATCC 13032, <i>ΔcglIR cglIRI</i>	Uni Bielefeld
RES 167 <i>Δrel</i>	<i>Δrel</i> (400bp-Sall)	Wehmeier <i>et al.</i> , 1998

2 Enzyme, Chemikalien und anderes Material

2.1 Enzyme und Marker

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
DNA-Marker 100bp-Leiter	MBBL
DNA-Marker 100bp-Leiter, erweitert bis 5000bp	MBBL
DNA-Marker 250bp-Leiter	MBBL
DNase (RNase frei)	QIAGEN
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen
Red- <i>Taq</i> -Polymerase	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, Boehringer, MBI Fermentas, Pharmacia Stratagene
RNase	Roche
RNase-Inhibitor	Roche
Superscript II RNase H Reverse Transkriptase	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	QIAGEN, Sigma

2.2 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck oder Sigma bezogen oder entstammen einem der verwendeten Kits.

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Agar	GIBCO BRL
Agarose	GIBCO BRL
Aminoallyl-dUTP (aadUTP)	Sigma
Aminomodifizierte Random Hexamere	QIAGEN
Antibiotika	Serva, Sigma
Biotin	Sigma
Brain-Heart Infusion	Merck
Bromphenolblau (BPB)	Serva
DEPC	Sigma
Dig Easy Hyb	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Serva
dNTPs	MBI Fermentas
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Amersham Pharmacia Biotech
FluoroLink Cy3 monfunctional dye 5-pack	Amersham Pharmacia Biotech
FluoroLink Cy5 monfunctional dye 5-pack	Amersham Pharmacia Biotech
Hydroxylamin	Invitrogen
Luria Bertani Broth Bas/Agar (LB)	GIBCO BRL
β-Mercaptoethanol	Roth
MOPS	Gibco BRL
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Serva
PCR-Puffer für <i>Taq</i> -, <i>Red-Taq</i> -, Polymerase	MBI Fermentas
PCR-Puffer für <i>pfx</i> -Polymerase	Invitrogen
Phenol	Roth
Protocatechusäure	Sigma

Thiamin	Sigma
Tris-HCl	Serva

2.3 Kits

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
RNeasy Kit	QIAGEN
QuantiTect SYBR Green Kit	QIAGEN
RNeasy-Free DNase Set	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN

2.4 Materialien

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Eppendorfreaktionsgefäße (Eppis)	Greiner
Filterspitzen	Biozym
Glaswaren	Schott
Küvetten	Brand
LightCycler® Capillaries	Roche
Mikrotiterplatten	Greiner
Nitrilhandschuhe	Ansell
Parafilm	American
PCR-Stripes	Biozym
PE-Röhrchen	Greiner
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner
Ribotubes	Q-Biogene
Sterilfilter	Schleicher & Schuell

Spritzen	Braun
UV-Küvetten	Eppendorf
Vinyhandschuhe	Roth

2.5 Geräte und Apparaturen

<u>Produkt</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Automated Slide processor	Amersham
Brutschränke	Memmert
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau
Feinwaagen	Satorius
Hybridisierungskammer	ArrayIT™
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann
Kühltischzentrifuge 5417R	Eppendorf
LightCycler	Roche
Luftschüttler	New Brunswick, Gerhardt
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph, IKA
Mikrowelle privileg 1026	Quelle
Multifuge 3 L-R	Heraeus
pH-Meter	Knick
Photometer	Greiner, Eppendorf
Pipettman	Gilson
Ribolyser	Hybaid
ScanArray 4000	Gsi Lumonics
Shaker Swip	Edmund Bühler
Spannungsgeber	BIORAD
Speed-Vac SPD 111V	Savant
PCR-Thermal-Cycler PTC-100	MJ Research
Typhoon-Scanner 8600	Amersham Pharmacia Biotech
UV-Transilluminator	UVP
Videoprinter P67E	Mitsubishi
Vortex-Genie 1 und 2	Scientific Industries

Wasserbäder
Zentrifugen

GFL
Eppendorf, Heraeus, Hermle

2.6 Software

<u>Programm</u>	<u>Referenz</u>
EMMA	Dondrup <i>et al.</i> , 2003
GenDB (Version 1.5)	Meyer <i>et al.</i> , 2003
ImaGene & GeneSight	Bio Discovery
LightCycler Software 3.5	Roche
Scan & Quant Array	GSi Lumonics

3 Medien und Zusätze

3.1 Nährmedien

- **LBG-Vollmedium** (Luria-Bertani, Sambrook *et al.*, 1989)

- Trypton 1% (w/v)
- Hefe-Extrakt 0,5% (w/v)
- NaCl 0,5% (w/v)
- Glucose Monohydrat 0,1-0,5% (w/v)
 - pH-Wert auf 7,2 einstellen

- **PA-Vollmedium (Penassay Broth)**

- Antibiotic Medium No. 3 1,75% (w/v)

3.2 Zusätze zu den Nährmedien

- Agar

- 1,5% (w/v) für Festmedium

- Antibiotika

- Antibiotika werden als sterile Stammlösungen angesetzt (Sterilfiltration) und den Medien nach dem Autoklavieren in folgenden Endkonzentrationen pro Liter Medium zugesetzt:

- Vitamine

- Vitamin-Stammlösungen werden in deion.H₂O angesetzt und steril filtriert
 - Biotin 50 µg/ml
 - Thiamin 500 µg/ml

4 Puffer und Lösungen

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

4.1 DNA-Isolierung und Reinigung

- HB1

- Glucose 50 mM
- TrisHCl 25 mM
- EDTA 10 mM
 - pH 8,0
 - jeweils frisch 10 µl RNase-Lösung* (10mg/ml) auf 1 ml HB1 geben
Herstellung: 10 mg RNase in 1 ml 30 min kochen; Lagerung bei 4°C

- HB2

- NaOH 0,4 N
 - SDS 2% (w/v)
 - Glycerin 87% (w/v)
- jeweils im gleichen Verhältnis frisch zusammengeben

- Phenol-Chloroform-Mix

- 1:1 Mischung Phenol / Chloroform

- SDS-Lösung

- 20% (w/v) in H₂O

4.2 DNA-Amplifizierung mittels PCR

- dNTP-Mix (Stammlösung)

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

4.3 Elektrophorese

- Agarose

- 0,8% - 4% in TA-Elektrophoresepuffer
- aufkochen

- Bromphenolblau-Xylencyanol-Ladungspuffer (BPB-XC)

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

- Xylencyanol FF 0,1% (w/v)
 - mit HCl bis zum Umschlagpunkt (dunkelgrün) titrieren

- Ethidiumbromid Färbelösung

- 10mg/ml EtBr in deion. H₂O

- TA-Elektrophoresepuffer (50-fach)

- Tris 2 M
- Na-Acetat 500 mM
- EDTA 50 mM
- mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen

4.4 RNA-Isolierung

- DEPC-Wasser

DEPC 0,10%
3x autoklavieren

- 10fach MOPS

MOPS 200 mM
Na-Acetat 50 mM
EDTA 10 mM
mit deionisiertem Wasser auf 500ml auffüllen, pH 7

- MOPS-Elektrophoresepuffer

MOPS 1 fach
Formaldehyd, gefiltert 6% (v/v)
auf 1,5 Liter mit DEPC-Wasser auffüllen

- RNA-Ladepuffer

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

- RNA-Probenpuffer

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

4.5 cDNA-Synthese und Markierung

- Aminomodifizierte *random*-Hexanukleotide

AmC6 NNNNNN	5 µg/µl
-------------	---------

- Lösung aus 1 µg aa-dUTP (pH 7)

1 N NaOH	0,68 µl
H ₂ O (RNase frei)	17 µl

Erst das NaOH und H₂O mischen, pH-Wert kontrollieren und gegebenenfalls einstellen.

- 50fach dNTP-Stammlösung

aa-dUTP	200 mM
dTTP	50 mM
dATP	250 mM
dGTP	250 mM
dCTP	250 mM

- Herstellung der Fluoreszenzfarbstoff-Aliquots

- Fluoreszenzfarbstoff in 20 µl DMSO lösen
- 2µl Aliquots in braune Eppis füllen
- 1 h in der SpeedVac trocknen

- Natriumbicarbonat

Natriumbicarbonat in H₂O 1 M

- Hydroxylamin

Hydroxylamin in H₂O 4 M

4.6 Lösungen und Puffer zur Array-Hybridisierung

- 20x SSC-Puffer

- NaCl 3,0 M
- Natrium-Citrat 0,3 M

- Waschlösung I

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

- Waschlösung II

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

- Waschlösung III

- SSC 0,1 fach

5 Kultivierung von Bakterien

5.1 Anzucht von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien auf Festmedien erfolgt durch das Ausstreichen von Einzelkolonien und anschließender Inkubation im Brutschrank. Dabei liegt die Inkubationstemperatur und Dauer bei *E. coli* bei 37°C ü/N und von *C. glutamicum* bei 30°C für 2 bis 4 Tage.

Zum Anlegen von Stammpplatten auf Festmedien wird auf der einen Hälfte einer Agarplatte mit einer sterilen Glaspipette eine Einzelkolonie ausgestrichen. Mit einer neuen, sterilen Glaspipette wird senkrecht zum ersten Strich und senkrecht dazu ein zweiter bzw. dritter Strich gezogen. Auf diese Weise werden die Zellen soweit verdünnt, dass man nach entsprechender Inkubation Einzelkolonien erhält.

Die Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien erfolgt durch das Animpfen mit einer Einzelkolonie vom Festmedium. Kulturen von 5 – 10 ml werden im Reagenzglas im Roller, größere Volumina in Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei 150 – 3000 rpm angezogen. *E. coli* wird ü/N bei 37°C bis zur Stationärphase inkubiert. Für *C. glutamicum* wird ü/N eine Vorkultur angezogen, die 1:100 in frischem Medium als Hauptkultur 1 – 2 Tage bei 30°C zur stationären Phase anwächst.

5.2 Lagerung von Bakterien

Festmediumplatten mit Bakterienkulturen können einige Wochen bei 4°C gelagert werden, wobei sie mit Parafilm vor dem Austrocknen geschützt werden sollten. Durch regelmäßiges Überimpfen auf entsprechende Selektionsplatten kann die Aufbewahrungsdauer verlängert werden.

Eine dauerhafte Lagerung der Bakterien erfolgt in einer Glycerinkultur. Dazu werden 1,5 ml einer frischen Stationärkultur pelletiert, in einem Eppendorfgefäß in 200 µl LBG resuspendiert und mit 500 µl sterilem 87%-igem Glycerin vermischt. Die Kulturen werden dann bei –20°C gelagert.

5.3 Bestimmung des Bakterientiters

Das Wachstum von Bakterien in einer Flüssigkultur wird durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm in einem Spektralfotometer bestimmt. Als Referenz dient dabei steriles Nährmedium. Dabei entspricht eine o.D.₅₈₀ von 1 bei *C. glutamicum* ungefähr einem Titer von $1 \cdot 10^8$ Zellen pro ml und bei *E. coli* von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml.

Um den exakten Lebendtiters zu bestimmen muss eine Verdünnungsreihe angelegt, ausplattiert und inkubiert werden. Aus der Kolonienzahl wird dann der Lebendtiters berechnet.

6 RNA-Arbeiten

6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Corynebacterium glutamicum*

Zunächst werden die Bakterienzellen der Kultur mittels eines „killing“-Puffers abgetötet um eine Verschiebung des RNA-Profiles zu verhindern. Danach wird die Kultur in einem Ethanol-Eisbad schockgefroren um die RNA zu stabilisieren. Das Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* beruht auf einem mechanischen Aufschluss der Bakterienzellen in einer Schüttelmühle in Anwesenheit eines RNase-inhibierenden Puffers. Die Aufreinigung der RNA erfolgt nach der Bindung an eine Silica-Membran und Auswaschen der Proteine. Nach der Isolierung der RNA erfolgt ein DNase-Verdau, um restliche Spuren von Gesamt-DNA zu entfernen. Nach dem Verdau wird die so gewonnene RNA erneut über Silica-Säulen aufgereinigt. Die Quantifizierung erfolgt in einem UV-Photometer bei 260 nm Wellenlänge.

Die Isolierung und Aufreinigung erfolgt mit dem Qiagen „RNeasy Mini Kit“ nach einem modifizierten Protokoll:

- mischen der Kultur im Verhältnis 1:1 mit „killing“-Puffer
- Inkubation für 10 min auf Eis, entweder sofortiges weiterverarbeiten oder

- einfrieren der Kultur in einem Ethanol-Eisbad
- Lagerung bei -80°C oder
- suspendieren von 1×10^9 Zellen in 700 μl RLT-Puffer
- überführen in ein Ribotube
- Aufschluss zweimal bei 6,5 m/s für 30 sec im Ribolyser
- abkühlen der Probe auf Eis zwischen den Aufschlüssen
- abzentrifugieren bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C
- mischen des Überstandes mit 250 μl Ethanol
- Probe auf eine RNeasy-Säule geben
- 30 sec bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 350 μl RW1-Puffer
- 30 sec bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Zugabe 80 μl DNase
- Inkubation für 30 min bei 25°C
- Zugabe von 350 μl RW1-Puffer
- 30 sec bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Säule auf ein neues Auffanggefäß setzen
- Zugabe von 500 μl RPE-Puffer
- 30 sec bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 500 μl RPE-Puffer
- 30 sec bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 2 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß setzen
- Zugabe von 50 μl H_2O (RNase-frei)
- Inkubation für 3 min bei 25°C
- Elution bei 13.000 rpm für 60 sec
- Elutionsschritt wiederholen

6.2 DNase-Verdau von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*

Um eventuell vorhandene Spuren von genomischer DNA zu entfernen wird ein erneuter DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wird eine Desoxyribonuklease I zugesetzt. In Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen wird einzel- bzw. doppelsträngige DNA zu Oligodesoxy-Ribonukleotiden mit einem 5'-Phosphatrest abgebaut.

- Zugabe von 1/10 Volumen DNase-Puffer
- Zugabe von 10 Units DNase I (amplifikation Grade)
- Inkubation für 30 min bei 25°C
- Aufreinigung der RNA (siehe 1.4)

6.3 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*

Nach dem DNase-Verdau ist eine erneute Aufreinigung der RNA nötig, um die eingesetzte DNase I wieder zu entfernen.

Die Aufreinigung erfolgt mit dem RNeasy Minit Kit der Firma Qiagen nach dem entsprechenden Protokoll.

6.4 Auftrennung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* mittels Gelelektrophorese

- Proben im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzen
- für 10 min bei 68°C denaturieren
- Proben 10 min auf Eis abkühlen
- Ladepuffer im Verhältnis 1:10 zugeben und mischen
- kurz anzentrifugieren

- Proben auftragen
- bei 50 mA die Proben zu $\frac{3}{4}$ in das Gel einwandern lassen

6.5 PCR-Kontrolle auf DNA

Im Anschluss an die RNA-Isolierung wird eine Kontroll-PCR durchgeführt um die erhaltenen Proben auf DNA-Rückstände zu untersuchen. Es sollte dabei kein Produkt erhalten werden. Ist nach anschliessender Auftrennung im Agarose-Gel ein PCR-Produkt sichtbar, so wird ein erneuter DNase-Verdau und eine weitere Aufreinigung durchgeführt. Ist die RNA frei von DNA so kann sie bei -80°C gelagert werden.

6.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Im Anschluss an die RNA-Isolierung werden die Qualität und Konzentration im Photometer bestimmt. Die Konzentration wird durch eine Absorbtionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (A_{260}) bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von RNA ist 44,19. Die Konzentration errechnet sich daher wie folgt:

$$\text{RNA}_{[\text{mg/ml}]} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 44,19$$

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wird die Absorbtion der Probe bei A_{260} und A_{280} gemessen und der Quotient aus beiden Werten gebildet. Ein Quotient von 1,8 weist auf reine RNA hin. Die Pufferbedingungen bei der Messung beeinflussen allerdings den Quotienten. In allen Experimenten wurden die Messungen in Wasser durchgeführt.

6.7 Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA

(de Risi *et al.*, 1996)

Zur Herstellung einer fluoreszenzmarkierten Sonde wird zunächst einmal die RNA mittels Random-Primern und einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung von Aminoallyl-dUTPs im Reaktionsansatz enthält die cDNA Kopplungsstellen für das spätere Koppeln der Fluoreszenzfarbstoffe an die cDNA. Die erhaltene, fluoreszenzgefärbte cDNA wird aufgereinigt und aufkonzentriert und ist zum Einsatz in der Hybridisierung bereit.

- RT-Reaktion

- 16 µl Probe mit bis zu 10 µl RNA
- 2 µl aminemodifizierte Hexanukleotide (5µg/µl)
- 10 min bei 70°C denaturieren
- 5 min abkühlen lassen (Annealing der Primer)
- Mastermix ansetzen:
 - 1x Ansatz
 - 6,0 µl 10X First Strand Buffer
 - 0,6 µl 50X dNTP Stock Solution
 - 3,0 µl 0,1 M DTT
 - 0,5 µl RNase-Inhibitor
- 10 µl Mastermix zum Ansatz geben und 5 min bei RT inkubieren
- 1,5 µl Superscript II (200 U/µl) zugeben
- 90 min bei 42°C inkubieren
- 1 µl Superscript II (200 U/µl) zugeben
- 90 min bei 42°C inkubieren

- Hydrolyse der RNA und Aufreinigen der cDNA

- 10 µl 50 mM EDTA zugeben
- 10 µl 1M NaOH zugeben
- 10 min bei 70°C die RNA hydrolysieren
- kurz anzentrifugieren
- 10 µl 1M HCl zugeben
- Proben in 350 µl ERC- oder PB-Puffer aufnehmen
- 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren
- Durchlauf erneut auf die Säule pipetieren
- 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen
- 700 µl 70%-igen Ethanol auf die Säule geben
- 1 min bei max. Drehzahl zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen
- 1 min bei max. Drehzahl trocken zentrifugieren
- 2x mit 11 µl Millipore-H₂O eluieren, dabei das Wasser jeweils 1 min auf der Säule einwirken lassen und dann bei max. Drehzahl eluieren
- photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration:
 - Eppendorf-Photometer auf ssDNA einstellen
 - 80 µl Millipore-H₂O (pH 8,0) und 2 µl Probe messen
 - Probe kann bei -20°C gelagert werden

- Kopplung der Fluorophore

- Herstellung eines Aliquots der Fluorophore (Amersham)
 - Lösen des Farbstoffes in 20 µl DMSO, jeweils 2 µl in ein dunkles Eppendorfgefäß aliquotieren und in der SpeedVac trocknen
- zu je 10 µl Probe werden 2 µl 1 M Natriumbicarbonat (pH 9,0) zugeben
- ein Aliquot Cy3 oder Cy5 wird in jeder Probe gelöst
- gut mischen und kurz anzentrifugieren
- 60 min bei RT im dunklen inkubieren

- Quenching der ungebundenen Fluorophore

- 4,5 µl 4M Hydroxylamin zu jeder Probe geben
- gut mischen und anzentrifugieren
- 15 min bei RT inkubieren
- 5 µl 1 N NaOH zugeben
- 70 µl Millipore-H₂O zugeben

- Aufreinigung der markierten cDNA

(MinElute Reaction Cleanup Kit, Qiagen)

Die Aufreinigung wird entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

6.8 Kontroll-Gel

Zur Kontrolle der Markierungsreaktion werden Aliquots der Proben in einem Agarosegel aufgetrennt und mit dem Typhoon-Scanner eingescannt. Die Intensität der Sonden wird in zwei Scanvorgängen (einer je Farbkanal) aufgenommen. Beim Scannen der Cy5-Sonde wird auch ein Signal der Cy3-Sonde detektiert, so dass die Cy3-Sonde im Gelbild die dominanter ist. Anhand des erhaltenen Bildes ist eine Abschätzung möglich ob die Markierungsreaktion gut funktioniert hat. Die Sonden sollten in Höhe des BPBs bandieren.

- 1%-iges Agarosegel vorbereiten
- 1µl jeder Probe mit 5 µl 87%-igem Glycerin vermischen und auf das Agarosegel auftragen
- 5 µl Bromphenolblau als Marker mitlaufen lassen
- Gel anschliessend mit dem Typhoon-Scanner scannen

6.9 Hybridisierung gegen Mikroarrays

Hybridisierungen erlauben den Nachweis homologer Sequenzen. Im Falle einer Array-Hybridisierung liegen die Targetsequenzen kovalent an einen Slide gebunden vor. Jedes Target repräsentiert eine im Genom vorhergesagte CDS. Als Sonde dient eine fluoreszenzmarkierte cDNA, die aus der zu untersuchenden Gesamt-RNA hergestellt wurde.

6.10 Hybridisierung unter Deckgläschen

- die Sonden der zu vergleichenden Proben werden vereint und in der Speed-Vac getrocknet
- lösen der Proben in 70 µl DIG Easy Hyb
- Slide 45 min bei 42°C in DIG Easy Hyb vorhybridisieren
- Slide in deionisiertem Wasser waschen
- Slide in Ethanol waschen
- Slide 3 min bei 1.200 rpm trocken zentrifugieren
- Probe 5 min bei 65°C denaturieren
- 10 µl deionisiertes Wasser in die Vertiefungen der Hybridisierungskammer geben
- Probe anzentrifugieren und an den unteren Rand des silanisierten Deckgläschen geben
- das Deckgläschen mit der Flüssigkeit nach unten ohne Luftblasen über die bedruckte Fläche des Slides legen, die Probe bildet nun einen dünnen Film unter dem Deckglas
- 16 Stunden bei 42°C im Wasserbad inkubieren

6.11 Waschen der Slides

- Deckglas in Waschlösung I (42°C) vom Slide lösen
- 5 min in Waschlösung I bei 42°C auf dem Horizontalschüttler waschen
- 2x 3 min in Waschlösung II bei RT auf dem Horizontalschüttler waschen
- 3 min in Waschlösung III bei RT auf dem Horizontalschüttler waschen
- 3 min bei 1.200 rpm trocken zentrifugieren
- scannen der Slides

6.12 Auswertung der hybridisierten Slides

Das Scannen der hybridisierten Slides erfolgt mit dem ScanArray 4000 unter Verwendung des Programmes „Scan Array“. Die vom Programm erzeugten TIFF-Images werden mit dem Programm „Imagene“ nach der Programmbeschreibung quantifiziert. Als Schwellenwert für die Erkennung eines Spots muss dieser mindestens eine Signalintensität haben, die zweifach über dem Hintergrund liegt. Die weitere Analyse, insbesondere der relativen Expressionsstärken, erfolgt mit dem Programmpaket „EMMA“.

6.13 Quantitative Real-Time PCR mit dem LightCycler

Bei der Methode der *real-time* RT-(Reverse Transkriptase)-PCR wird die als Template dienende RNA im ersten Schritt durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden PCR-Reaktion mit einer Taq-Polymerase wird die cDNA amplifiziert. Durch die Verwendung spezifischer Primer wird nur die mRNA des zu untersuchenden Gens umgeschrieben und anschließend vervielfältigt. Die entstehende doppelsträngige DNA interkaliert mit einem Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall SYBR-Green. Wird der Farbstoff mit Licht einer Wellenlänge von 500 nm angeregt, so fluoreszieren nur diejenigen Moleküle, die mit der DNA interagieren. Dabei ist die Fluoreszenz der Menge des Amplifikates proportional. In Abhängigkeit

von der in der Probe vorliegenden mRNA des zu untersuchenden Gens, nimmt die durch die Bildung des PCR-Amplifikates hervorgerufene Fluoreszenz schon in einem frühen Zyklus (viel Template in der Probe) oder in einem späteren Zyklus zu (wenig Template in der Probe).

Die real-time RT-PCR wird mit dem LightCycler® der Firma Roche und dem „QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit“ der Firma QIAGEN durchgeführt. Als Ergebnis werden die sogenannten *crossing-points* erhalten, die den Beginn der log-Phase der Amplifikation angeben und aus dem Maximum der zweiten Ableitung der Messkurve errechnet werden.

Erstellung eines Mastermixes für je eine Reaktion (auf Eis):

- 10 µl QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master-Mix
- 6,8 µl RNase freies Wasser
- je 1 µl Primer (50mM)
- 0,2 µl QuantiTect RT-Mix
- Insertion von 1 µl RNA-Lösung (250ng) in die vorgekühlte Kapillare
- Zugabe von 19 µl des Mastermixes
- 30 sec bei 3.000 rpm zentrifugieren
- Insertion der Kapillaren in den LightCycler
- Start des Programmes

6.14 Auswertung der Expressionsanalyse

Um die Qualität der Messung zu prüfen führt der LightCycler eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse durch. Dabei wird das erhaltene PCR-Produkt im Anschluss an die eigentliche Messung durch kontinuierliche Steigerung der Temperatur aufgeschmolzen. Durch das Aufschmelzen der DNA sinkt die Fluoreszenz. Im optimalen Fall ergibt sich dadurch eine gleichmässige Gauß-Kurve der Fluoreszenz. Wird keine gleichmässige Verteilung erreicht, so ist die Messung zu wiederholen, gegebenenfalls auch unter Verwendung neuer Primer.

Die Messdaten, die sogenannten *crossing-points*, müssen nun in vergleichbare Einheiten umgewandelt werden. Dabei werden für jedes Gen relative Expressionsfaktoren erhalten. Bei der Berechnung werden die *crossing-points* für die zu untersuchen-

de Probe mit den Werten einer Bezugsgrösse (Kontrolle) verrechnet. Bei der Berechnung wird die Differenz zwischen der Probe und der Bezugsgrösse gebildet. Die relative Expression wird als Exponent der Differenz der *crossing-points* zur Basis zwei errechnet:

$$\text{relative mRNA-Menge} = 2^{(x(\text{crossing-point Kontrolle}) - y(\text{crossing-point Probe}))}$$

Bei den resultierenden Werten handelt es sich um einen relative Wert, der nur bei der verwendeten Primarkombination zwischen unterschiedlichen RNA-Isolierungen verglichen werden kann (Pfaffl, 2001).

7 DNA-Analysen

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

Durch eine kombinierte Behandlung mit Lysozym und einem Detergenz werden die Zellen sphäroblastiert und dann lysiert. Mittels einer Pronase E-Einwirkung und Phenolisierung werden die Proteine extrahiert und die DNA wird anschließend durch eine Ethanolfällung aufgereinigt.

- 25 ml LBG-Medium mit einer Einzelkolonie animpfen und ü/N bei 30°C im Roller selektiv abziehen
- 10 ml Kultur in 10 ml PE-Röhrchen überführen
- 5 min bei 3.000 rpm in der Tischzentrifuge pelettieren
- Pellet in 10 ml TES resuspendieren
- 5 min bei 3.000 rpm in der Tischzentrifuge pelettieren
- Pellet in 3 ml HB1 mit 20 mg/ml Lysozym resuspendieren
- 2 h bei 37°C im Roller inkubieren
- 200µl 20%-iges SDS zugeben und vorsichtig invertieren bis die Lösung aufklart
- 5 min auf Eis
- Spatelspitze Pronase E zugeben
- 1 – 2 h bei 37°C im Roller inkubieren

- 3 ml Phenol/Chloroform zugeben und vorsichtig invertieren
- 10 min bei 8.000 rpm bei 4°C abzentrifugieren
- Überstand vorsichtig mit abgeschnittener, blauer Spitze abnehmen und in ein neues PE-Röhrchen überführen
- Phenolisierung noch einmal mit 2 ml Phenol/Chloroform wiederholen
- Überstand mit 98%-igen Ethanol (-20°C) auf 12 ml auffüllen
- invertieren bis DNA ausfällt
- 15 min bei 10.000 rpm bei 4°C abzentrifugieren
- Pellet in 5 ml 70%-igen Ethanol waschen
- 15 min bei 10.000 rpm bei 4°C abzentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen und verwerfen
- Pellet bei 60°C trocknen und in 100 – 300 ml H₂O-bidest oder TE-Puffer lösen
- DNA bei 4°C lagern

7.2 Agarose-Gelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente. Dabei wandert die DNA als negativ geladenes Molekül im elektrischen Feld zur positiven Kathode der Elektrophorese-Einheit. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei anhängig von der Molekülgröße, der DNA-Konformation, der Agarosekonzentration und der angelegten Spannung. Die DNA wird nach Abschluss der Elektrophorese mit Ehtidumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

- 0,4 – 4% Agarose in TA-Elektrophoresepuffer aufkochen (die Konzentration richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente)
- Agarose in Gelkammer füllen und geeigneten Kamm einsetzen
- Gel nach dem Auspolymerisieren mit TA-Gelelektrophoresepuffer überschichten und den Kamm entfernen
- DNA-Probe mit ca. 3 µl BPB-Mix versetzen und in die Geltasche füllen
- Gel bei 50 – 120 V laufen lassen

- Gel ca. 3 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) färben
- Gel ca. 3 min in H₂O entfärben
- anschließend unter UV-Licht fotografieren

7.3 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Laufstrecke eines linearen DNA-Fragmentes ist umgekehrt proportional zum natürlichen Logarithmus seines Molekulargewichtes. Durch den Laufstreckenvergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Größe (z.B. „DNA Molecular Weight Marker X“ von Böhlinger oder „100 Bp DNA-Leiter“ von MBBL) kann die Größe unbekannter DNA-Fragmente bestimmt werden.

7.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase Kettenreaktion

(Mullis *et al.*, 1986)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifikation von DNA-Abschnitten. Es wird sich dabei der Primer-Extension-Technik bedient, wobei die zwei eingesetzten Primer komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen der DNA-Region sind. Wird die DNA durch Hitze denaturiert, so können bei anschließendem Abkühlen die Primer sich bei ihrer spezifischen Annealigentemperatur an die DNA-Matrize anlagern. Die Primer wurden so gewählt, dass die Neusynthese der Stränge in Richtung des jeweils anderen Primers erfolgt. Durch eine mehrfache Wiederholung des Aufschmelzens der DNA und der Neusynthese kommt es zu einer vieltausenfachen Vermehrung des DNA-Abschnittes. Voraussetzung für eine PCR ist eine hitzestabile Polymerase. In den meisten Fällen wird eine Polymerase aus *T. aquaticus* (*Taq*) eingesetzt. Für einige Anwendungen (z.B. die Konstruktion von Expressionvektoren) ist es jedoch auch nötig ein fehlerfreies Produkt zu erhalten. Hierfür werden sogenannte Proof-Reading-Polymerasen (*Pfu* oder *Pwo*) verwendet.

- Mastermix ansetzen (für 50 µl eines *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase-Ansatzes):
 - 5 µl *Taq*-Puffer
 - 1 U *Taq*
 - 1 µl dNTPs (je 10 uM)
 - 1 µl Primer 1 (10 uM)
 - 1 µl Primer 2 (10 uM)
 - 40 µl H₂O
- Mastermix und 1 µl Template in einem 0,2 ml PCR-Tube vereinen
- PCR starten
 - 2 min 94°C
 - 90 sec 94°C
 - 90 sec 50 – 65°C (Primerangaben beachten)
 - je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (ca. 25 Nukleotide / Sekunde)
 - 25 bis 55-fache Wiederholung von Schritt 4
 - 3 min 72°C
 - 8 8°C
- Mastermix ansetzen (für 50 µl eines *Pwo*-Polymerase-Ansatzes):
 - 5 µl *Pwo*-Puffer
 - 1 µl dNTPs (je mM)
 - 1 µl Primer 1 (10 µM)
 - 1 µl Primer 2 (10 µM)
 - 1 U *Pwo*-Polymerase
 - 40 µl H₂O-bidest
- Mastermix und 1 µl Template in einem 0,2 ml PCR-Tube vereinen
- PCR starten
 - 2 min 94°C
 - 15 sec 94°C
 - 20 sec 50 – 65°C (Primerangaben beachten)
 - 1 min 72°C
 - Schritte 2 – 4 9mal wiederholen
 - 15 sec 94°C
 - 20 sec 50 – 65°C (Primerangaben beachten)
 - 1 min 72°C

- Schritte 6 – 8 14x wiederholen (+20 sec / Zyklus bei Schritt 8)
- 10 min 72°C
- 8 8°C

IV Ergebnisse

1 Analyse des *C. glutamicum*-Genoms auf Komponenten der Stringenten Kontrolle

Das vollständig sequenzierte *C. glutamicum* ATCC 13032-Genom (Kalinowski *et al.*, 2003) wurde zunächst durch Homologievergleiche auf die fehlenden Komponenten der stringenten Kontrolle untersucht. Bisher bekannt waren das Gen für die (p)ppGpp Synthetase/(p)ppGpp-3'-Pyrophosphohydrolase (*rel*; Wehmeier *et al.*, 1998) sowie das für das ribosomale Protein L11 (*rplK*; Wehmeier *et al.*, 2001). Vom (p)ppGpp-Metabolismus von *E. coli* ausgehend, fehlten noch das *gpp*- und das *ndk*-Gen um den Kreislauf zu schliessen (s. II.1.6).

Durch Homologievergleiche mit bekannten Sequenzen wurde das *ndk*-Gen, das für die Nukleosid-5'-Diphosphokinase kodiert, gefunden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *ndk* zeigt eine hohe Homologie zu bekannten Sequenzen aus anderen Organismen, z.B. 57% Identität zu der abgeleiteten Sequenz von *ndk* aus *Bacillus subtilis*. Das für *C. glutamicum* vorhergesagte Gen hat eine Länge von 411 Basen und für ein Protein von 137 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 14,8 kDa.

Ein Sequenzvergleich mit der Aminosäuresequenz des *E. coli* *gpp*-Gens ergab zwei potentielle Kandidaten, die als *ppx1* und *ppx2* annotiert sind. Die Aminosäuresequenz-Homologien liegen bei 44% für das *ppx1*-Gen und 46% für das *ppx2*-Gen. Das *ppx1*-Gen ist 930 Basenpaare lang und kodiert für ein 33,0 kDa Protein von 310 Aminosäuren. Es ist als Mitglied der Ppx/GppA-Familie eingeordnet. Das *ppx2*-Gen ist 966 Basenpaare lang. Das daraus abgeleitete Protein ist 322 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 34,7 kDa. Aufgrund der hohen Identität der beiden Proteine ist keine eindeutige Identifikation des *gpp*-Gens unter den beiden Kandidaten möglich. Die Lage im Genom aller an der stringenten Kontrolle beteiligten Gene ist in Abbildung IV.1 dargestellt.

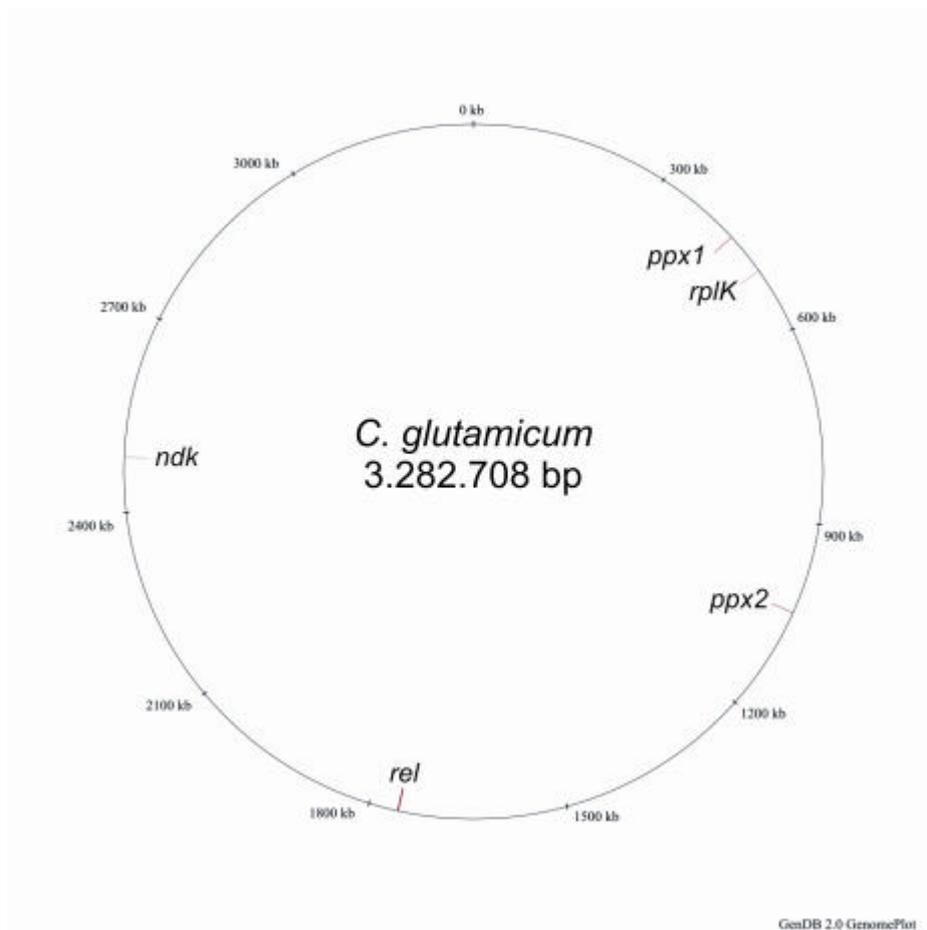


Abb. IV.1: Darstellung der genomischen Lage der an der stringenten Kontrolle in *C. glutamicum* ATCC 13032 beteiligten Gene:

2 Vergleich der Transkriptionsprofile eines *C. glutamicum* *rel*⁺- und eines *rel*-Stammes

Um die Effekte des Signalmoleküls (p)ppGpp auf globaler, transkriptionaler Ebene zu studieren, wurden ein *C. glutamicum rel*⁺-Stamm und ein *rel*-Stamm untersucht. Im *rel*-Stamm wurde das *rel*-Gen deletiert und daher ist er nicht mehr in der Lage (p)ppGpp zu synthetisieren. Bei dem *rel*⁺-Stamm handelt es sich um eine restriktionsdefekte Mutante des *C. glutamicum* ATCC 13032. Beide Stämme wurden zunächst in flüssigem LB-Medium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase bei o.D. 0,2 angezogen. Danach wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNAs isoliert. Die erhaltenen RNA-Proben wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

markiert (Cy3 und Cy5) und dann gegen Gesamtgenom-Mikroarrays hybridisiert. Die verwendeten Mikroarrays (Hüser *et al.*, 2003) enthielten insgesamt 2803 PCR-Produkte von 3002 *C. glutamicum*-Genen (93,4% Abdeckung). Die Proben des *C. glutamicum rel⁺*-Stammes dienten dabei als Referenz, gegen die die Proben des *C. glutamicum rel*-Stammes hybridisiert wurden. Bei der Sondenherstellung wurde ein Farbstoffwechsel durchgeführt, d.h. von jeder Probe wurde eine Cy3- und eine Cy5-markierte Sonde hergestellt. Nach der Hybridisierung wurden die Fluoreszenzsignale des Mikroarrays mittels eines Scanners ausgelesen. Die Leistungseinstellungen (Laserstärke und Photomultiplier) des Scanners wurden dabei so gewählt, dass die meisten Gene erfasst wurden und nicht in der Signalsättigung lagen.

Zur Datenanalyse wurden die Programme ImaGene (Bio Discovery) und EMMA (Dondrup *et al.*, 2003) herangezogen. Die Signifikanzkriterien für ein differentiell exprimiertes Gen waren dabei wie folgt: (1) entsprechend der zu diesen Mikroarrays publizierten Daten zur technischen Variation (Hüser *et al.*, 2003) musste das Verhältnis der erhaltenen Signale grösser als $2^{0,6}$ bzw. kleiner als $2^{-0,6}$ sein, (2) es mussten 2/3 der zu einem Gen gehörigen Spots erkannt worden sein und (3) der p-Wert bei der Durchführung des t-Tests musste kleiner als 0,05 sein, was einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% entspricht.

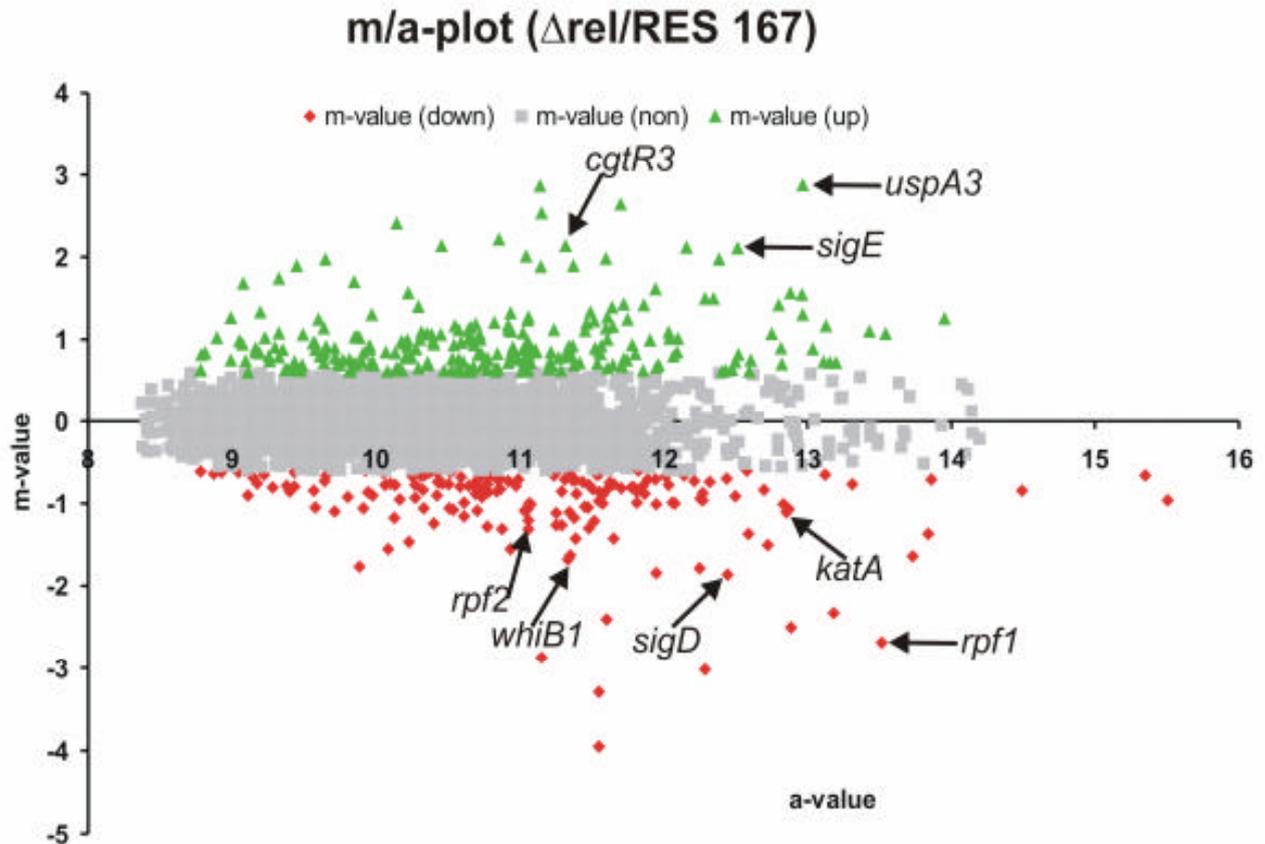


Abb. IV.2: Vergleich der Transkriptome der *C. glutamicum rel⁻*- und *rel*-Stämme in einem m/a-Plot. Gene mit verminderter Expression sind durch rote Rauten und Gene mit verstärkter Expression durch grüne Rauten dargestellt. Graue Rauten bedeuten eine nicht signifikant veränderte Expression. Ausgesuchte Gene sind mit Pfeilen markiert.

Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung IV.2 dargestellt. Insgesamt 357 Gene entsprachen den Kriterien für eine differentielle Expression in der *C. glutamicum rel⁻*-Mutante. Davon waren 217 Gene in dem (p)ppGpp-defizitären Stamm stärker und 140 schwächer exprimiert als im (p)ppGpp-produzierenden Referenzstamm. Die in ihrer Expression am stärksten veränderten Gene sind in Tabelle IV.1 aufgeführt. Eine vollständige Liste aller Gene mit veränderter Transkription findet sich im Anhang (Tabelle VII.1). Zu den Genen mit verstärkter Transkription gehört das *uspA* Gen, das für ein putatives universelles Stressprotein kodiert sowie das *sigE*-Gen, das für einen extracytoplasmic function (ECF)-Typ-Sigmafaktor kodiert. Unter den Genen mit verminderter Expression sind das *sigD*-Gen, das für einen weiteren ECF-Sigmafaktor kodiert, sowie die Gene *rpf1* und *rpf2* zu finden, deren Proteine an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind (Hartmann *et al.*, 2004).

CDS ^a	Ratio	Gen	Annotation
Im <i>C. glutamicum ref</i> -Stamm verstärkt exprimierte Gene			
cg3255	7,35	<i>uspA3</i>	Universal stress protein E
cg3211	7,30		Putative secreted protein
cg0998	6,22		Trypsin-like serine protease
cg1652	5,80	<i>pctA</i>	ABC-type alkylphosphonate transporter, substrate-binding lipoprotein (TC 3.A.1.9.1)
cg0078	5,31		Putative membrane protein
cg2127	4,65		Hypothetical protein
cg2444	4,40		Hypothetical protein
cg2888	4,40	<i>cgtR3</i>	Two-component system, transcriptional response regulator
cg2708	4,34	<i>msiK1</i>	ABC-type putative sugar transporter, ATPase subunit
cg1271	4,32	<i>sigE</i>	RNA polymerase sigma factor, ECF-family
Im <i>C. glutamicum ref</i> -Stamm vermindert exprimierte Gene			
cg2797	0,06		Conserved hypothetical protein
cg2796	0,10		Conserved hypothetical protein, MMGE/PRPD-family
cg0047	0,12		Conserved hypothetical protein
cg0936	0,15	<i>rpf1</i>	RPF-protein precursor
cg2402	0,18		Secreted protein NLP/P60 family
cg0696	0,27	<i>sigD</i>	RNA polymerase sigma factor, ECF-family
cg0812	0,28	<i>dtsR1</i>	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, β -chain
cg0980	0,29		Putative secreted protein, related to metalloendopeptidases
cg0878	0,31	<i>whiB1</i>	Putative transcriptional regulator, WhiB-family
cg1307	0,32		DNA/RNA helicase, superfamily II

Tabelle IV.1: Eine Auswahl der in dem *C. glutamicum ref*-Stamm im Vergleich zum *ref*^r-Stamm in ihrer Expression am stärksten veränderten Gene. a CDS nach Kalinowski *et al.*, 2003.

Aufgrund der umfangreichen Expressionsänderungen, die u. a. zwei Sigmafaktoren, vermutlich zusammen mit ihren jeweiligen Regulons, enthalten, war es schwierig, die direkten, (p)ppGpp-abhängigen Effekte von Sekundäreffekten zu unterscheiden. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine zweite Strategie verfolgt.

3 Vergleich der Transkriptionsprofile nach Auslösen der Stringenten Kontrolle mittels DL-Serinhydroxamat

Durch diese zweite Strategie sollten die *rel*-abhängige, stringente Antwort und die *rel*-unabhängigen, sekundären Effekte charakterisiert werden. Dazu wurde ein Aminosäuremangel künstlich durch Zugabe von DL-Serinhydroxamat (SHX) zum Kulturmedium erzeugt. Dieser Aminosäuremangel führt in *C. glutamicum-rel*⁺-Stämmen zur Produktion von (p)ppGpp (Wehmeier *et al.*, 1998). Die Strategie bestand aus zwei Schritten. Zunächst sollte nach SHX-Zugabe in Abhängigkeit von der Zeit die Transkriptionsänderung bekannter, stringent kontrollierter Gene verfolgt werden. Damit sollte der Zeitpunkt der maximalen Änderung in der Expressionsrate festgestellt werden. In einem zweiten Schritt sollten dann die Transkriptome der *C. glutamicum rel*⁺- und *rel*-Stämme vor und nach Zugabe von SHX miteinander verglichen werden.

3.1 Zeitaufgelöste Analyse der Expression der Histidin- und Serin-Biosynthesegene in *C. glutamicum* RES 167

Um den Zeitpunkt der maximalen Transkriptionsänderung zu ermitteln, wurde die stringente Kontrolle in einem *C. glutamicum rel*⁺-Stamm durch Zugabe von SHX ausgelöst. SHX ist ein Serin-Analog, das kompetitiv an die Seryl-tRNA Synthetase bindet und damit ein Beladen der Seryl-tRNAs verhindert (Blumenthal *et al.*, 1976). Dies führt dazu, dass leere Seryl-tRNAs an die Akzeptorstelle des Ribosoms binden und es kommt zum Auslösen der stringenten Kontrolle (s. II.1.7). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass es im *C. glutamicum* Wildtyp (*rel*⁺) nach Zugabe von SHX zur Bildung von (p)ppGpp kommt, wogegen eine *C. glutamicum Δrel*-Mutante (*rel*) nicht mehr in der Lage war, (p)ppGpp zu bilden (Wehmeier *et al.*,

1998). Weitere Studien hatten gezeigt, dass die *ref*-Mutante partiell auxotroph für die beiden Aminosäuren Histidin und Serin ist (Tauch *et al.*, 2001). Dies legt den Schluss nahe, dass die Gene beider Synthesewege unter stringenter Kontrolle sind. Daher wurden die bekannten Gene beider Biosynthesewege ausgewählt, um den Zeitverlauf der stringenten Kontrolle auf Transkriptionsebene zu verfolgen. Es wurde ein *C. glutamicum rel⁺*-Stamm in Flüssigkultur bis zu einer o.D. von 0,2 angezogen und die Kultur dann geteilt. Eines der Aliquots diente dabei als Kontrolle (t_0), das zweite wurde mit SHX (50mM Endkonzentration) versetzt. Es wurden alle fünf Minuten, bis zu einem maximalen Zeitpunkt von 25 Minuten (t_5 - t_{25}), Proben aus der Kultur entnommen und die Gesamt-RNA extrahiert. Anschliessend wurden die mRNA-Mengen der Histidin- und Serin-Biosynthesegene mittels einer *real-time* Reverse Transkriptase (RT)-PCR gemessen. Jeder Messwert nach der SHX-Zugabe (t_5 - t_{25}) wurde in Rela-

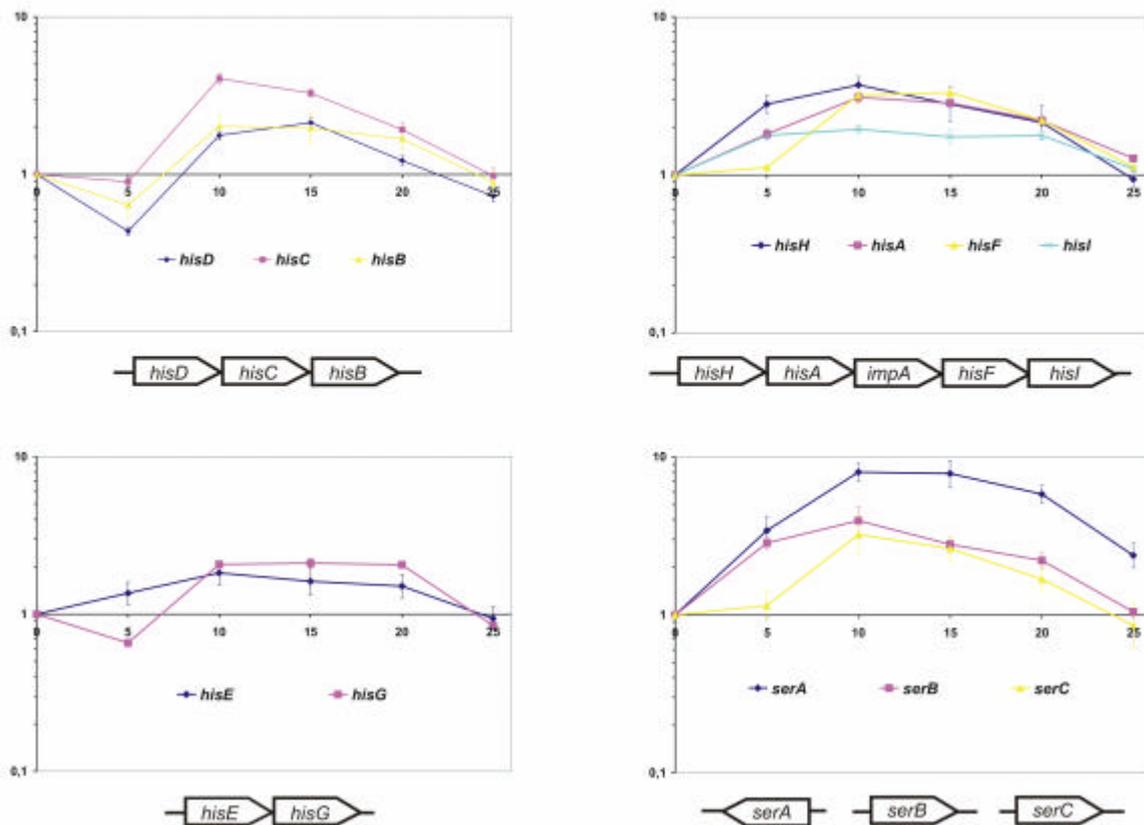


Abb. IV.3: Zeitaufgelöster Verlauf der Expression der Histidin- und Serinbiosynthesegene nach der Zugabe von SHX zum Medium. Die Proben wurden in Fünf-Minuten-Intervallen bis zu einem maximalen Zeitpunkt von 25 Minuten entnommen (t_5 bis t_{25}). Der relative Gehalt an mRNA wurde durch *real-time* RT-PCRs mit dem LightCycler® Instrument bestimmt. Die Ratios sind der Quotient aus t_{5-25} (nach SHX-Zugabe) und t_0 (unbehandelt). Unter den Diagrammen ist die Organisation der entsprechenden Gene im *C. glutamicum* Chromosom dargestellt.

tion zum Messwert vor der SHX-Zugabe (t_0) gesetzt. Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Transkriptmenge der untersuchten Gene bereits fünf Minuten nach Zugabe des SHX (Abbildung IV.3). Die maximale Induktion war bereits nach zehn Minuten (t_{10}) zu messen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Histidin-Biosynthesegene zwei- bis dreifach und die Serin-Biosynthesegene drei- bis achtfach verstärkt exprimiert. Im weiteren Verlauf sanken die Expressionsraten und erreichten die ursprünglichen Werte nach ca. 25 Minuten (t_{25}). Die stärkste Induktion der Transkription war für das *serA* Gen, das für die D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase kodiert, zu messen. Von den Histidin-Biosynthesegenen wies das *hisC*-Gen, das für die Histidinolphosphat-Transaminase kodiert, die stärkste Veränderung in der Transkription auf.

3.2 Validierung der *rel*-abhängigen Transkription von ausgewählten Genen

Um zu prüfen, ob die in 2.1 erhaltenen Ergebnisse auf der Neusynthese von (p)ppGpp und nicht auf einem unbekanntem Effekt von SHX beruhen, wurden die Messungen für eine Auswahl von Genen mit der *C. glutamicum rel*-Mutante wiederholt. Es handelte sich hier um die Histidin-Biosynthesegene *hisB* und *hisC*, sowie um zwei weitere, die erst im Rahmen der im folgenden geschilderten Mikroarray-Experimente (s. 3.3) identifiziert wurden: das ebenfalls positiv *rel*-abhängig stringent kontrollierte Gen für den nicht-essentiellen Sigmafaktor, *sigB* und das negativ *rel*-unabhängig stringent kontrollierte Gen für das ribosomale L11-Protein, *rpIK*. Da die *rel*-Mutante kein (p)ppGpp bilden kann (Wehmeier *et al.*, 1998), sollten im Falle einer *rel*-Abhängigkeit der Expression keine verstärkte Transkription der Gene mehr zu messen sein. Die Experimente wurden mit der *C. glutamicum rel*-Mutante, wie in 2.1 beschrieben durchgeführt und die Probenahme erfolgte zehn Minuten nach Zugabe des SHX. Die erhaltenen Daten zeigen keinen Anstieg der Transkription der untersuchten Gene nach Zugabe von SHX (Abbildung IV.4). Dies zeigt die *rel*-Abhängigkeit der Transkriptionsänderung bei den *his*-Genen und bei *sigB* und bestätigt die in IV.2.1 getroffenen Aussagen.

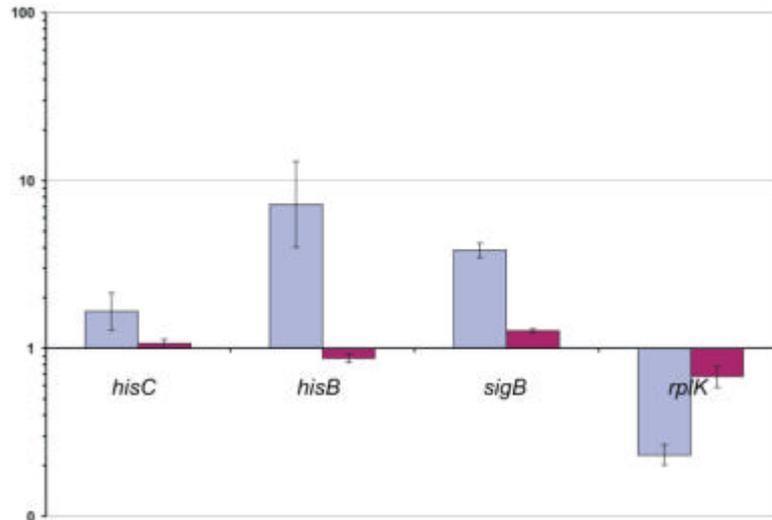


Abb. IV.4: Relative mRNA Mengen ausgewählter Gene in *ref*⁺- (blau) und *ref*⁻-Stämmen (rot) von *C. glutamicum* zehn Minuten nach SHX-Zugabe, jeweils bezogen auf den Wert vor der Zugabe.

3.3 Vergleich der Transkriptionsprofile der *C. glutamicum ref*⁺- und *ref*⁻-Stämme mittels Mikroarray-Hybridisierung

Um diejenigen Gene zu bestimmen, die direkt durch (p)ppGpp transkriptional beeinflusst werden, wurden Kulturen eines *C. glutamicum* RES 167 (*ref*⁺) und eines *C. glutamicum* RES 167 Δ *ref*-Stammes (*ref*⁻) wie in IV.2 beschrieben angezogen und mit SHX versetzt (50mM Endkonzentration). Die Probenentnahme erfolgte vor der SHX-Zugabe (t_0) und nach zehn Minuten (t_{10}). Der Vergleich der Expressionsmuster beider Stämme vor und nach der SHX-Behandlung sollte es ermöglichen, stringent kontrollierte Gene zu identifizieren. Ferner ist es mit diesem Versuchsansatz möglich zwischen Genen, deren Expression direkt durch (p)ppGpp reguliert wird (Rel-abhängige stringente Kontrolle) und Genen, deren Expression unabhängig vom Vorhandensein von (p)ppGpp reguliert wird (Rel-unabhängige Kontrolle), zu unterscheiden.

Die Ergebnisse der Mikroarrayexperimente sind in Abbildung IV.5 in Form eines m/a-Plots (Ratio gegen Intensität) dargestellt. Im *C. glutamicum* RES 167 (*ref*⁺) Stamm waren nach Zugabe des SHX 60 Gene vermindert und 31 Gene verstärkt transkribiert. Die Gene mit der grössten Steigerung in der Transkription sind solche, die an

der Stressantwort beteiligt sind. Unter ihnen sind das *katA*-Gen (Katalase) und das *dps*-Gen (*DNA protection during starvation*). Die Gene mit am stärksten verminderter Transkription sind das *tagA1* Gen (DNA-3-Methyladenin-Glycosylase), das an der DNA-Reparatur beteiligt ist, sowie Gene, die dem Stickstoffmetabolismus zuzuordnen sind. Dies sind die Gene *hmp* (putatives Stickoxid-detoxifizierendes Flavohämo-protein), *glnK* (PII-Protein der Stickstoffregulation), *gltB* (große Untereinheit der Glu-tamat-Synthase) und *amt* (Ammonium-Transporter). Für den *C. glutamicum rel*-Stamm sind die Ergebnisse in Abbildung IV.5.B dargestellt. Die Gene mit der grössten, positiven Transkriptionsänderung sind die Gene *katA* und *gnd* (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase) sowie Thiol-Stress assoziierte Gene. In die letzte Kategorie fallen die Gene *sufD* und *nifS2*, die an der Reparatur von Eisen-Schwefel-Clustern von Proteinen beteiligt sind. Die stärkste negative Transkriptionsänderung war bei Genen zu messen, die für ribosomale Proteine kodieren (z.B. *rpsE*, *rpLO*, *rpmD*). Um die Rel-abhängig regulierten Gene aus dem Datensatz herauszufiltern, wurden die Daten in drei Gruppen eingeteilt: Gene der Klasse A sind unter Rel-abhängiger stringenter Kontrolle und nur im *C. glutamicum rel⁺*-Stamm nach der Zu-gabe von SHX differentiell reguliert; Gene der Klasse B sind sowohl im *rel⁺*- sowie im *rel*-Stamm unter positiver oder negativer Rel-unabhängiger Kontrolle; die Klasse C enthält diejenigen Gene, die nur im *rel*-Stamm nach der SHX-Zugabe in der Expres-sion verändert sind.

Insgesamt wurden 243 Gene differentiell in einem oder in beiden Experimenten ex-primiert, die sich wie folgt auf die drei Klassen aufteilen: 42 Gene in Klasse A, 49 in Klasse B und 152 in Klasse C (Abbildung IV.5.C). Eine Übersicht über alle Ergebnis-se ist in Tabelle VII.1 im Anhang zu finden.

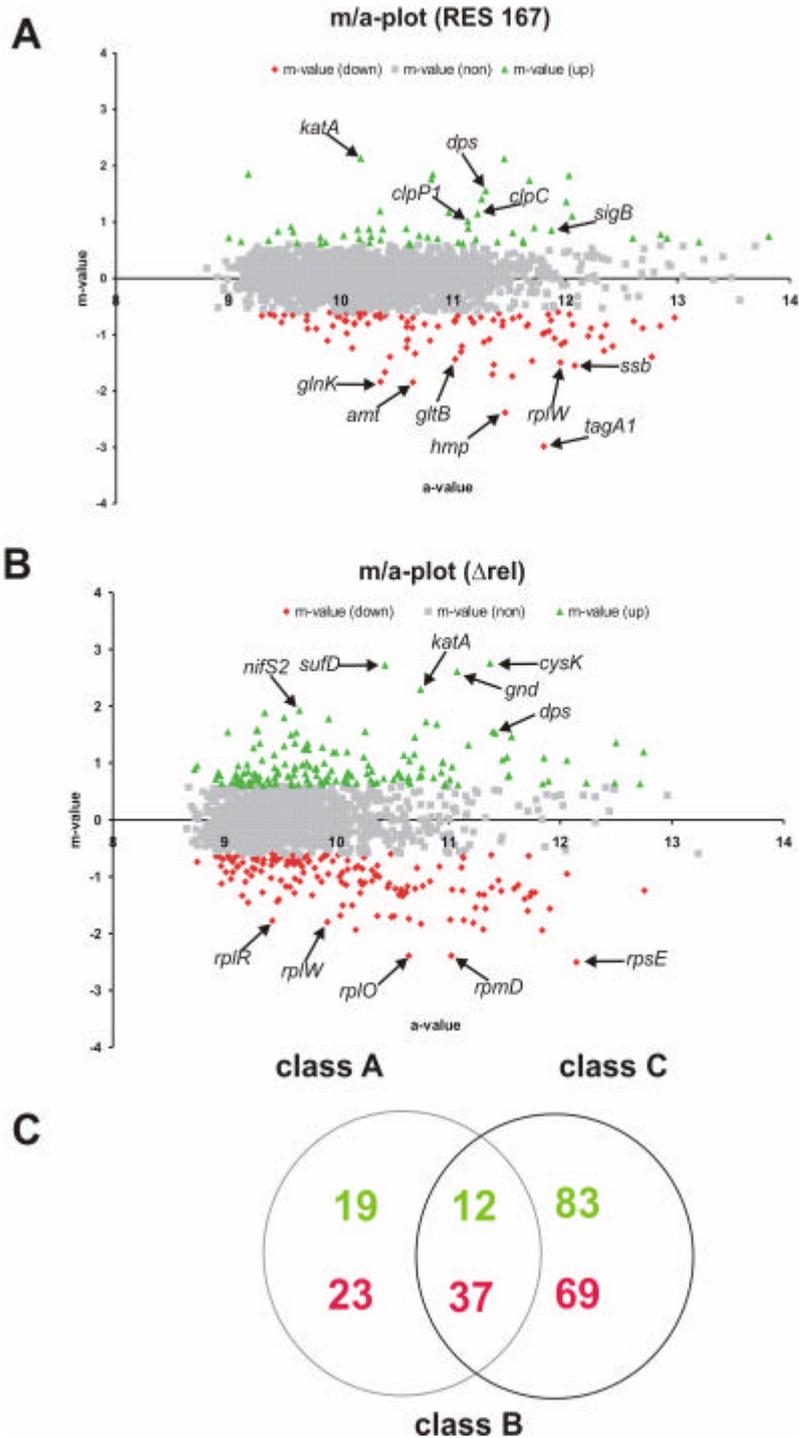


Abb. IV.5: DNA-Mikroarray Hybridisierungen des *C. glutamicum* RES 167 und *C. glutamicum* RES 167 Δrel Stammes. In (A) und (B) sind die Scatter-Plots (m/a-Plots) der Experimente gezeigt. Rot sind diejenigen Gene dargestellt, die signifikant niedriger und grün diejenigen Gene, die signifikant stärker nach der Zugabe von SHX transkribiert wurden. Die Gene mit der grössten Änderung sind mit Pfeilen markiert und benannt. (C) Venn-Diagramm der differenziell exprimierten Gene in *C. glutamicum* RES 167 und der Δrel -Mutante nach der SHX-Behandlung. Die Anzahl der Gene in den Klassen A, B und C ist angegeben. Rote Zahlen bedeuten vermindert und grüne Zahlen verstärkt transkribierte Gene.

3.4 Gene, die der *rel*-abhängigen stringenten Kontrolle unterliegen (Klasse A)

Das Hauptmerkmal der stringenten Kontrolle ist die verminderte Transkription stabiler RNA (Cashel *et al.*, 1996) in Abhängigkeit eines erhöhten (p)ppGpp-Spiegels während der stringenten Kontrolle. Beim Vergleich der Transkriptome vor und nach Zugabe von SHX zum Medium zeigten einige Gene ein ähnliches Verhalten in ihrer Expression in Abhängigkeit von der Anwesenheit von (p)ppGpp, synthetisiert durch das Rel-Protein. Die Gene können entsprechend ihrer Annotation in funktionale Gruppen nach der COG-Klassifizierung eingeteilt werden (Tabelle IV.2). Als grösster, funktional zusammenhängender Komplex ist augenscheinlich der Stickstoffmetabolismus negativ, Rel-abhängig beeinflusst. Insbesondere werden die Gene des AmtR-Regulons (Jakoby *et al.*, 2000) vermindert transkribiert (*codA*, *gdh*, *glnA*, *glnK*, *gltB*, *amt-ocd-soxA*, *ureA*, *urtB-urtC*). Zusätzlich werden noch zwei Gene, die für Oxidoreduktasen kodieren (*betP*, *cg3370*), vermindert transkribiert. Ferner sind noch mehrere Gene für ribosomale Proteine (*rpmG*, *rpsF*, *rpsS*) sowie ein Gencluster mit Genen für die Nukleotidsynthese und DNA-Reparatur (*pyrG-cg1607*) negativ *rel*-abhängig reguliert.

Die Gruppe der Gene, die positiv Rel-abhängig reguliert sind, umfasst solche Gene, die für Proteine von Redox-Prozessen kodieren (*qcrB-qcrC-qcrA1-ctaE*; Tabelle IV.2). Andere Gene sind in den Kohlenstoffmetabolismus involviert (*ptsF*, *pyk*, *ldh*) oder an regulatorischen Prozessen auf Protein- (*ptpA*, *clpP1*, *clpC*) oder auf mRNA-Ebene (*lexA*, *sigB*) beteiligt.

CDS ^a	Ratio	Gen	Annotation	COG ^b
Gene unter Rel-abhängiger, negativer stringenter Kontrolle				
cg0104	0.63	<i>codA</i>	creatinine deaminase	FR
cg0113	0.66	<i>ureA</i>	urease (γ subunit)	E
cg0229	0.33	<i>gltB</i>	glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase large subunit	E
cg0291	0.62		3,4-dioxygenase beta subunit	Q
cg0419	0.59		glycosyltransferase	M
cg0599	0.58	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	J
cg0637	0.55	<i>betB</i>	betaine aldehyde dehydrogenase oxireductase	C
cg0990	0.65	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	J
cg1062	0.43	<i>urtB</i>	ABC-type urea transport system, permease component	E
cg1064	0.65	<i>urtC</i>	ABC-type urea transport system, permease component	E
cg1341	0.62	<i>narI</i>	respiratory nitrate reductase 2 (γ chain)	C
cg1342	0.64	<i>narJ</i>	nitrate reductase (Δ chain)	C
cg1606	0.62	<i>pyrG</i>	CTP synthetase	F
cg1607	0.66		NTP pyrophosphohydrolase	LR
cg1783	0.29	<i>soxA'</i>	sarcosine oxidase, N-terminal fragment	E
cg1784	0.50	<i>ocd</i>	ornithine cyclodeaminase	E
cg1785	0.33	<i>amt</i>	high-affinity ammonia permease	P
cg2260	0.27	<i>glnK</i>	Nitrogen regulatory protein PII	E
cg2280	0.39	<i>gdh</i>	NADP-specific glutamate dehydrogenase	E
cg2429	0.52	<i>glnA</i>	glutamine synthetase I	E
cg2942	0.48		Bacterial regulatory proteins, AsnC family	K
cg3308	0.65	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	J
cg3370	0.58		NADH-dependent flavin oxidoreductase	C
Gene unter Rel-abhängiger, positiver stringenter Kontrolle				
cg0414	1.66	<i>wzz</i>	cell surface polysaccharide biosynthesis protein	D
cg0552	1.60	<i>menD</i>	2-oxoglutarate decarboxylase	H
cg0834	1.58		Bacterial extracellular solute-binding protein	G
cg0924	3.24		ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system	P
cg0926	1.87		ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system	P
cg0928	1.64		ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system	P
cg1873	1.69	<i>tesB2</i>	acyl-CoA thioesterase II	I
cg2102	1.79	<i>sigB</i>	RNA polymerase sigma factor	K
cg2114	1.59	<i>lexA</i>	LexA repressor transcriptional regulator	KT
cg2120	1.53	<i>ptsF</i>	PTS system, fructose/mannitol-specific enzyme II	G
cg2291	1.53	<i>pyk</i>	pyruvate kinase	G
cg2398	1.55	<i>plsC</i>	1-acyl-SN-glycerol-3-phosphate acetyltransferase	I
cg2403	2.61	<i>qcrB</i>	cytochrome B	C
cg2405	1.69	<i>qcrC</i>	cytochrome C1	C
cg2406	1.63	<i>ctaE</i>	cytochrome C, oxidase subunit 3	C
cg2459	1.53	<i>ptpA</i>	protein-tyrosine phosphatase	T
cg2645	1.82	<i>clpP1</i>	ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit ClpP1	OU
cg2963	2.09	<i>clpC</i>	ATP-dependent Clp protease ATPase subunit	O
cg3219	1.77	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	C

Tabelle IV.2: Übersicht über die positiv und negativ stringent kontrollierten Gene in *C. glutamicum*, die nur im *C. glutamicum rel^f*-Stamm nach Zugabe von SHX differentiell exprimiert wurden (Klasse A). Es sind nur diejenigen Gene aufgeführt, die einer COG-Kategorie zugeordnet werden konnten. ^a CDS nach Kalinowski *et al.*, 2003; ^b COG nach Tatusov *et al.*, 2003.

CDS ^a	Ratio	Ratio	Gen	Genprodukt	COG ^b
Gene unter Rel-unabhängiger, negativer Kontrolle					
cg0464	0.56	0.40	<i>ctpA</i>	copper-transporting ATPase	P
cg0581	0.58	0.45	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	J
cg0582	0.41	0.43	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	J
cg0593	0.53	0.31	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	J
cg0594	0.52	0.44	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	J
cg0597	0.44	0.26	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	J
cg0600	0.54	0.31	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	J
cg0602	0.58	0.28	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	J
cg0604	0.46	0.47	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	J
cg0608	0.49	0.26	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	J
cg0609	0.59	0.45	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	J
cg0610	0.49	0.34	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	J
cg0628	0.42	0.34	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	J
cg0629	0.53	0.48	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	J
cg0632	0.57	0.19	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	J
cg0634	0.43	0.19	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	J
cg0651	0.56	0.31	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	J
cg0652	0.61	0.40	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	J
cg0655	0.57	0.38	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase (α subunit)	K
cg0656	0.60	0.43	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	J
cg0673	0.43	0.43	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	J
cg0756	0.54	0.48	<i>cstA</i>	carbon starvation protein A	T
cg0994	0.62	0.41	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	J
cg1343	0.57	0.47	<i>narH</i>	respiratory nitrate reductase oxireductase	C
cg1344	0.60	0.41	<i>narG</i>	nitrate reductase 2 (α subunit)	C
cg1345	0.59	0.37	<i>narK</i>	nitrate/nitrite transporter	P
cg1565	0.66	0.62	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	J
cg1623	0.65	0.50		divalent heavy-metal cations transporter	P
cg2167	0.46	0.56	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	J
cg2253	0.53	0.49	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	J
cg2573	0.41	0.30	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	J
cg2595	0.65	0.64	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	J
cg3140	0.13	0.35	<i>tagA1</i>	DNA-3-methyladenine glycosylase I	L
cg3141	0.22	0.46	<i>hmp</i>	NO-detoxification flavohemoprotein	C
cg3306	0.62	0.41	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	J
cg3307	0.44	0.42	<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein	L
Gene unter Rel-unabhängiger, positiver Kontrolle					
cg0310	3.12	4.89	<i>katA</i>	catalase	P
cg0812	1.66	2.13	<i>dtsR1</i>	acetyl/propionyl-CoA carboxylase (β chain)	I
cg0898	3.33	2.75		pyridoxine biosynthesis enzyme	H
cg0899	3.29	3.30		glutamine amidotransferase (involved in pyridox-	H
cg1761	1.55	3.81	<i>nifS2</i>	cysteine desulphydrase	E
cg1763	1.72	6.59	<i>sufD</i>	components of an uncharacterized iron-regulated	O
cg1764	1.79	2.43	<i>sufB</i>	component of an uncharacterized iron-regulated	O
cg2409	2.31	1.61	<i>ctaC</i>	cytochrome C oxidase chain II	C
cg2644	1.83	2.93	<i>clpP2</i>	ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit	OU
cg2732	1.68	2.41	<i>gntV</i>	gluconokinase	G
cg3114	1.55	2.90	<i>cysN</i>	sulfate adenylyltransferase subunit 1	P
cg3327	3.03	2.89	<i>dps</i>	starvation-induced DNA protecting protein	P

Tabelle IV.3: Gene der Klasse B, die sowohl in beiden *C. glutamicum* Stämmen nach der Zugabe von SHX differentiell exprimiert wurden. *a* CDS nach Kalinowski *et al.*, 2003; *b* COG nach Tatusov *et al.*, 2003

3.5 Gene, die *rel*-unabhängig in Antwort auf SHX-Zugabe reguliert werden (Klasse B)

Die wichtigste Gruppe von Genen dieser Klasse, die negativ in einer *Rel*-unabhängigen Weise reguliert sind, umfasst die für ribosomale Proteine kodierenden Gene. Insgesamt sind 26 dieser Gene mit einer verminderten Transkription nach der Zugabe von SHX zum Medium in dieser Klasse zu finden (Tabelle IV.3). Zusätzlich zu diesen Genen werden noch ein Gen des Translationsapparates (*infA*) und drei weitere Gene, die an der Transkription oder der DNA-Replikation beteiligt sind, reprimiert. Ferner wurde noch bei den Genen einer putativen Nitratreduktase und eines Nitrattransporters (*narK-narG-narH-narJ-narI*) eine reduzierte Transkription gemessen.

Dagegen war eine verstärkte Transkription bei Genen der Antwort auf oxidativen Stress (*katA*, *dps*) in den *C. glutamicum rel*⁺- sowie *rel*-Stämmen zu messen. Weiterhin wurden die Gene des *suffnif*-Clusters nach Zugabe von SHX in beiden Stämmen verstärkt transkribiert. Diese kodieren für Proteine, die an der Reparatur von Fe-S-Clustern beteiligt sind.

3.6 Gene, deren Transkription nur im *rel*-Stamm verändert sind (Klasse C)

In der Klasse der nur im *C. glutamicum rel*-Stamm verändert transkribierten Gene ist eine grosse Diversität zu finden. Es sind weitere Gene des Transkriptions- und Translationsapparates zu identifizieren. Insgesamt sind hier 18 weitere, für ribosomale Proteine kodierende Gene zu finden, weiterhin *infB* (Translationsinitiations-Faktor 2), *prfB* (peptide chain release factor 2) sowie *rpoB*, das für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert. Betrachtet man die mRNA-Mengenverhältnisse einiger ribosomaler Gene im Versuch mit dem *C. glutamicum rel*⁺-Stamm, so fällt auf, dass diese nur geringfügig unter der gewählten Signifikanzgrenze (95%ige Wahrscheinlichkeit einer differentiellen Regulation) liegen (Abbildung VII.1 und VII.2). Zieht man

in Betracht, das diese Gene in Operons organisiert sind, so kann angenommen werden, dass sie eher in Klasse B, denn in Klasse C einzuordnen sind.

Die Expression einiger an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligter Gene konnte nur im *C. glutamicum rel*-Stamm positiv reguliert gefunden werden. Darunter die Gene *sod* (Superoxid-Dismutase), *cg2674* (putative Alkyl-Hydroperoxidase) und *tpx* (Thiol-Peroxidase). Es ist auffällig, dass besonders am Thiolstress beteiligte Gene positiv reguliert sind, da neben den oben genannten Genen noch das *fpr2-cysI-cysH-cysD* Gencluster und das *cysK* Gen (Cystein-Synthase) eine verstärkte Expression zeigen.

In der Klasse C sind insgesamt Gene für 13 Transkriptionsregulatoren zu finden. Davon werden *cg1792* (WhiA-Homolog), *whiB2*, *whiB4*, *cg0725* (MarR-Typ Regulator), *clgR* (Proteolyse-Regulator; Engels *et al.*, 2004), *phoU* (putativer Phosphataufnahme-Regulator) und *cg3303* (Regulator der PadR-Familie) negativ reguliert. Die zweite Gruppe von Regulatoren wird im *C. glutamicum rel*-Stamm nach Zugabe von SHX verstärkt transkribiert. Dazu gehören *cg1631* (MerR Familie), *dtxR* (Brune *et al.*, 2006) und *fur*, die für an der Metall-Homöostase und an der Eisenaufnahme beteiligte Regulatoren kodieren, sowie *cg2500* (ArsR-Typ Regulator), *cg2614* (TetR-Typ Regulator) und *cg3315* (MarR-Familie).

V Diskussion

Die stringente Kontrolle stellt bei nahezu allen Bakterien eine umfassende physiologische Antwort als Reaktion auf einen Mangel an aminoacylierten tRNAs. Das Hauptmerkmal der stringenten Kontrolle ist die Synthese des Nukleotides (p)ppGpp, einem Derivat von GDP oder GTP. Dabei wurde zunächst eine Inhibition der Synthese von stabiler RNA (rRNA und tRNA) aber nicht von dann beobachtet. Weitere Untersuchungen offenbarten ein komplexes, regulatorisches Netzwerk, das durch die Stringente Kontrolle reguliert wird, um das Überleben unter Mangelbedingungen sicherzustellen.

In den ersten genetischen Studien zur stringenten Kontrolle von *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass auch hier (p)ppGpp als Signalmolekül fungiert (Wehmeier *et al.*, 1998). Es wird vom Rel-Protein nach Zugabe von SHX zum Kulturmedium synthetisiert. Eine *C. glutamicum* Δrel -Mutante ist nicht mehr in der Lage, (p)ppGpp zu synthetisieren und zeigt einen relaxierten Phänotyp bei der rRNA-Akkumulation. Ferner konnte gezeigt werden, dass ein intaktes *rel*-Gen für das normale Funktionieren der Histidin- und Serinbiosynthesewege notwendig ist (Tauch *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde das genetische Netzwerk der stringenten Kontrolle mittels Transkriptomuntersuchungen charakterisiert. Dazu wurden zunächst die Transkriptionsänderungen der Histidin- und Serin-Biosynthesegene in Abhängigkeit von der Zeit, nach Zugabe von SHX zum Medium untersucht. Es wurden weiterhin die globalen Effekte der stringenten Kontrolle auf die Genexpression mittels Mikroarrays identifiziert. Im folgenden werden die gemessenen Effekte diskutiert und mit dem existierenden Wissen, das vor allem bei den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* gewonnen wurde, verglichen. Dabei ergeben sich allerdings folgende Einschränkungen: für *E. coli* gibt es bis dato keine Untersuchungen auf globaler Ebene, die sowohl einen Wildtyp als auch eine Mutante, die kein (p)ppGpp mehr bilden kann, umfassen. In *B. subtilis* wurde eine solche Untersuchung zwar durchgeführt, aber es wurde eine Lysin- und Tryptophan-auxotrophe Mutante verwendet und die Induktion der stringenten Kontrolle erfolgte durch die Zugabe von DL-Norvalin (Eymann *et al.*, 2002).

1 Zeitlicher Verlauf der Transkriptionsänderung der Histidin- und Serinbiosynthesegene

Um den optimalen Zeitpunkt für die Mikroarraymessungen herauszufinden, wurden zunächst in *real-time* RT-PCR-Experimenten die Transkriptionsänderungen der bekannten Histidin- und Serinbiosynthesegene nach der Induktion eines künstlichen Aminosäuremangels gemessen. Nach bereits fünf Minuten war ein Effekt auf die Transkriptmenge zu messen. Das Maximum der Induktion lag bei zehn Minuten nach Zugabe von SHX, wobei die stärkste Zunahme der Expression bei den Genen *hisC* (Histidinolphosphat Transaminase), *hisH* (Untereinheit der Imidazol-Glycerolphosphat Synthase) und *serA* (Phosphoglycerat-Dehydrogenase) zu messen war (Abb. IV.3). Danach erfolgte eine schrittweise Abnahme der Transkriptionsraten, wobei nach 25 Minuten das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. Dies deutet auf das Ende der stringenten Kontrolle und die Aufnahme normaler Zellaktivitäten hin. Diese Ergebnisse sind mit Messungen aus *Salmonella typhimurium* konform. Für diesen Organismus konnte das Maximum im (p)ppGpp-Spiegel bereits sieben Minuten nach der Induktion eines artifiziellen Aminosäuremangels gemessen werden (Shand *et al.*,

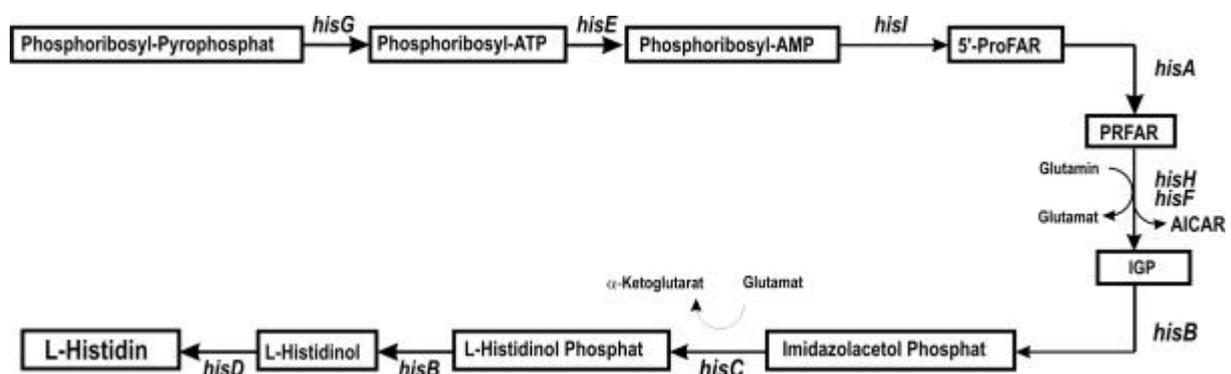


Abb. V.1: Schematische Darstellung des Histidinbiosynthesewegs und der daran beteiligten Gene: *hisG* (ATP Phosphoribosyltransferase), *hisE* (Phosphoribosyl-ATP Pyrophosphatase), *hisI* (Phosphoribosyl-AMP Cyclohydrolase), *hisA* (5'ProFAR Isomerase), *hisH* (Imidazol-Glycerolphosphat-Synthase, Untereinheit), *hisF* (Imidazol-Glycerolphosphat-Synthase, Untereinheit), *hisB* (Imidazolglycerol-Phosphat Dehydratase), *hisC* (Histidinol-Phosphat Transaminase), *hisD* (Histidinol Dehydrogenase)

1989). Historisch gesehen gehören die Histidinbiosynthesegene zu den ersten Genen, für die bei *E. coli* eine positive, stringente Kontrolle nachgewiesen wurde (Cas-

hel *et al.*, 1996; Riggs *et al.*, 1986; Stephens *et al.*, 1975). Der Effekt des (p)ppGpp auf das *his*-Operon wurde in *E. coli* und *S. typhimurium* intensiv untersucht, wobei ein direkter Einfluss auf die Transkription nachgewiesen werden konnte (Shand *et al.*, 1989; Riggs *et al.*, 1986). Der genaue Mechanismus der Induktion des *his*-Operons in *E. coli* ist bisher jedoch unbekannt. Diese Ergebnisse wurden später für *E. coli* durch Mikroarrayanalysen bestätigt (Chang *et al.*, 2002). Die Induktion der Histidinbiosynthesegene stimmt mit den Ergebnissen für *E. coli* überein, in *B. subtilis* wurde aber weder für die Histidin- noch für die Serinbiosynthesegene eine Steigerung der Transkription beobachtet (Eymann *et al.*, 2002). Als Besonderheit gegenüber *E. coli* sei bemerkt, dass in *C. glutamicum* die Histidingene in drei Operons organisiert sind, während in *E. coli* ein Operon vorliegt. Das gerade die Gene *hisC* und *hisH* die stärkste Änderung in der Transkription haben könnte an ihrer Position in der Histidinbiosynthese liegen (Abb. V.1). Bei der von HisC katalysierten Reaktion wird Glutamat verbraucht, so dass ein Einfluss auf den Stickstoffmetabolismus nicht auszuschließen ist. Bei der Umsetzung von PRFAR zu IGP durch HisH entsteht zum einen Glutamat sowie AICAR, das eine Vorstufe der Nukleotidsynthese ist. Die Abhängigkeit der Serinbiosynthesegene in *C. glutamicum* von der stringenten Kontrolle steht im Gegensatz zu den gemessenen Ergebnissen in *E. coli* und *B. subtilis*, da aus diesen Organismen bisher nur für die Histidin- und Threoninbiosynthesegene eine Sensitivität beobachtet wurde (Cashel *et al.*, 1996; Eymann *et al.*, 2002; Williams und Rogers, 1987).

2 Rel-abhängig und Rel-unabhängig regulierte Gene in *C. glutamicum*

Um das globale Netzwerk der stringenten Kontrolle definieren zu können, wurden die Expressionsmuster des *C. glutamicum*-Stamms RES 167 (*rel*⁺) und einer *rel*-Deletionsmutante (*rel*⁻) vor und nach einer künstlichen Induktion eines Aminosäuremangels mittels DNA-Mikroarrays verglichen. Um die stringent kontrollierten Gene so genau wie möglich zu beschreiben, wurden sie in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt: Die Gene der Klasse A werden nur in Anwesenheit eines funktionellen *rel*-Genes differentiell exprimiert, Gene der Klasse B sowohl im *rel*⁺- als auch im *rel*⁻-

Stamm und die Gene der Klasse C nur im *C. glutamicum rel*-Stamm nach der Zugabe von SHX.

2.1 Stringent regulierte Gene in *C. glutamicum* (Klasse A)

- Gene des Stickstoffmetabolismus sind negativ, stringent reguliert

Die prominentesten Gene innerhalb dieser Gruppe sind am Stickstoffmetabolismus beteiligt. Dies sind *amt* (*ammonia permease*; Siewe *et al.*, 1996), *codA* (*creatinine deaminase*; Beckers *et al.*, 2001), *ureA* (*urease g-subunit*; Bendt *et al.*, 2004; Nolden *et al.*, 2000), *gltB* (*glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase*, grosse Untereinheit; Nolden *et al.*, 2001), *glnA* (*glutamine synthetase*; Jakoby *et al.*, 1999), *glnK* (*nitrogen regulatory protein PII*; Beckers *et al.*, 2004), *urtBC* (Pukás *et al.*, 2000) und *gdh* (*glutamate dehydrogenase*; Börmann *et al.*, 1992). In *E. coli* ist ebenfalls eine verstärkte Transkription des *glnK* Genes nach Auslösen der stringenten Kontrolle zu beobachten (Chang *et al.*, 2002). Es ist jedoch zu beachten, dass *E. coli* einen von *C. glutamicum* unterschiedlichen Signalaufnahme- und Weiterleitungsmechanismus für Stickstoff besitzt (Burkovski, 2003). Ferner ist es von Interesse, dass die in diesem Versuch differentiell regulierten Gene des Stickstoffmetabolismus unter der Kontrolle des Regulator AmtR liegen (Jakoby *et al.*, 2000; Beckers *et al.*, 2005). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Gene des AmtR-Regulons unter Stickstoffmangel verstärkt transkribiert werden (Silberbach *et al.*, 2005).

- Das Gen des alternativen Sigmafaktors, *sigB* unterliegt einer *rel*-abhängigen, positiven Stringenten Kontrolle

Der zweite markante Punkt ist die Induktion des Gens für den alternativen Sigmafaktor σ^B , dem funktionalen Analog zum *E. coli* σ^S (Halgasova *et al.*, 2002), durch die stringente Kontrolle, ausgelöst durch einen artifiziell herbeigeführten Aminosäuremangel. In *E. coli* kontrolliert σ^S die generelle Stressantwort und der Eintritt in die Stationärphase (Gentry *et al.*, 1993; Hengge-Aronis, 1999). Er spielt daher eine wichtige Rolle in der Adaption der Zellen an Nährstoffmangel und anderen Stress. In *E. coli* wird σ^S im Zuge der stringenten Kontrolle verstärkt transkribiert (Chang *et al.*, 2002; Hengge-Aronis, 1999); im Gegensatz dazu wird in *B. subtilis* das *sigB*-Gen nur

bei der generellen Stressantwort induziert, nicht aber bei der stringenten Kontrolle (Eymann *et al.*, 2002; Mostertz *et al.*, 2004; Völker *et al.*, 1995). Dies führt zu der Vermutung, dass *C. glutamicum* und *E. coli* vergleichbare Mechanismen zur Induktion einer Stressantwort, aufgrund eines Nährstoffmangels bzw. der Einleitung der Stationärphase, haben.

- Rel-abhängige, positive Regulation der Clp-Protease-Gene

Als weiterer wichtiger Komplex in der stringenten Kontrolle induzierter Gene ist der Komplex der *clp*-Gene. Die Gene *clpP1* und *clpC* kodieren für Untereinheiten der Clp-Protease. Die Induktion der *clp*-Gene zeigt Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen aus *Streptococcus pyogenes*. In diesem Organismus wurde nach Auslösen der stringenten Kontrolle durch einen künstlichen Aminosäuremangel eine verstärkte, Rel-unabhängige Transkription gemessen (Steiner und Malke, 2001). In *C. glutamicum* wurde eine Induktion der Gene *clpP1P2* und *clpC* im Zuge der Hitzestressantwort beobachtet (Engels *et al.*, 2004). Proteasen bilden zusammen mit Chaperonen die Qualitätskontrolle der Zelle und sind an der Kontrolle transkriptionaler Regulatoren beteiligt (Gottesmann, 1999). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass einige Proteine während der Stationärphase unter Verbrauch von ATP abgebaut werden (Maurizi und Rasulova, 2002). Die ClpP-Protease ist also auf proteomischer Ebene an der Adaption an die Stationärphase beteiligt (Weichart *et al.*, 2003). Es kann demnach spekuliert werden, dass die Induktion dieser Gene ein weiterer Schritt der Regulation während der stringenten Kontrolle ist, indem regulatorische Proteine abgebaut werden.

2.2 Rel-unabhängig regulierte Gene in *C. glutamicum* (Klasse B)

- Rel-unabhängige positive Regulation von Genen des oxidativen Stresses

Der wichtigste Komplex der Rel-unabhängig positiv kontrollierten Gene ist an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Die beiden Gene *katA* (Katalase) und *dps* (*DNA protection during starvation*) gehören zu den Genen mit der stärksten Änderung in der Transkription. Dies stimmt mit Ergebnissen aus *E. coli* überein, denn es konnte in diesem Organismus gezeigt werden, dass mit Einsetzen der Stationärpha-

se Gene der oxidativen Stressantwort verstärkt exprimiert werden (Dukan und Nyström, 1999). Das Dps-Protein ist in diesem Zusammenhang interessant, da gezeigt werden konnte, dass es Zellen in der Stationärphase gegen mehrere unterschiedliche Stressarten (inklusive oxidativen Stress), schützen kann (Nair und Finkel, 2004). Die Expression von *dps* in *C. glutamicum* stellt eine Parallele zu *E. coli* dar, da es dort in der stringenten Kontrolle ebenfalls verstärkt transkribiert wird (Chang *et al.*, 2002). Da es sich bei der Zugabe von SHX um ein artifizielles System zur Induktion der stringenten Kontrolle handelt, ist es nicht ausgeschlossen, dass das Hydroxamat einen oxidativen Stress in den Zellen auslöst.

- Die Expression der Gene für ribosomale Proteine ist Rel-unabhängig negativ, reguliert

Innerhalb der Gruppe der Rel-unabhängig, negativ regulierten Gene sind die Gene für ribosomale Proteine von grösster Bedeutung. In *E. coli* und *B. subtilis* zeigen sie nach der Induktion der stringenten Kontrolle eine verminderte Expression (Chang *et al.*, 2002; Eymann *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu *B. subtilis* sind die Gene für ribosomale Proteine Rel-unabhängig reguliert; in *B. subtilis* werden sie während eines künstlichen Aminosäuremangels nur im Wildtyp, aber nicht in einer *relA*-Deletionsmutante reprimiert (Eymann *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1980).

In *C. glutamicum* erfolgt eine verminderte Transkription nach Zugabe von SHX sowohl im *rel⁺*- als auch im *rel*-Stamm. Dies kann so erklärt werden, dass leere tRNAs an die Ribosomen binden und es dadurch zu einem Abbruch der Proteinsynthese kommt. Die dabei entstehenden freien Ribosomen zerfallen und die Untereinheiten reprimieren ihre eigene Transkription (negative Autoregulation).

2.3 Nur im *rel*-Stamm differentiell regulierte Gene (Klasse C)

Die in der Klasse C zu findenden Gene sind nur in der *C. glutamicum rel*-Mutante und nicht im Wildtyp nach der Zugabe von SHX differentiell reguliert. Unter ihnen finden sich eine grosse Anzahl von transkriptionellen Regulatoren. Dies kann so interpretiert werden, dass der Metabolismus der *rel*-Mutante aus dem Gleichgewicht geraten ist und die Zelle versucht, dies ohne den Masterregulator (p)ppGpp zu kom-

pensieren. In dieser Klasse sind unter anderem die Gene für mehrere Transkriptionsregulatoren (z.B. *fur*, *dtxR*, *whiB2*, *whiB4* oder *phoU*) zu finden. Die hohe Zahl an betroffenen Regulatoren könnte das komplexe Expressionsmuster des direkten Vergleiches der *C. glutamicum* *rel⁺*- und *rel*-Stämme erklären.

3 Modell der Stringenten Kontrolle in *C. glutamicum*

Mit den vorliegenden Ergebnissen lässt sich ein Modell der stringenten Kontrolle in *C. glutamicum* erstellen. Dabei wird pppGpp als in einer Rel-abhängigen Reaktion auf einen Aminosäuremangel gebildet. Die Umwandlung zu ppGpp erfolgt entweder durch das Produkt des *ppx1*- oder *ppx2*-Gens. Beide zeigen eine hohe Aminosäurehomologie zur Sequenz des *E. coli* Gpp-Proteins und sind daher die wahrscheinlichsten Kandidaten. Eine genaue Aussage lässt sich allerdings nur durch weiterführende Untersuchungen, wie z.B. das Erstellen von Deletionsmutanten, treffen. Die Degradation des ppGpp zu GDP erfolgt durch die (p)ppGpp-3'-Pyrophosphohydrolase-Funktion des Rel-Proteins. Die Regeneration des Ausgangssubstrates erfolgt durch das Ndk-Protein aus GDP und einem Nukleotidtriphosphat (s. Abbildung V.2).

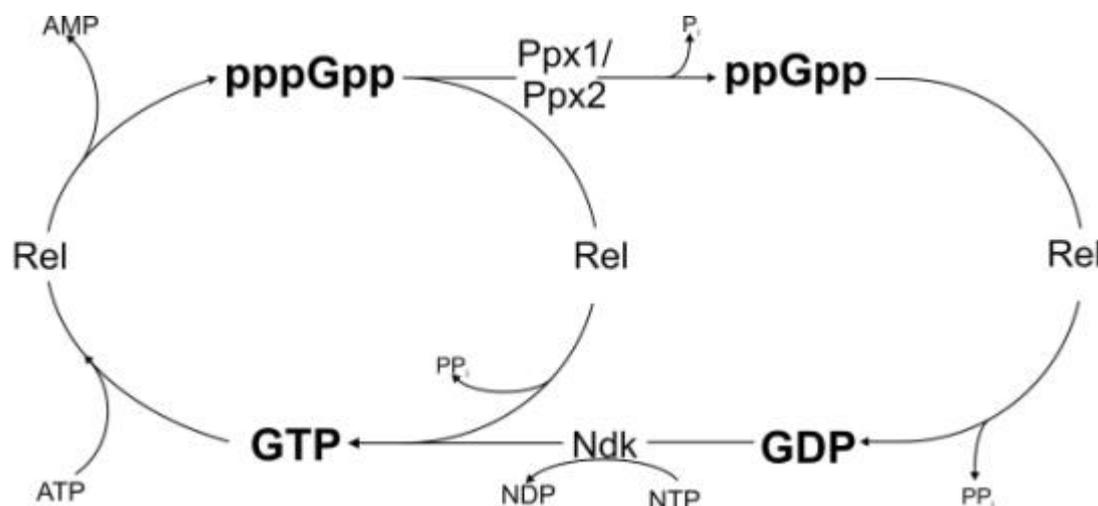


Abb. V.2: Übersicht über den zellulären (p)ppGpp-Metabolismus in *C. glutamicum*: (p)ppGpp Synthetase / (p)ppGpp-3'-Pyrophosphohydrolase (Rel), Nucleosid-5'-Diphosphokinase (Ndk) und pppGpp-5'-Phosphohydrolase (Ppx1 oder Ppx2).

Bei der stringenten Kontrolle in *C. glutamicum* gibt es sowohl Parallelen als auch Unterschiede zu den bisher beobachteten, pleiotropen Effekten in *E. coli* oder *B. subtilis*. Ein Übersicht über die Effekte in *C. glutamicum* gibt Abbildung V.3.

Ausgelöst durch einen Halt der Peptidelongation am Ribosom durch eine leere tRNA kommt es zur Synthese von pppGpp durch das Rel-Protein. Das daraus entstehende ppGpp bindet vermutlich analog zu den Vorgängen in *E. coli* an eine Untereinheit der RNA-Polymerase, so dass es zu einer Konformationsänderung und dadurch zur verminderten bzw. verstärkten Transkription „stingenter“ Promotoren kommt.

Als Folge der (p)ppGpp-Synthese kommt es zu einer verminderten Transkription aller rRNA-Operons. Im Zuge der Neuprogrammierung des Metabolismus werden die meisten Gene des Stickstoffmetabolismus vermindert exprimiert. Die Gene des Stickstoffmetabolismus liegen unter der Kontrolle des AmtR-Regulators. Die negativ, Rel-abhängige Regulation des AmtR-Regulons unterstreicht dessen Bedeutung für den Stoffwechsel von *C. glutamicum*. Daneben ist noch der Nukleotidstoffwechsel,

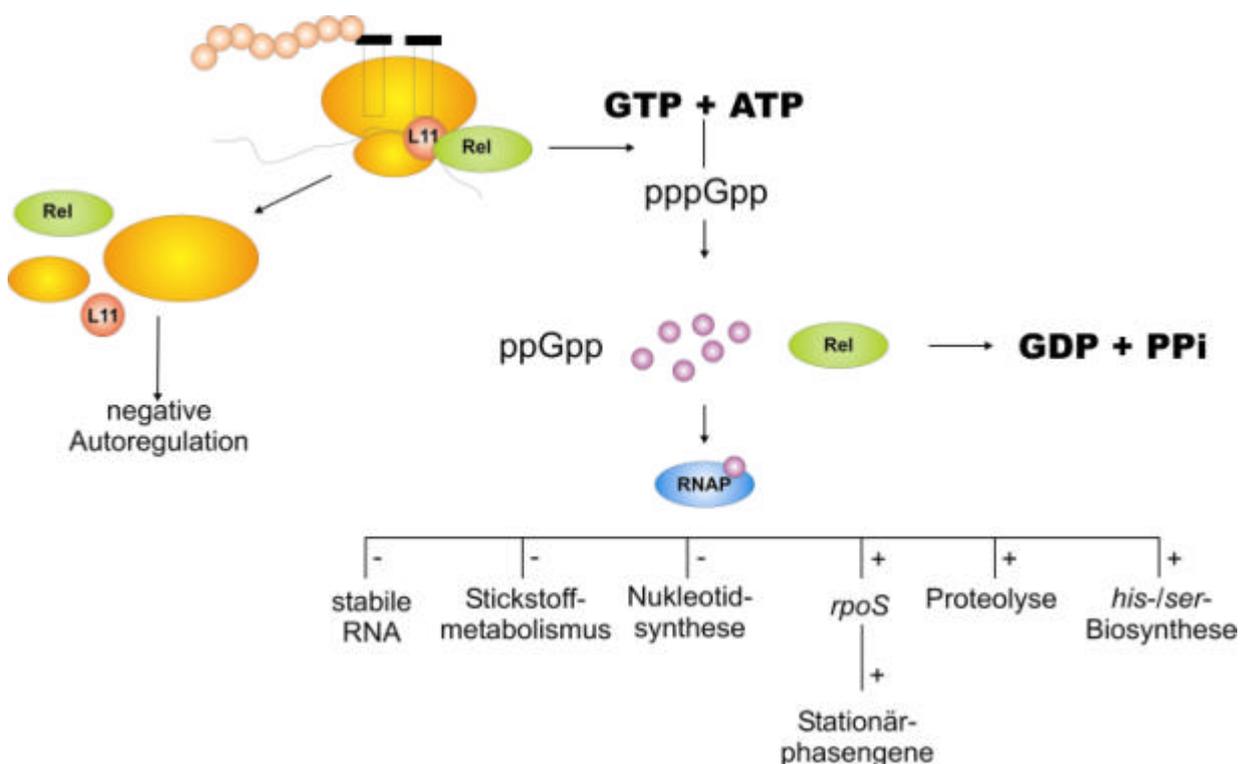


Abb. V.3: Übersicht über die pleiotropen Effekte der stringenten Kontrolle in *C. glutamicum*. Dargestellt ist die (p)ppGpp-Synthese durch das Rel-Protein und die daraus resultierenden Effekte. Zusätzlich ist die Rel-unabhängige, negative Autoregulation der Gene für ribosomale Proteine.

vertreten durch das putative Operon *pyrG-cg1607*, negativ reguliert. Im Gegenzug dazu wird der alternative Sigmafaktor *sigB* verstärkt transkribiert. Da es sich bei SigB um ein Homolog zum *E. coli* RpoS handelt liegt die Vermutung nahe, dass er in *C. glutamicum* ebenfalls die Stationärphasengene kontrolliert. Damit wird durch das Auslösen der stringenten Kontrolle und ein dadurch vermindertes Wachstum die Stationärphase eingeleitet und so den Zellen ein Überleben unter Stress- bzw. Mangelbedingungen ermöglicht. Ein weiteres Merkmal, das in diesen Kontext passt, ist die verstärkte Proteolyse, vertreten durch die ClpP-Protease, die unfertige oder fehlerhafte Proteine abbaut und damit die darin enthaltenen Aminosäuren wieder zugänglich macht. Ausserdem könnte die ClpP-Protease auf Proteomeben einen weiteren Regulationsmechanismus für Transkriptionsregulatoren darstellen. Als letztes sind die beiden Aminosäurebiosynthesewege für Histidin und Serin positiv reguliert. Interessant ist dabei, dass beide Synthesewege Glutamat verbrauchen, gleichzeitig aber der Gdh-abhängige Glutamatsyntheseweg herunterreguliert wird. Aus den vorliegenden Daten lässt sich ableiten, dass *C. glutamicum* insgesamt seinen Metabolismus verlangsamt und energieverbrauchende Synthesewege abschaltet, um dadurch die Mangelsituation überleben zu können und bei verbesserten Bedingungen sofort wieder wachsen zu können.

4 Ausblick

Die Stringente Kontrolle ist ein komplexes Regulationsnetzwerk, zu dessen Aufklärung der genomweite Einblick einen Mosaikstein beitragen kann. Um das Regulationsnetzwerk in seiner vollen Funktion zu studieren sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Dazu gehören neben sensitiveren Transcriptomicsmethoden wie der *real-time* RT-PCR auch weiterfolgende Analysen wie Proteom- bzw. biochemische Untersuchungen, um festzustellen ob sich die hier gemessenen Transkriptionsänderungen auch in veränderten Proteinmengen und –Aktivitäten niederschlagen. Letztendlich kann das Verständnis der Stringenten Kontrolle auch dazu beitragen, die globale Regulation in industriellen Produktionsstämmen besser zu verstehen und durch ihre gezielte Beeinflussung das Verhältnis von Produkt zu Biomasse günstig zu beeinflussen.

VI Literatur

- Anderson S., Marks C.B., Lazarus R., Miller J., Stafford K., Seymour S., Light D., Rastetter W., Estell D.** (1985). Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* **230**: 144-149.
- 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.
- Ault-Riche D., Fraley C. D., Tzeng C. M., Kornberg A.** (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1841-1847.
- Badger J. H., Olson G. J.** (1999). CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 512-524.
- Barker M. M., Gaal T., Gourse R. L.** (2001a). Mechanism of regulation of transcription inhibition by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Biol.* **305**: 689-702.
- Barker M. M., Gaal T., Josaitis C. A., Gourse R. L.** (2001b). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* **305**: 673-688.
- Bathe B., Kalinowski J., Pühler A.** (1996). The physical and genetical map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 255-265.
- Beckers G., Nolden L., Burkovski A.** (2001). Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology.* **147**: 2961 – 2970.
- Beckers G., Bendt A. K., Krämer R., Burkovski A.** (2004). Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter- and urease-encoding genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **186**: 645-652.
- Beckers G., Strösser J., Hildebrandt U., Kalinowski J., Farvik M., Krämer R., Burkovski A.** (2005). Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. *Mol. Microbiol.* **58**: 580-595.

- Bendt A. K., Beckers G., Silberbach M., Wittmann A., Burkovski A.** (2004). Utilization of creatinine as an alternative nitrogen source in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol.* **181**: 443 – 450.
- Blumenthal R. M., Lemaux P. G., Neidhardt F. C., Dennis P. P.** (1976). The effects of the *relA* gene on the synthesis of aminoacyl-tRNA synthetases and other transcription and translation proteins in *Escherichia coli* A. *Mol Gen Genet.* 1976, **149**: 291-296.
- Börmann E. R., Eikmanns B. J., Sahn H.** (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol Microbiol.* 1992, **6**: 317-326.
- Borek E., Rockenbach J., Ryan A.** (1959). Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* **71**: 318-323.
- Brockmann-Gretza O.** (1998). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Bielefeld, Deutschland.
- Brune I., Werner H., Hüser A. T., Kalinowski J., Pühler A., Tauch A.** (2006). The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **7**(1) .
- Burkovski A** (2003). Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev.* **27**: 617-628.
- Cashel M., Gallant J.** (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene in *Escherichia coli*. *Nature (London)* **221**: 838-841.
- 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**: 3133-3141.
- Cashel M., Gentry D. R., Hernandez V. J., Vinella D.** (1996). The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd edition, pp. 1458-1496.
- 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.

- 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**: 279-287.
- Chatterji D., Ojha A. K.** (2001). Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signalling. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 160-165.
- Christiansen L., Nierhaus K. H.** (1976). Ribosomal proteins of *Escherichia coli* that stimulate stringent-factor-mediated pyrophosphoryl transfer *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1839-1843.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., and 23 other authors** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins M. D., Cummins C. S.** (1996). Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1986, pp. 1266-1276, *In* Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Da Costa X. J., Artz S. W.** (1997). Mutations that render the promoter of the histidine operon of *Salmonella typhimurium* insensitive to nutrient-rich medium repression and amino acid downshift. *J. Bacteriol.* **179**: 5211-5217.
- Davidson J. P., Williams L. S.** (1979). Relaxed control of RNA synthesis during nutritional shiftdowns of an *hisU* mutant of *S. typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**: 682-687.
- Delcher A. L., Harmon D., Kasif S., White O., Salzberg S. L.** (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acid Res.* **27**: 4636-4641.
- DeRisi J. L., Iyer V. R., Brown P. O.** (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* **14**: 457-460.
- Dondrup M., Goesmann A., Bartels D., Kalinowski J., Krause L., Linke B., Rupp O., Sycrba A., Pühler A., Meyer F.** (2003). EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J Biotechnol.* **106**: 135-146.
- Dukan S., Nystrom T.** (1999). Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem.* **274**: 26027-26032.
- Elhardt D., Wirth R., Bock A.** (1982). Regulation of formation of threonyl-tRNA synthetase and protein synthesis factor 3 from *Escherichia coli* *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **123**: 477-482.

- Engels S., Schweitzer J. E., Ludwig C., Bott M., Schaffer S.** (2004). *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. *Mol Microbiol.* **52**: 285-302.
- Eymann C., Homuth G., Scharf C., Hecker M.** (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **184**: 2500-2520.
- Fehr S., Richter D.** (1981). Stringent response of *Bacillus stearothermophilus*: evidence for the existence of two distinct guanosine 3', 5'-polyphosphate synthetases. *J. Bacteriol.* **145**: 68-73.
- Flärdh K., Axberg T., Albertson N. H., Kjelleberg S.** (1994). Stringent control starvation of marine *Vibrio sp.* strain S14: Molecular cloning nucleotide sequence and deletion of the *relA* gene. *J. Bacteriol.* **176**: 5949-5957.
- Freundlich M.** (1977). Cyclic AMP can replace the RelA-dependent requirement for derepression of acetohydroxy acid synthetase in *E. coli* K-12. *Cell* **12**: 1121-1126.
- Friesen J. D., Fiil N. P., Parker J. M., Haseltine W.** (1974). A new relaxed mutant of *Escherichia coli* with an altered 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 3465-3469.
- Friesen J. D., Fiil N. P., Parker J. M., v. Meyenburg K.** (1975). Synthesis and turnover of basal level guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**: 304-309.
- Furano A. V., Witel F. P.** (1976). Effect of the *relA* gene on the synthesis of individual proteins *in vivo*. *Cell* **8**: 115-122.
- Gallant J., Margason G., Finch B.** (1972). On the turnover of ppGpp in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **247**: 6055-6058.
- Gentry D. R., Hernandez V. J., Nguyen L. H., Jensen D. B., Cashel M.** (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**: 7982-7989.
- Ginther C. L., Ingraham J. L.** (1974). Cold-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in nucleoside diphosphate kinase. *J. Bacteriol.* **118**: 1020-1026.
- Gottesmann S.** (1999). Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Microbiol.* **2**: 142-147.
- Grigoriev A.** (1998). Analyzing genomes with cumulative skew diagrams. *Bioinformatics* **14**: 252-258.

- Grossmann A. D., Taylor W. E., Burton Z. F., Burgess R. R., Gross C. A.** (1985). Stringent response in *E. coli* induces expression of heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* **186**: 357-365.
- Gruneberg-Manago M.** (1996). Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA-synthetases and translation factors. *Microbiol. Rev.* February **1**: 1386-1409.
- Halgasova N., Bukovska G., Ugorcakova J., Timko J., Kormanec J.** (2002). The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol Lett.* **216**: 77-84.
- Hamel E., Cashel M.** (1973). Role of guanine nucleotides in protein synthesis: elongation factor G and guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3250-3254.
- Hammer B. K., Swanson M. S.** (1999). Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* **33**: 721-731.
- Hartmann M., Barsch A., Niehaus K., Pühler A., Tauch A., Kalinowski A.** (2004). The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular communication of *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol.* **182**: 299-312.
- Haseltine W. A., Block R., Gilbert W., Weber K.** (1972). MS1 and MS2 are made on ribosomes in an idling step of protein synthesis. *Nature (London)* **238**: 381-384.
- Haseltine W. A., Block R.** (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1564-1568.
- Hayashi M., Mizoguchi H., Shiraishi N., Obayashi M., Nakagawa S., Imai J., Watanabe S., Ota T., Ikeda M.** (2002). Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(6):1337-1344.
- Heinemeyer E. A., Richter D.** (1977). *In vitro* degradation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) by an enzyme associated with the ribosomal fraction of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **84**: 357-361.
- Heinemeyer E. A., Richter D.** (1978). Mechanism of the *in vitro* breakdown of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4180-4183.

- Heinemeyer E. A., Geis M., Richter D.** (1978). Degradation of guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate *in vitro* by the *spoT* gene product of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **89**: 125-131.
- Hengge-Aronis R.** (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* **2**: 148-152.
- Herman A., Wegrzyn A., Wegrzyn G.** (1994). Regulation of replication of plasmid pBR322 in amino acid starved *Escherichia coli* strains. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 374-378.
- Hermann T.** (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172.
- Hüser A. T., Becker A., Brune I., Dondrup M., Kalinowski J., Plassmeier J., Pühler A., Wiegräbe I., Tauch A.** (2003). Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J. Biotechnol.* **106**(2-3): 269-286.
- Hüser A. T., Chassagnole C., Lindley N. D., Merkamm M., Guyonvarch A., Elisakova V., Patek M., Kalinowski J., Brune I., Puhler A., Tauch A.** (2005). Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6): 3255-3268.
- Hüser A. T.** (2005). Dissertation am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Bielefeld, Deutschland.
- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B. C., Herrmann R.** (1996). Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4420-4449.
- Ikemura T., Dahlberg J. E.** (1973). Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. II. Noncoordinate accumulation during stringent control. *J. Biol. Chem.* **248**: 5033-5041.
- Jakoby M., Krämer R., Burkovski A.** (1999). Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: Isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. *FEMS Microbiol Lett.* **173**: 303 - 310.
- Jakoby M., Nolden L., Meier-Wagner J., Krämer R., Burkovski A.** (2000). AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* 2000, **37**: 964 - 977.
- Jishage M., Kvint K., Shingler V., Nystrom T.** (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* **16**: 1260-1270.

- Jones P. G., Cashel M., Glaser G., Neidhardt F. C.** (1992). Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 3903-3914.
- Jores L., Wagner R.** (2003). Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. *J. Biol. Chem.* **278**: 16834-16843.
- Justesen J., Lund T. Pedersen F. S., Kjeldgaard N. O.** (1986). The physiologie of stringent factor (ATP:GTP 3'-diphosphotransferase) in *Escherichia coli*. *Biochemie (Paris)* **68**: 715-722.
- Kalinowski J., Bathe B., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B. J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Möckel B., Pfefferle W., Pühler A., Rey D., Rückert C., Sahn H., Wendisch V. F., Wiegräbe I., Tauch A.** (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**: 5-25.
- Kari C., Torok I., Travers A.** (1977). ppGpp cycle in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **150**: 249-255.
- Keasling J. D., Bertsch L., Kornberg A.** (1993). Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7029-7033.
- Kingston R. R., Gutell R. R., Taylor A. R., Chamberlin M. J.** (1981). Transcriptional mapping of plasmid pKK3535. Quantitation of the effect of guanosine tetraphosphate on binding of the *rrnB* promoters and a λ promotor with sequence homologies to the *cII* binding region. *J. Mol. Biol.* **146**: 433-449.
- Kinoshita S., Udaka S., Shimono M.** (1957). Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamate acid by various microorganisms. *Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Kliachko E. V., Bochanov S. S., Shakulov R. S.** (1983). Metabolic regulation of threonine operon transcription in *E. coli* cells. *Biokhimiya* **48**: 1095-1102.
- Kornberg A., Rao N. N., Ault-Riche D.** (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 89-125.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I & 31 other authors** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

- Kuroda A., Murphy H., Cashel M., Kornberg A.** (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 21240-21243.
- Kvint K., Farewell A., Nyström 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.
- Lagosky P. A., Chang F. N.** (1980). Influence of amino acid starvation on guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate basal-level synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**: 499-508.
- Lagosky P. A., Chang F. N.** (1981). Correlation between RNA synthesis and basal level guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in relaxed mutants of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**: 11651-11656.
- Lamond A. I., Travers A. A.** (1985). Genetically separable functional elements mediate the optimal expression and stringent regulation of a bacterial tRNA gene. *Cell* **40**: 319-326.
- 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.
- Lechevalier M. P., Lechevalier H. A.** (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
- Leuchtenberger W.** (1984). Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren. *Chemie for Labor und Betrieb* **6**: 278-285.
- Liebl W.** (1991). The genus *Corynebacterium*-nonmedical. pp. 1157-1171 In Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Schleifer K. H. (ed.), The procaryotes. Springer Verlag, New York.
- Lidemann L. F., Ponomarenko O. I., Shakulov R. S.** (1979). Synthesis of beta, beta'-subunits of RNA-polymerase in *E. coli* cells starved for an essential amino acid. *Biokhimiya* **44**: 1859-1863.
- Lipmann F., Sy J.** (1976). The enzymatic mechanism of guanosine 5'-3'-diphosphate synthesis. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **17**: 1-14.
- Loos A., Glanemann C., Willis L. B., O'Brien X. M., Lessard P. A., Gerstmeir R., Guillouet S., Sinskey A. J.** (2001). Development and validation of corynebacterium DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(5): 2310-2318.

- Martin R. G.** (1968). Polarity in relaxed strains of *S. typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **31**: 127-134.
- Martinez-Costa O. H., Arias P., Romero N. M., Parro V., Mellado R. P., Malpartida F.** (1998). The *relA/spoT* homologues gene from *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and –degrading activities. *J. Bacteriol.* **180**: 4123-4132.
- Maurizi M. R., Rasulova F.** (2002). Degradation of L-glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: allosteric regulation of enzyme stability. *Arch Biochem Biophys.* **397**: 206-216.
- Mechold U., Cashel M., Steiner K., Gentry D., Malke H.** (1996). Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* **178**: 1401-1411.
- Metzger S., Sarrubi E., Glaser G., Cashel M.** (1989). Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. *J. Biol. Chem.* **264**: 9122-9125.
- Meyer F. A., Goesmann A., McHardy A. C., Bartels D., Bekel T., Clausen J., Kalinowski J., Linke B., Rupp O., Giegerich R., Pühler A.** (2003). GenDB-an open source genome annotation system for procaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* **31**: 2187-2195.
- Mizushima-Sugano J., Kaziro Y.** (1985). Regulation of the expression of the *tufB* operon: DNA sequences directly involved in the stringent control. *EMBO J.* **4**: 1053-1058.
- Mostertz J., Scharf C., Hecker M., Homuth G.** (2004). Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology* **150**: 497-512.
- Muffler A., Bettermann S., Haushalter M., Horlein A., Neveling U., Schramm M., Sorgenfrei O.** (2002). Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J. Biotechnol.* **98**(2-3): 255-268.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. Cold Spring Harbour Symp. *Quant. Biol.* **51**: 263.
- Nair S., Finkel S. E.** (2004). Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol.* 2004, **186**: 4192-4198.

- Nakayama K., Kitida S., Kinoshita S.** (1979). Studies in lysine fermentation, the control mechanism on lysine accumulation by homoserine and threonine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **7**: 145-154.
- Neidhardt F. C.** (1963). Properties of a bacterial mutant lacking amino acid control of RNA synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* **68**: 365-379.
- Neidhardt F. C.** (1966). Role of amino acid activating enzymes in cellular physiology. *Bacteriol. Rev.* **30**: 701-719.
- Nolden L., Beckers G., Möckel B., Pfefferle W., Nampoothiri K. M., Krämer R., Burkovski A.** (2000). Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organisation of corresponding genes and investigation of activity. *FEMS Microbiol Lett.* **189**: 305 - 310.
- Nolden L., Farwick M., Krämer R., Burkovski A.** (2001). Glutamine synthetases in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. *FEMS Microbiol Lett.* **201**: 91-98.
- Nomura M., Jinks-Robertson S., Miura A.** (1982). Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli*, p. 91-104. In M. Grunberg-Manago and B. Saver (ed.), Interaction of Translational and Transcriptional Controls in the Regulation of Gene Expression. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Nunn W, Cronan J.** (1974). *rel* gene control of lipid synthesis in *Escherichia coli*. Evidence for eliminating fatty acid synthesis as the sole regulatory site. *J. Biol. Chem.* **249**: 3994-3996.
- Nyström T.** (1998). To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 283-290.
- Ochi K.** (1990). Streptomyces *relC* mutants with an altered ribosomal protein ST-L11 and genetic analysis of a *Streptomyces griseus relC* mutant. *J. Bacteriol.* **172**: 4008-4016.
- Ogata K., Kinoshita S., Tsunoda T., Aida K.** (1976). Microbial production of nucleic acid related substances, New York: Wiley.
- Pao C. C., Dyess B. T.** (1981). Stringent control of RNA synthesis in the absence of guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *J. Biol. Chem.* **256**: 2252-2257.
- Park J. W., Jung Y., Lee S. J., Jin D. J., Lee Y.** (2002). Alteration of stringent response of the *Escherichia coli rnpB* promoter by mutations in the -35 region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 1183-1187.
- Parker J. R., Watson J., Friesen J. D., Fiil N. P.** (1976). A relaxed mutant with an altered ribosomal protein L11. *Mol. Gen. Genet.* **144**: 111-114.

- Patte J., Morand P., Boy E., Richaud C., Borne F.** (1980). The *relA* locus and the regulation of lysine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **179**: 319-325.
- Pedersen F. S., Lund E., Kjeldgaard N. O.** (1973). Codon specific, tRNA-dependent *in vitro* synthesis of ppGpp and pppGpp. *Nature (London) New Biol.* **243**: 13-15.
- Pedersen F. S., Kjeldgaard N. O.** (1977). Analysis of the *relA* gene product in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **76**: 91-97.
- Pfaffl M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* **29**:345.
- Potrykus K., Wegrzyn G., Hernandez V. J.** (2002). Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the lambda(R) promoter. *J. Biol. Chem.* **277**: 43785-43791.
- Primm T. P., Andersen S. J., Mizrahi V. Avarbock D., Rubin H., Barry C. E. III** (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* **182**: 4889-4898.
- Pukás L. G., Inui M., Yukawa H.** (2000). Structure of the urease operon of *Corynebacterium glutamicum*. *DNA Seq.* **2000**, **11**: 383 - 394.
- Rampagnol S., Davis B. D.** (1974). Localization of the stringent protein of *Escherichia coli* in the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **71**: 820-824.
- Reddy P. S., Raghavan A., Chatterji D.** (1995). Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol. Microbiol.* **15**: 255-265.
- Reeh S., Pedersen S., Friesen J. D.** (1976). Biosynthetic regulation of individual proteins in *relA*⁺ and *relA* strains of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *Mol. Gen. Genet.* **149**: 279-289.
- Reizer J., Reizer A., Saier jr M. H., Bork P., Sander C.** (1993). Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp70 superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 247-248.
- Richter D.** (1976). Stringent factor from *Escherichia coli* directs ribosomal binding and release of uncharged tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 707-711.
- Richter D.** (1979). *In vitro* synthesis and decay of guanosine 3', 5'-bis-diphosphate (ppGpp). p. 743-765 *In* D. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, M. Kahan and M. Nomura (ed.), Ribosomes: structure, function and genetics. University Park Press, Baltimore.

- Riggs D. L., Mueller R. D., Kwan H. S., Artz S. W.** (1986). Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**: 9333-9337.
- Rudd K. E., Bochner B. R., Cashel M., Roth J. R.** (1985). Mutations in the *spoT* gene of *Salmonella typhimurium*: effects on *his* operon expression. *J. Bacteriol.* **163**: 354-542.
- Sales M., Brenchley J. E.** (1982). The regulation of the ammonia assimilation enzymes in Rel⁺ and Rel⁻ strains of *S. typhimurium*. *Mol. gen. Genet* **186**: 263-268.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sands M. K., Roberts R. B.** (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **63**: 505-511.
- Schreiber G. S., Metzger S., Aizenman E., Roza S., Cashel M., Glaser G.** (1991). Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 3760-3767.
- Shand R. F., Blum P. H., Mueller R. D., Riggs D. L., Artz S. W.** (1989). Correlation between histidine operon expression and guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate levels during amino acid downshift in stringent and relaxed strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **171**: 737 - 742.
- Siewe R. M., Weil B., Burkovski A., Eikmanns B. J., Eikmanns M., Krämer R.** (1996). Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem.* **271**: 5398 - 5403.
- Silberbach M., Hüser A., Kalinowski J., Puhler A., Walter B., Kramer R., Burkovski A.** (2005). DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **199**(4): 357-367.
- Smith I., Pares P., Cabane K., Dubnau E.** (1980). Genetics and physiology of the *rel* system of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 271-279.
- Somerville C. R., Ahmed A.** (1977). *rel*-dependent methionine requirement in revertants of a methionyl-transfer RNA synthetase mutant of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **111**: 77-81.
- Sommerville C. R., Ahmed A.** (1979). Mutants of *Escherichia coli* defective in the degradation of guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate (pppGpp). *Mol. Gen. Genet.* **169**: 315-323.

- Stackebrand E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L.** (1997). Proposal for a new hierarchical classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491.
- Steiner K., Malke H.** (2001). *relA*-independent amino acid starvation response network of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 2001, **183**: 7354-7364.
- Stent G. S., Brenner S.** (1961). A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 2005-2014.
- Stephens J. C., Artz S. W., Ames B. N.** (1975). Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**: 4389 - 4393.
- Strauch E. Takano E., Baylis H. A., Bibb M. J.** (1991). The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **5**: 289-298.
- Suzuki T., Honda H., Katsumata R.** (1972). Production of antimicrobial compounds analogous to chloramphenicol by n-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2223-2228.
- Swanton M., Edlin G.** (1972). Isolation and characterization of a RNA relaxed mutant of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 583-588.
- Sy J., Lipmann F.** (1973). Identification of the synthesis of guanosine tetraphosphate (MSI) as insertion of a pyrophosphoryl group into the 3'-position in guanosine 5'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 306-309.
- Sy J.** (1977). *In vitro* degradation of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5529-5533.
- Tatusov R. L., Fedorova N. D., Jackson J. D., Jacobs A. R., Kiryutin B., Koonin E. V., Krylov D. M., Mazumder R., Mekhedov S. L., Nikolskaya A. N., Rao B. S., Smirnov S., Vasudevan A. V., Wolf Y. I., Yin J. J., Natale D. A.** (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics.* **4**: 41
- Tauch A., Wehmeier L., Götter S., Pühler A., Kalinowski J.** (2001). Relaxed *rrn* expression and amino acid requirement of a *Corynebacterium glutamicum rel* mutant defective in (p)ppGpp metabolism. *FEMS Microbiol Letters.* **201**: 53-58.
- Tauch A., Homann I., Mormann S., Rüberg S., Billault A., Bathe B., Brand S., Brockmann-Gretza O., Rückert C., Schischka N., Wrenger C., Hoheisel J., Möckel B., Huthmacher K., Pfefferle W., Kalinowski J.** (2002a). Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J. Biotechnol.* **95**: 25-38.

- Tauch A., Kirchner O., Löffler B., Götter S., Pühler A., Kalinowski J.** (2002b). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replikon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGAI. *Curr. Microbiol.* **45**: 362-367.
- Terasawa M., Yukawa H., Takayama Y.** (1985). Production of L-aspartic acid from *Brevibacterium* by the cell re-using process. *Process Biochem.* **20**: 124-128.
- Toulokxonov I. 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**: 1220-1225.
- VanBogelen R. A., Neidhardt F. C.** (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5589-5593.
- van der Biezen E. A., Sun J., Coleman M. J., Bibb M. J., Jones J. D.** (2000). *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3747-3752.
- Vanderwel D., Ishiguro E. E.** (1984). Properties of cell wall peptidoglycan synthesized by amino acid deprived *relA* mutants of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **30**: 1239-1246.
- Völker U., Völker A., Maul B., Hecker M., Dufour A., Haldenwang W. G.** (1995). Separate mechanisms activate SigB of *Bacillus subtilis* in response to environmental and nutritional stresses. *J. Bacteriol.* **177**: 3771 – 3780.
- Voellmy R., Goldberg A. L.** (1980). Guanosine-3'-5'-biphosphatase and the regulation of protein breakdown in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**: 1008-1014.
- von Meyenburg K., Boye E., Skarstad K., Koppes L., Kogoma T.** (1987). Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**: 2650-2658.
- Wagner R.** (2002). Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 331-340.
- Wehmeier L., Schäfer A., Burkovski A., Krämer R., Mechold U., Malke H., Pühler A., Kalinowski J.** (1998). The role of the *Corynebacterium glutamicum rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiology*. 1998, **144**: 1853-1862.
- Wehmeier L., Brockmann-Gretza O., Pisabarro A., Tauch A., Pühler A., Martin J. F., Kalinowski J.** (2001). A *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 mutant with a

defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p)ppGpp accumulation upon amino acid starvation. *Microbiology*. 2001, **147**: 691-700.

Weichart D., Querfurth N., Dreger M., Hengge-Aronis R. (2003). Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **49**: 1605-1614.

Weinen B., Ehrlich R., Stoffler-Meilicke M., Stoffler G., Smith I., Weiss D., Vince R., Pestka S. (1979). Ribosomal protein alterations in thiostrepton- and micrococcin-resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **254**: 8031-8041.

Wendisch V. F. (2003). Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J. Biotechnol.* **104**(1-3): 273-285.

Wendisch V. F., Bott M., Kalinowski J., Oldiges M., Wiechert W. (2006). Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *J. Biotechnol.* **124**(1):74-92.

Wendrich T. M., Marahiel M. A. (1997). Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **26**: 65-79.

Williams M. G., Rogers P. (1987). Expression of *arg* genes in *Escherichia coli* during arginine limitation dependent upon stringent control of translation. *J Bacteriol.* **169**: 1644 - 1650.

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**: 5980-5990.

Yu J., Othman M. I., Farjo S., Zarepari S., MacNee S. P., Yoshida S., Swaroop A. (2002). Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarrays. *Mol. Vis.* **8**: 130-137.

Zacharias M., Goringer H. U., Wagner R. (1989). Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and *tac* promoter on growth-rate control and stringent sensitivity. *EMBO J.* **8**: 3357-3363.

Zajic J. E., Guignard H., Gerson D. F. (1977). Emulsifying and surface active reagents from *Corynebacterium hydrocarboclastum*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 1295-1301.

Zhou Y. N., Jin D. J. (1998). The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like "stringent" RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2908-2913.

Zidwick M. J., Koshus J., Rogers P. (1984). Positive control of expression of the *argECBH* gene cluster in vitro by guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate. *J. Bacteriol.* **159**: 647-651.

VII Anhang

1 Verwendete Abkürzungen

5'-ProFAR		Pro-Phosphoribosyl-Formimino-5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonukleotid
Abb	-	Abbildung
AICAR		5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonukleotid
AS	-	Aminosäure
AMP	-	Adenosin-Monophosphat
ADP	-	Adenosin-Diphosphat
ATP	-	Adenosin-Triphosphat
ATTC	-	American Type Culture Collection
BHIS	-	Brain-Heart-Infusion
bp	-	Basenpaare
BPB-XC	-	Bromphenolblau-Xylencyanol
bzw	-	beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
Cy3	-	Cyanin-Farbstoff
<i>C. glutamicum</i>	-	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	-	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
Eppi	-	Eppendorfgefäß
EtBr	-	Ethidiumbromid
EtOH	-	Ethanol
g	-	Gramm
h	-	Stunde
kbp	-	Kilobasenpaare
kD	-	Kilodalton
l	-	Liter
LB	-	Luria-Bertani

M	-	Mol pro Liter
m.	-	milli (10^{-3})
min	-	Minute
μ	-	mikro (10^{-6})
n.	-	nano (10^{-9})
o.D.	-	optische Dichte
ORF	-	open reading frame (offenes Leseraster)
PCR	-	polymerase chain reaction
ppGpp		Guanosin-3',5'-Bispyrophosphate
pppGpp		Guanosin-3'-Diphosphat-5'-Triphosphat
PRFAR		Phosphoribosyl-Forimino-5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonukleotid
rpm	-	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	-	Raumtemperatur
RT-PCR	-	Reverse-Transkriptase-PCR
sec	-	Sekunde
SDS	-	Sodiumdodecylphosphat
Tris	-	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	-	unit
ü/n	-	über Nacht
v/v	-	Volumen/Volumen
w/v	-	Masse/Volumen
WT	-	Wildtyp

Außerdem wurden die Abkürzungen der SEinheiten, der Ein- und Dreibuchstaben-code der IUPAC für Aminosäuren und allgemein gebräuchliche Abkürzungen verwendet.

2 Tabellen

Tabelle VII.1

CDS ^a	Ratio (Drel/RES)	Ratio (RES _{t10} /RES ₀)	Ratio (Drel _{t10} /Drel ₀)	Gen	Genprodukt	COG ^b
cg0007	2,02			<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	L
cg0047	0,12				Conserved hypothetical protein	M
cg0049	0,50				Putative membrane protein, Rhomboid-family	R
cg0057		1,54		<i>pknB</i>	Serine/threonine protein kinase	RTKL
cg0064			0,44		Conserved hypothetical protein	T
cg0065			0,56		Hypothetical protein	
cg0077	3,93				Conserved hypothetical protein	
cg0078	5,31				Putative membrane protein	
cg0079	3,24				Putative secreted protein	M
cg0081	1,97				Putative tautomerase	R
cg0082	1,64				Chloride ion channel, ClC-family	P
cg0088	0,57			<i>citP</i>	Putative secondary Mg ²⁺ /H ⁺ :citrate transporter, CitMHS-family	C
cg0107	2,23				Putative secreted protein	NU
cg0113		0,63		<i>ureA</i>	Urease gamma subunit	E
cg0129	1,68			<i>putA</i>	Proline dehydrogenase/delta-1- pyrroline-5-carboxylate dehydro- genase	C
cg0138			1,73		ATP/GTP-binding protein	
cg0154	1,54				Putative hydrolase	R
cg0161			1,70		Putative membrane protein	
cg0175	1,89				Putative secreted protein	
cg0177	1,54				Hypothetical protein	
cg0194			1,54		Putative secreted protein	
cg0215	0,59	0,64	0,63	<i>cspA</i>	Cold-shock protein A	K
cg0216	0,63				Putative membrane protein	
cg0221	0,58				Putative transcriptional regulator, LacI-family	K
cg0229		0,37		<i>gltB</i>	Glutamate synthase (NADPH), large chain	E
cg0238	1,68		1,72		FAD/FMN-containing dehydroge- nase	C
cg0242			3,21		Hypothetical protein	
cg0249		0,61			ABC-type putative polysaccharide transporter, permease subunit	GM

cg0281			0,64		tRNA-specific adenosine deaminase	FJ
cg0291	2,50	0,62			Putative dioxygenase	Q
cg0297		1,70			Conserved hypothetical protein, DUF149-family	S
cg0306	1,72			<i>lysC</i>	Aspartate kinase	E
cg0307	1,87			<i>asd</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	E
cg0310	0,46	3,39	4,90	<i>katA</i>	Catalase	P
cg0337			0,59	<i>whiB4</i>	Putative transcriptional regulator, WhiB-family	
cg0352	1,61				Putative secreted protein	
cg0359	2,00				Putative membrane protein	
cg0378	1,54				Putative phage-associated protein	S
cg0387			1,83		Putative NAD/mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase	C
cg0394			0,59		Putative glycosyl transferase	M
cg0400			1,63	<i>adhC</i>	Putative alcohol dehydrogenase (NADP(+))	R
cg0414		1,68		<i>wzz</i>	Cell surface polysaccharide biosynthesis/chain length determinant	D
cg0416			1,67		Putative secreted protein, carrying a eukaryotic domain	
cg0419	0,59	0,63			Putative glycosyltransferase	M
cg0431	0,56				Putative membrane protein, involved in polysaccharide acetylation	I
cg0435	0,48		0,47	<i>udgA1</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	M
cg0438			0,66		Putative glycosyltransferase	M
cg0441		0,63		<i>lpd</i>	Dihydrolipoamide dehydrogenase	C
cg0442	0,58		0,66	<i>galU2</i>	Putative UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	M
cg0448			0,56		Conserved putative membrane protein	
cg0450			1,74		Conserved hypothetical protein	
cg0453	1,53				Putative membrane protein	
cg0464	0,63	0,62	0,40	<i>ctpA</i>	Putative Cu ²⁺ transporting P-type ATPase	P
cg0467	2,12				ABC-type putative heme transporter, substrate-binding lipoprotein	P
cg0475	1,91				Conserved hypothetical protein	
cg0489	1,61				Putative membrane protein	
cg0490			1,62	<i>proC</i>	Pyrraline-5-carboxylate reductase	E
cg0513	1,98				Putative membrane protein	

cg0527	1,75				Putative transcriptional regulator, ArsR-family	K
cg0528	2,42				Putative secreted protein	
cg0538	2,63				Conserved hypothetical protein	
cg0552		1,78		<i>menD</i>	2-Oxoglutarate decarboxylase	H
cg0563			0,31	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	J
cg0564	1,76		0,43	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	J
cg0569	1,93				Putative Cd ²⁺ transporting P-type ATPase	P
cg0576	1,57		0,65	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase, beta chain	K
cg0581		0,56	0,45	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	J
cg0582		0,31	0,43	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	J
cg0587			2,07	<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	J
cg0593		0,40	0,31	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	J
cg0594		0,38	0,44	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	J
cg0597	2,41	0,35	0,29	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	J
cg0597	1,61	0,36	0,26	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	J
cg0599	1,76	0,54		<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	J
cg0600		0,46	0,31	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	J
cg0601	2,95		0,30	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	J
cg0602	1,86	0,49	0,28	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	J
cg0603	1,65	0,56	0,26	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	J
cg0604	2,11	0,43	0,47	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	J
cg0608		0,41	0,26	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	J
cg0609		0,48	0,45	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	J
cg0610		0,43	0,34	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	J
cg0620			0,57		Putative secreted protein	
cg0628		0,46	0,34	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	J
cg0629		0,42	0,48	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	J
cg0630		0,61	0,29	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	J
cg0631		0,62	0,18	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	J
cg0632		0,51	0,19	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	J
cg0634		0,43	0,19	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	J
cg0637		0,60		<i>betB</i>	Putative betaine aldehyde dehydrogenase (BADH)	C
cg0648			1,53	<i>adk</i>	Adenylate kinase	F
cg0650			1,67		Putative secreted protein	S
cg0651		0,46	0,31	<i>infA</i>	Translation initiation factor IF-1	J
cg0652		0,52	0,40	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	J
cg0653	1,65	0,60	0,51	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	J

cg0654		0,56	0,33	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	J
cg0655	1,65	0,57	0,38	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit	K
cg0656	1,65	0,54	0,43	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	J
cg0673	1,55	0,51	0,43	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	J
cg0674	2,12		0,65	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	J
cg0675			0,58	<i>mrsA</i>	Putative phosphoglucosamine mutase/phosphomannomutase	G
cg0690	1,85			<i>groES</i>	10kDa chaperonin	O
cg0691	2,16			<i>groEL'</i>	60kDa chaperonin, putative pseudogene (N-terminal fragment)	O
cg0693	1,58			<i>'groEL</i>	60kDa chaperonin, putative pseudogene (C-terminal fragment)	O
cg0696	0,27			<i>sigD</i>	RNA polymerase sigma factor, ECF-family	K
cg0699	1,64			<i>guaB2</i>	IMP dehydrogenase	F
cg0700			0,64	<i>guaB3</i>	IMP dehydrogenase/GMP reductase	F
cg0701			0,62		Putative secondary drug/metabolite transporter, drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	R
cg0703	1,76			<i>guaA</i>	Putative GMP synthase	F
cg0706	3,95				Conserved putative membrane protein	KT
cg0712	1,66				Putative secreted protein	
cg0717			1,77	<i>crtEb</i>	Lycopene elongase	H
cg0720			1,64	<i>crtI2</i>	Phytoene dehydrogenase (desaturase)	Q
cg0725	0,64		0,64		Putative transcriptional regulator, MarR-family	K
cg0752	1,93				Putative secreted or membrane protein	S
cg0753	1,99				Putative secreted protein	
cg0754	1,84	0,59		<i>metX</i>	Homoserine O-acetyltransferase	E
cg0755	1,62			<i>metY</i>	O-Acetylhomoserine sulfhydrylase	E
cg0756	0,60	0,47	0,48	<i>cstA</i>	Putative carbon starvation protein A	T
cg0766	1,64		1,71	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase	C
cg0773			1,55		Putative exodeoxyribonuclease	L
cg0774	0,64				Putative membrane protein	S
cg0775	0,56				Hypothetical protein	
cg0778	0,55				ABC-type putative iron-siderophore transporter, permease subunit	P
cg0781	3,71				Putative membrane protein	

cg0791	0,50			<i>pyc</i>	Pyruvate carboxylase	C
cg0793	0,59				Putative secreted protein	S
cg0811	0,50			<i>dtsR2</i>	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, beta chain	I
cg0812	0,28	1,52	2,13	<i>dtsR1</i>	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, beta chain	I
cg0834		1,66			ABC-type putative sugar transporter, substrate-binding lipoprotein	G
cg0841		0,64			Conserved hypothetical protein	S
cg0842	0,58				Putative DNA helicase	L
cg0849			0,61	<i>rmlA2</i>	Mannose-1-phosphate guanylyl-transferase (GDP)	MJ
cg0850			0,61	<i>whiB2</i>	Putative transcriptional regulator, WhiB-family	
cg0853			0,63		Conserved hypothetical protein	
cg0858			1,58		Putative secreted protein	S
cg0865		0,61			Putative secreted lipoprotein	
cg0866	0,57				Conserved hypothetical protein	R
cg0867	2,38		2,16		Putative ribosome-associated protein Y (PSrp-1)	J
cg0878	0,31			<i>whiB1</i>	Putative transcriptional regulator, WhiB-family	
cg0882	0,57	0,64			Conserved hypothetical protein	
cg0883			1,57		Conserved putative secreted protein	
cg0885		0,62			Putative helicase, UvrD/Rep-family	L
cg0892		1,59			Conserved hypothetical protein	S
cg0893			0,63		Putative secreted protein, containing a PDZ-domain	T
cg0898	0,35	3,33	2,75		Pyridoxine biosynthesis enzyme	H
cg0899	0,39	3,55	3,31		Putative glutamine amidotransferase, involved in pyridoxine biosynthesis	H
cg0904			1,80		Hypothetical protein	
cg0910	0,64		1,59	<i>himP</i>	Histidinol-phosphatase, ImpA-family	G
cg0913			0,64	<i>prfB</i>	Peptide chain release factor 2 (RF-2)	J
cg0922	0,65				ABC-type putative iron-siderophore transporter, substrate-binding lipoprotein	P
cg0924		4,34			ABC-type putative iron-siderophore transporter, substrate-binding lipoprotein	P

cg0926		1,84			ABC-type putative iron-siderophore transporter, permease subunit	P
cg0928		1,85			ABC-type putative iron-siderophore transporter, ATPase subunit	P
cg0936	0,15			<i>rpf1</i>	RPF-protein precursor	
cg0938			0,64		Cold shock protein	K
cg0939			0,65		Putative secreted protein	
cg0952	1,83	2,29			Putative integral membrane protein	S
cg0953	1,99	2,66			Putative Na ⁺ /solute symporter, solute:sodium symporter (SSS) family	R
cg0957	0,57			<i>fas-IB</i>	Fatty acid synthase	I
cg0980	0,29				Putative secreted protein, related to metalloendopeptidases	M
cg0984	1,59			<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-carboxamide formyltransferase	F
cg0988		0,60	0,34	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	J
cg0989		0,60	0,39	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	J
cg0990			0,41	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	J
cg0991			0,42	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	J
cg0994		0,59	0,41	<i>rpmE</i>	Putative 50S ribosomal protein L31	J
cg0998	6,22				Trypsin-like serine protease	O
cg0999	2,20				Putative molybdopterin biosynthesis protein	H
cg1010			0,60		Putative membrane protein	S
cg1013		1,55			Hypothetical protein	
cg1016			0,60	<i>betP</i>	Putative secondary glycine betaine/choline transporter, betaine/carnitine/choline transporter (BCCT) family	M
cg1037	0,40			<i>rpf2</i>	RPF2 precursor, secreted protein	S
cg1038	0,65		0,64	<i>ksgA</i>	Putative dimethyladenosine transferase	J
cg1039	0,61		0,62		Putative isopentenyl monophosphate kinase	I
cg1049		0,65			Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase	I
cg1055	1,78			<i>menG</i>	S-Adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase	H
cg1057	0,66				Hypothetical protein	S

cg1061	0,65			<i>urtA</i>	ABC-type putative branched-chain amino acid transporter, substrate-binding lipoprotein	E
cg1062		0,46		<i>urtB</i>	ABC-type putative branched-chain amino acid transporter, permease subunit	E
cg1068	1,92				Putative oxidoreductase	R
cg1071	1,79			<i>pth1</i>	Putative peptidyl-tRNA hydrolase	J
cg1072			0,56	<i>rplY</i>	Ribosomal protein L25 (general stress protein Ctc)	J
cg1075	2,37			<i>prsA</i>	Ribose-phosphate diphosphokinase	FE
cg1080	1,69				Putative multicopper oxidase	Q
cg1091	0,41				Hypothetical protein	
cg1095	0,48		0,56		Hypothetical protein	
cg1097	0,58		0,65		Hypothetical protein	
cg1099		0,65		<i>mfd</i>	Transcription-repair coupling factor (TRCF)	LK
cg1104	1,83				Putative membrane protein, predicted esterase	R
cg1109			0,53		Hypothetical protein	
cg1110	2,10		1,56		Conserved hypothetical protein	M
cg1113			1,57		Conserved hypothetical protein	S
cg1115			0,61	<i>ppx2</i>	Putative exopolyphosphatase	FP
cg1121	1,62				Permease, MFS-type	S
cg1122	1,55				Putative secreted protein	
cg1125	1,69				Conserved hypothetical protein	
cg1125	1,68				Conserved hypothetical protein	
cg1129	0,55			<i>aroF</i>	Putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	E
cg1130	1,76			<i>uppS1</i>	Putative undecaprenyl pyrophosphate synthetase	I
cg1131	1,69				Conserved hypothetical protein	
cg1136			1,67		Conserved hypothetical protein	
cg1138	0,49				Putative acetyltransferase, GNAT-family	M
cg1139	0,60		0,41		Allophanate hydrolase subunit 2	E
cg1140			0,50		Allophanate hydrolase subunit 1	E
cg1141			0,46		Conserved hypothetical protein, UPF0271-family	R
cg1142	0,37		0,49		Putative Mn ²⁺ transporter, metal ion (Mn ²⁺ -iron) transporter (Nramp) family	P
cg1147	1,62			<i>ssul</i>	NAD(P)H-dependent FMN reductase	R

cg1150	0,40				Putative NADPH-dependent FMN reductase	R
cg1157			1,89	<i>glpX</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase II	G
cg1158	0,55		0,54		Putative secreted protein	
cg1171	1,78				Putative GTPase	J
cg1181			1,89		Glycosyltransferase, probably involved in cell wall biogenesis	M
cg1201	0,65				Hypothetical protein	
cg1203			1,94		Putative magnesium chelatase, ChII subunit	H
cg1228	1,53				ABC-type putative cobalt transporter, ATPase subunit	P
cg1236			2,27	<i>tpx</i>	Thiol peroxidase	O
cg1245	0,59				Putative membrane protein	S
cg1246	0,64				Conserved hypothetical protein	S
cg1247	0,55				Putative secreted protein	
cg1255			1,64		Conserved hypothetical protein, putative HNH endonuclease	
cg1263	0,65				Glycosyltransferase, involved in cell wall biogenesis	M
cg1265			0,60		Conserved hypothetical protein	
cg1271	4,32			<i>sigE</i>	RNA polymerase sigma factor, ECF-family	K
cg1277	2,68				Conserved putative membrane protein	
cg1278	2,15				Conserved putative secreted protein	
cg1279	2,69				Putative secreted protein	
cg1280	1,54		1,74	<i>odhA</i>	2-Oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	C
cg1283			1,68	<i>aroE2</i>	Putative shikimate/quininate 5-dehydrogenase	E
cg1284			1,54	<i>lipT</i>	Putative carboxylesterase, type B	I
cg1290		1,56		<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	E
cg1291		1,88	1,86		Putative membrane protein	
cg1293		1,56			Putative secreted protein	
cg1300			1,98	<i>cydB</i>	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	C
cg1301			1,70	<i>cydA</i>	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	C
cg1304	0,53				Putative secreted protein	
cg1307	0,43		1,97		DNA/RNA helicase, superfamily II	LKJ
cg1307	0,32				DNA/RNA helicase, superfamily II	LKJ

cg1314	2,21			<i>putP</i>	Putative Na ⁺ /proline symporter, solute:sodium symporter (SSS) family	ER
cg1324	2,08				Putative transcriptional regulator, MarR-family	K
cg1325	2,52				Conserved hypothetical protein	KT
cg1327	2,08				Putative transcriptional regulator, Crp-family	T
cg1330	0,66				Conserved hypothetical protein	S
cg1337	1,65			<i>hom</i>	Homoserine dehydrogenase	E
cg1338	1,53			<i>thrB</i>	Homoserine kinase	E
cg1341		0,56		<i>narI</i>	Respiratory nitrate reductase 2, gamma chain	C
cg1342		0,59		<i>narJ</i>	Respiratory nitrate reductase 2, delta chain	C
cg1343		0,65	0,47	<i>narH</i>	Respiratory nitrate reductase 2, beta chain	C
cg1344	0,58	0,54	0,41	<i>narG</i>	Respiratory nitrate reductase 2, alpha chain	C
cg1345		0,57	0,37	<i>narK</i>	Putative nitrate/nitrite permease, MFS-type	P
cg1346			0,58	<i>mog</i>	Putative molybdopterin biosynthesis protein Mog	H
cg1364			1,57	<i>atpF</i>	ATP synthase F0, B chain	C
cg1365			1,55	<i>atpH</i>	ATP synthase F1, delta subunit	C
cg1366			2,29	<i>atpA</i>	ATP synthase F1, alpha chain	C
cg1367	1,53		0,65	<i>atpG</i>	ATP synthase F1, gamma chain	C
cg1368	2,13			<i>atpD</i>	ATP synthase F1, beta chain	C
cg1370	0,62				Conserved hypothetical protein	
cg1373	2,36				Putative glyoxalase	E
cg1387			1,99	<i>fixB</i>	Putative electron transfer flavoprotein, alpha subunit	C
cg1391	1,67				Conserved hypothetical protein, related to capsule biosynthesis enzymes	R
cg1397			0,53	<i>trmU</i>	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	J
cg1409			1,52	<i>pfkA</i>	6-Phosphofructokinase	G
cg1417	1,62				Putative acetyltransferase	J
cg1419		0,66			Putative secondary Na ⁺ /bile acid symporter, bile acid:Na ⁺ symporter (BASS) family	R
cg1421	2,18				Conserved hypothetical protein, putative dinucleotide-binding enzyme	R

cg1421		0,64			Conserved hypothetical protein, putative dinucleotide-binding enzyme	R
cg1429			1,52		Putative membrane protein	S
cg1454	0,58				ABC-type putative aliphatic sulfonates transporter, substrate-binding lipoprotein	P
cg1458	1,69				Putative hydrolase, FAA-family	Q
cg1459	1,55				Putative SAM-dependent methyltransferase	QR
cg1478	1,80				Hypothetical protein	
cg1479	0,61			<i>glgP1</i>	Putative glycogen phosphorylase	G
cg1483	1,53				Putative membrane protein	R
cg1484			1,59		Putative secreted protein	
cg1511	0,58				Hypothetical protein	
cg1514	1,77		1,73		Putative secreted protein	M
cg1516			0,65		Hypothetical protein	
cg1517			0,55		Putative secreted protein	
cg1537			0,46	<i>ptsG</i>	Phosphotransferase system (PTS), glucose-specific enzyme IIBCA component	G
cg1542	0,64				Putative membrane protein	
cg1547	2,27			<i>ccpA1</i>	Putative transcriptional regulator, LacI-family	K
cg1564	0,65			<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L35	J
cg1565		0,63	0,63	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	J
cg1567			0,62		Hypothetical protein	
cg1580	1,74			<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	E
cg1586	1,57			<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	E
cg1606	1,55	0,47		<i>pyrG</i>	CTP synthetase	F
cg1607	1,52	0,58			Putative NTP pyrophosphohydrolase	LR
cg1613	1,85			<i>sseA2</i>	Rhodanese-related sulfurtransferase	P
cg1615	0,63				16S rRNA uridine-516 pseudouridylate synthase or related pseudouridylate synthase	J
cg1616	0,66		0,53	<i>cmk</i>	Cytidylate kinase	F
cg1617	0,59				GTPase of unknown function	R
cg1623			0,50		Putative divalent heavy-metal cation transporter	P
cg1624	1,75	1,56			Putative secondary Na ⁺ /H ⁺ antiporter, monovalent cation:proton antiporter-1 (CPA1) family	P

cg1626		1,69	2,39		Conserved hypothetical protein	S
cg1628			1,88		Putative hydrolase, alpha/beta superfamily	R
cg1630			1,54		Putative signal transduction protein, FHA -domain	T
cg1631	1,66		1,70		Putative transcriptional regulator, MerR-family	K
cg1635	2,00				Putative membrane protein	
cg1643	0,50		6,10	<i>gnd</i>	Phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	G
cg1646			1,62		ABC-type multidrug transport system, ATPase subunit	V
cg1649	1,59			<i>pctD</i>	ABC-type phosphate/phosphonate transporter, permease subunit (TC 3.A.1.9.1)	P
cg1650	2,05			<i>pctC</i>	ABC-type phosphate/phosphonate transporter, permease subunit (TC 3.A.1.9.1)	P
cg1651	3,21			<i>pctB</i>	ABC-type phosphate/phosphonate transporter, ATPase subunit (TC 3.A.1.9.1)	P
cg1652	5,80			<i>pctA</i>	ABC-type alkylphosphonate transporter, substrate-binding lipoprotein (TC 3.A.1.9.1)	P
cg1653	1,98			<i>pgp1</i>	Putative phosphoglycolate phosphatase	R
cg1662	2,20				Putative secreted protein	
cg1671	0,46		0,42		Putative membrane-associated GTPase	
cg1672			0,61	<i>ppmC</i>	Polyprenol-phosphate-mannose synthase domain 1	M
cg1684	1,71			<i>tatC</i>	Putative twin arginine targeting (Tat) Preprotein translocase subunit	U
cg1685	1,76			<i>tatX</i>	Putative twin arginine targeting (Tat) Preprotein translocase subunit	U
cg1693			1,75	<i>pepC</i>	Aspartyl aminopeptidase	E
cg1694	0,64			<i>recB</i>	Exonuclease, RecB-family	L
cg1707	0,53				Putative arsenate reductase (arsenical pump modifier)	T
cg1709		0,66		<i>mshC</i>	Putative 1-D-myo-inositol-2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside-L-cysteine ligase	J
cg1711		0,57			Putative oxidoreductase	C
cg1717	0,53				Putative membrane protein	
cg1718			2,27		Phospholipid-binding protein	R

cg1730			1,92		Putative secreted protease sub-unit, stomatin/prohibitin-like	O
cg1731	0,66				Membrane protein, implicated in regulation of membrane protease activity	OU
cg1737			2,03	<i>acn</i>	Aconitate hydratase	C
cg1739	1,82				Conserved hypothetical protein, containing a glutamine amidotransferase domain	F
cg1743	0,63				Conserved hypothetical protein	S
cg1759			2,82		Putative metal-sulfur cluster biosynthetic enzyme	R
cg1760	0,60		2,36		Protein involved in Fe-S cluster formation, NifU-family	C
cg1761	0,56	1,62	3,81	<i>nifS2</i>	Cysteine desulhydrase, AT class IV/selenocysteine lyase	E
cg1762	0,61		3,70	<i>sufC</i>	FeS assembly ATPase, SufC-family	O
cg1763	0,61	1,53	6,60	<i>sufD</i>	FeS assembly membrane protein, SufD-family	O
cg1764	0,64	1,76	2,43	<i>sufB</i>	FeS assembly membrane protein, SufB-family	O
cg1765	0,50	1,61	1,72		Putative regulator protein	K
cg1773			0,65	<i>ctaB</i>	Polyprenyltransferase, cytochrome oxidase assembly factor	H
cg1776	1,56			<i>tal</i>	Transaldolase	G
cg1783		0,30		<i>soxA'</i>	Putative oxidase, pseudogene (N-terminal fragment)	E
cg1784		0,51		<i>ocd</i>	Putative ornithine cyclodeaminase	E
cg1785	1,85	0,28		<i>amt</i>	Putative secondary ammonium transporter, Amt-family	P
cg1790	0,61			<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase	G
cg1792	0,54		0,60		Putative transcriptional regulator, WhiB-family	S
cg1801	1,88		0,59	<i>rpe</i>	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	G
cg1803	1,55			<i>fmt</i>	Methionyl-tRNA formyltransferase	J
cg1809	0,63				DNA-directed RNA polymerase subunit K/omega	K
cg1812	2,35		0,47	<i>pyrF</i>	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	F
cg1813	2,61			<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase, large chain	EF
cg1814	1,60		0,60	<i>carA</i>	Carbamoyl-phosphate synthase, small chain	EF
cg1815	1,65			<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	F
cg1817	0,58			<i>pyrR</i>	Conserved hypothetical protein	F

cg1833			1,61		ABC-type putative iron-siderophore transporter, ATPase subunit	P
cg1834	0,66				ABC-type putative iron-siderophore transporter, permease subunit	PH
cg1838			0,62	<i>alaS</i>	Alanyl-tRNA synthetase	J
cg1855	1,66			<i>hisS</i>	Histidyl-tRNA synthetase	J
cg1860	0,50		1,82		Putative membrane protein	
cg1873		1,66		<i>tesB2</i>	Acyl-CoA thioesterase II	I
cg1874	0,51				Putative membrane protein	
cg1875	1,61				Putative membrane protein	
cg1879	1,93				Putative HIT family hydrolase	FGR
cg1883		1,54			Putative secreted protein	S
cg1884	0,42				Putative membrane protein	R
cg1890	1,74	0,44	0,44		Hypothetical protein	
cg1891		0,49	0,28		Hypothetical protein	
cg1909	0,52				Hypothetical protein	
cg1911			0,66		Putative secreted protein	
cg1915	1,68				Hypothetical protein	
cg1921		0,64			Hypothetical protein	
cg1962			1,72		Putative membrane protein	
cg1966	0,64				Hypothetical protein	
cg1980	0,60				Hypothetical protein, MoxR-like ATPase	R
cg2015		0,65			Hypothetical protein	
cg2037	0,61				Conserved hypothetical protein	
cg2047	0,65				Putative secreted protein	
cg2052	0,55				Putative secreted protein	
cg2056	0,65				Putative membrane protein	
cg2057			1,70		Putative secreted protein	
cg2061	0,51		1,72	<i>psp3</i>	Putative secreted protein	
cg2066	0,65				Hypothetical protein, low-complexity protein	S
cg2079		0,64	0,57		Conserved hypothetical protein	S
cg2080			0,62		Conserved hypothetical protein	
cg2099	0,60				Putative membrane protein	
cg2102		1,80		<i>sigB</i>	RNA polymerase sigma factor rpoD (Sigma-A).	K
cg2103			1,61	<i>dtxR</i>	Putative transcriptional regulator, DtxR-family	K
cg2112	1,65				Putative transcriptional regulator, YbaD-family	K

cg2113	1,72				Hypothetical protein	
cg2114	1,53			<i>lexA</i>	Putative transcriptional regulator, LexA-family	KT
cg2115	1,64				Putative transcriptional regulator, DeoR-family	KG
cg2117			0,41	<i>ptsI</i>	Phosphotransferase system (PTS), Enzyme I	G
cg2118	0,48				Transcriptional regulator protein, DeoR-family	KG
cg2120	0,59			<i>ptsF</i>	Phosphotransferase system (PTS), fructose-specific enzyme IIABC component	G
cg2121			1,55	<i>ptsH</i>	Phosphotransferase system (PTS), phosphocarrier protein HPr	G
cg2124			0,53		Hypothetical protein	KT
cg2127	4,65				Hypothetical protein	
cg2136	0,61			<i>gluA</i>	ABC-type glutamate transporter, ATPase subunit (TC 3.A.1.3.9)	E
cg2141	1,58			<i>recA</i>	Recombinase A	L
cg2151			1,60		Conserved hypothetical protein, Similar to phage shock protein A	KT
cg2151			0,66		Conserved hypothetical protein, Similar to phage shock protein A	KT
cg2152			0,50		Putative transcriptional regulator, HTH_3-family	
cg2153	0,54		0,49		Conserved hypothetical protein, CinA-like protein	R
cg2160	0,57				Putative hydrolase of metallo-beta-lactamase superfamily	R
cg2163	1,84			<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinate reductase	E
cg2165	2,25				Putative secreted protein	
cg2167		0,40	0,56	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15.	J
cg2170	0,63			<i>truB</i>	Pseudouridylate synthase	J
cg2176	0,66		0,47	<i>infB</i>	Translation initiation factor 2 (GTPase)	J
cg2177			0,57		Predicted nucleic-acid-binding protein implicated in transcription termination	K
cg2178			0,64	<i>nusA</i>	Putative transcriptional termination/antitermination factor	K
cg2181	2,91	0,56			ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein	E
cg2182	1,91				ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, permease subunit	EP

cg2183	1,75				ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, permease subunit	EP
cg2185	1,53			<i>proS</i>	Prolyl-tRNA synthetase	J
cg2195			1,57		Putative secreted or membrane protein	
cg2196		1,57			Putative secreted or membrane protein	
cg2214			1,53		Putative Fe-S-cluster redox enzyme	R
cg2215			1,52		Putative membrane protein	
cg2222			0,52	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	J
cg2235			0,29	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	J
cg2253		0,65	0,49	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	J
cg2254	0,58		0,60		Putative ankyrin repeat containing protein	R
cg2260		0,28		<i>glnK</i>	Nitrogen regulatory protein PII	E
cg2263			1,56		Hypothetical protein	
cg2275	1,80				Putative F0/F1-type ATP synthase b subunit	D
cg2277	1,74				ABC-type multidrug/protein/lipid transporter, permease subunit and ATPase subunit	V
cg2280		0,36		<i>gdh</i>	Glutamate dehydrogenase (NADP(+))	E
cg2289			2,29	<i>glgP2</i>	Phosphorylase	G
cg2291			1,69	<i>pyk</i>	Pyruvate kinase	G
cg2307			0,59		Putative membrane protein	
cg2308	1,93				Putative secreted protein	
cg2318	0,65				ABC-type putative iron(III) dicitrate transporter, substrate-binding lipoprotein	P
cg2323			1,73	<i>treY</i>	(1->4)-Alpha-D-glucan 1-alpha-D-glucosylmutase	G
cg2334			0,58	<i>ilvA</i>	Threonine ammonia-lyase	E
cg2343	0,60				Putative decarboxylase	S
cg2361	0,60				Cell division initiation protein - Antigen 84 homolog	D
cg2376			1,63		Putative secreted protein	
cg2377			1,77	<i>mraW</i>	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase involved in cell envelope biogenesis	M
cg2378	0,52		0,45	<i>mraZ</i>	Putative MarZ protein	S
cg2380			0,47		Putative membrane protein	
cg2401	0,63				Secreted protein NLP/P60 family, putative peptidoglycan lytic protein	M

cg2402	0,18				Secreted protein NLP/P60 family	M
cg2403		2,57		<i>qcrB</i>	Cytochrome b	C
cg2405			2,23	<i>qcrC</i>	Cytochrome c1	C
cg2406		1,78		<i>ctaE</i>	Cytochrome c oxidase subunit 3	C
cg2409		2,16	1,61	<i>ctaC</i>	Cytochrome c oxidase subunit II	C
cg2411		1,55			Conserved hypothetical protein, HesB/YadR/YfhF family	S
cg2417			2,21		Putative short-chain type oxidoreductase	R
cg2418	1,61			<i>ilvE</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase, AT class III	EH
cg2428	0,55				Conserved putative membrane protein	
cg2429		0,38		<i>glnA</i>	Glutamate--ammonia ligase	E
cg2430	1,65				Hypothetical protein	
cg2434			1,85		Putative monooxygenase, luciferase	C
cg2437			1,57	<i>thrC</i>	Threonine synthase	E
cg2440			1,60		Putative sugar/metabolite permease, MFS-type	GEPR
cg2443	2,25				Permease of the major facilitator superfamily	
cg2444	4,40	1,57	1,79		Hypothetical protein	
cg2445			1,80	<i>hmuO</i>	Heme oxygenase (deacylizing)	P
cg2459		1,63		<i>ptpA</i>	Protein-tyrosine-phosphatase	T
cg2462	0,63				Putative transcriptional regulator, TetR-family	
cg2466	1,54			<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)	C
cg2467			0,62		ABC-type transporter, ATPase subunit	R
cg2468			0,61		ABC-type transporter, permease subunit	R
cg2470	1,61				ABC-type transporter, substrate-binding lipoprotein	R
cg2474			1,79	<i>nagD</i>	Putative phosphatase involved in N-acetylglucosamine metabolism	G
cg2475			1,56		ABC-type transporter, ATPase subunit with duplicated ATPase domain	S
cg2477	0,47				Conserved hypothetical protein	
cg2499			1,63	<i>glyS</i>	Glycine--tRNA ligase	J
cg2500			1,76		Putative transcriptional regulator, ArsR-family	K
cg2502			1,64	<i>fur</i>	Putative transcriptional regulator, FUR-family	P

cg2513			1,56	<i>phoH2</i>	Phosphate starvation-inducible protein, PhoH-like	T
cg2518	0,55				Putative secreted protein	
cg2531		0,63		<i>idi</i>	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	I
cg2533		0,65			Conserved hypothetical protein	
cg2535	1,87				Putative secreted protein	
cg2536			1,78	<i>aecD</i>	Beta C-S lyase, AT class I	E
cg2537			1,76	<i>brnQ</i>	Putative secondary branched-chain amino acid exporter, branched chain amino acid:cation symporter (LIVCS) family	E
cg2549	0,59				ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein	E
cg2564	0,44				Hypothetical protein	
cg2567	0,63		1,52		Hypothetical protein	
cg2573		0,47	0,30	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	J
cg2594		0,65		<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	J
cg2595		0,58	0,64	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	J
cg2610		0,62			ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein	E
cg2613	3,06		2,01	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	C
cg2614			1,75		Putative transcriptional regulator, TetR-family	
cg2630	0,62			<i>pcaG</i>	Protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit	Q
cg2644	2,14	1,83	2,93	<i>clpP2</i>	Endopeptidase Clp, proteolytic subunit	OU
cg2645	2,10	2,02		<i>clpP1</i>	Endopeptidase Clp, proteolytic subunit	OU
cg2651	0,60				Conserved hypothetical protein, putative pseudogen	
cg2657	2,68				Putative membrane protein, putative pseudogen	
cg2662			1,91	<i>pepN</i>	Membrane alanyl aminopeptidase	E
cg2670		0,65		<i>crtI'</i>	Putative phytoene dehydrogenase, putative pseudogen (N-terminal fragment)	Q
cg2674	0,50		2,93		Alkylhydroperoxidase, AhpD-family core domain	S
cg2675	0,37		2,47		ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, ATPase subunit	R
cg2678			1,75		ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein	E

cg2686	1,79				Putative transcriptional regulator, TetR-family	
cg2687	1,54			<i>metB</i>	Cystathionine gamma-synthase	E
cg2695	1,97				ABC-type transporter, ATPase subunit	R
cg2704			0,35		ABC-type putative sugar transporter, permease subunit	G
cg2705			0,44	<i>amyE</i>	ABC-type putative sugar transporter, substrate-binding lipoprotein	G
cg2707	2,51		0,40		Conserved hypothetical protein	
cg2708	4,34		0,37	<i>msiK1</i>	ABC-type putative sugar transporter, ATPase subunit	G
cg2732		1,86	2,41	<i>gntV</i>	Gluconokinase	G
cg2770	1,56				Conserved hypothetical protein	
cg2792	1,79			<i>nadE</i>	NAD(+) synthase (glutamine-hydrolyzing)	H
cg2794	2,95				Conserved hypothetical protein	
cg2796	0,10		1,93		Conserved hypothetical protein, MMGE/PRPD-family, putative involved in propionate catabolism	R
cg2797	0,06				Conserved hypothetical protein	S
cg2800	1,79			<i>pgm</i>	Phosphoglucomutase	G
cg2805			0,64	<i>psp4</i>	Putative secreted protein	
cg2810			2,91		Putative secondary H ⁺ /Na ⁺ :glutamate/dicarboxylate symporter, dicarboxylate/amino acid:cation symporter (DAACS) family	C
cg2811			1,58		ABC-type lipoprotein release transporter, permease subunit	V
cg2833			6,77	<i>cysK</i>	O-Acetylserine (Thiol)-Lyase	E
cg2835	0,62				Putative acetyltransferase	R
cg2837	2,02			<i>sucC</i>	Succinate--CoA ligase (ADP-forming), beta subunit	C
cg2838	1,95				Putative dithiol-disulfide isomerase	Q
cg2840			0,55	<i>actA</i>	Putative coenzyme A transferase	C
cg2842	0,56		0,65	<i>phoU</i>	Phosphate transport system protein PhoU, putative phosphate uptake regulator	P
cg2846	2,83	3,59	1,58	<i>pstS</i>	ABC-type putative phosphate transporter, substrate-binding lipoprotein (TC 3.A.1.7.1)	P
cg2850			1,79		Conserved hypothetical protein	
cg2862	1,55			<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit	F
cg2863	1,93			<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit	F

cg2865	2,03			<i>purS</i>	Phosphoribosylformylglycina- midine synthase subunit	F
cg2873			1,63	<i>ptrB</i>	Oligopeptidase B	E
cg2875	0,53				Hypothetical protein	
cg2880	1,70				Putative hydrolase, HIT-family	FGR
cg2888	4,40			<i>cgtR3</i>	Two-component system, transcrip- tional response regulator	TK
cg2891			1,65	<i>pqo</i>	Pyruvate:quinone oxidoreductase	EH
cg2893	1,56				Putative multidrug efflux per- mease, MFS-type	GEPR
cg2902	1,68				Conserved hypothetical protein, hydrolases of the HAD superfamily	R
cg2909	0,66			<i>otsB</i>	Trehalose phosphatase	G
cg2911	0,48				ABC-type putative Mn/Zn trans- porter, substrate-binding lipopro- tein	P
cg2924			0,65	<i>cysS</i>	Cysteine--tRNA ligase	J
cg2925	0,47		0,55	<i>ptsS</i>	Phosphotransferase system (PTS), sucrose-specific enzyme IIBC component	G
cg2939	1,83				ABC-type putative dipep- tide/oligopeptide transporter, ATPase subunit	EP
cg2942		0,58			Putative transcriptional regulator, AsnC-family	K
cg2943		1,59			Putative membrane protein	
cg2949	1,55				Putative secreted protein	
cg2956			0,65		Putative secreted protein	
cg2958			2,08	<i>butA</i>	L-2,3-Butanediol dehydrogena- se/acetoin reductase	QR
cg2963		2,22		<i>clpC</i>	Putative ATP-dependent protease (heat shock protein)	O
cg2969			1,55		Hypothetical protein, similar to acyl-CoA synthetases (AMP- forming)/AMP-acid ligases	
cg2977		0,54			Putative membrane protein	
cg3000	0,36				Putative thiosulfate sulfurtrans- ferase	P
cg3007	0,50				Conserved hypothetical protein	S
cg3008		1,64	1,70	<i>porA</i>	Porin	
cg3009			2,49	<i>porH</i>	Porin, cation-specific	
cg3021			1,62		Putative peptidase M20/M25/M40 family	E
cg3043	2,01				Putative NTP pyrophospho- hydrolase/oxidative damage repair enzyme	LR
cg3048	0,59			<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	C

cg3049	1,69			<i>fpr1</i>	Ferredoxin--NADP(+) reductase	ER
cg3058		0,57	0,40	<i>tnp8b(l SCg8a)</i>	Transposase	
cg3068	1,79			<i>fda</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	G
cg3078	1,52				Hypothetical protein	
cg3079	1,89			<i>clpB</i>	Putative ATP-dependent protease (heat shock protein)	O
cg3097	2,17			<i>hspR</i>	Putative transcriptional regulator, MerR-family	K
cg3099	1,82		1,86	<i>grpE</i>	Chaperone GrpE, heat shock protein	O
cg3100		0,56	2,76	<i>dnaK</i>	Chaperone DnaK, heat shock protein	O
cg3107	1,70			<i>adhA</i>	Alcohol dehydrogenase	R
cg3112			2,06	<i>cysZ</i>	Sulfate permease	R
cg3113			2,96	<i>cysY</i>	Sirohydrochlorin ferrochelata- se	S
cg3114			2,90	<i>cysN</i>	Sulfate adenyltransferase sub- unit 1	P
cg3115			2,54	<i>cysD</i>	Sulfate adenyltransferase sub- unit 2	EH
cg3116			2,55	<i>cysH</i>	Adenosine phosphosulfate reduc- tase	EH
cg3118			3,48	<i>cysI</i>	Ferredoxin-sulfite reductase	P
cg3119			2,36	<i>fpr2</i>	Ferredoxin--NADP(+) reductase	ER
cg3120			1,62		Conserved hypothetical protein	S
cg3138	1,64				Putative membrane protease subunit, stomatin/prohibitin ho- molog	O
cg3140		0,13	0,35	<i>tagA1</i>	DNA-3-methyladenine glycosylase I	L
cg3141	1,54	0,19	0,46		Hypothetical protein	C
cg3142	2,33				Putative membrane protein	
cg3143	1,87				Conserved putative secreted protein	R
cg3156	1,73				Putative secreted protein	
cg3157			1,55		Putative secreted protein	V
cg3159	1,57				Putative universal stress protein UspA or related nucleotide-binding protein	T
cg3169	1,86		1,91	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvate car- boxykinase (GTP)	C
cg3175			0,50		Putative membrane protein	S
cg3179	0,64			<i>fadD2</i>	Putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase	IQ
cg3186	0,57			<i>cmt2</i>	Trehalose corynomycolyl trans- ferase	R

cg3192			2,16		Putative secreted or membrane protein	
cg3193			1,96		Putative membrane-associated phospholipid phosphatase	I
cg3195	2,09				Putative flavin-containing monooxygenase	P
cg3196			0,60	<i>glf</i>	UDP-galactopyranose mutase	M
cg3197			0,63	<i>psp5</i>	Putative secreted protein	
cg3200	2,02				Putative acyltransferase family	I
cg3201	1,74			<i>serS</i>	Serine--tRNA ligase	J
cg3202	4,03				Putative transcriptional regulator, GntR-family	K
cg3211	7,30				Putative secreted protein	
cg3212	1,88				Putative carboxymuconolactone decarboxylase subunit	S
cg3213	2,82				Putative secreted protein	
cg3218			1,94		Pyruvate kinase	G
cg3219	1,91	1,71		<i>ldh</i>	L-Lactate dehydrogenase	C
cg3223			1,54		Conserved hypothetical protein, putative FMN reductase	R
cg3226			0,56		Putative MFS-type L-lactate permease	
cg3227	2,25		0,56	<i>lldA</i>	Quinone dependent L-lactate dehydrogenase	C
cg3231		0,59			Hypothetical protein	
cg3233	1,72				Hypothetical protein	S
cg3234	1,81				Putative metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase	R
cg3236	2,14	1,83		<i>msrA</i>	Protein-methionine-S-oxide reductase	O
cg3237		1,68	2,57	<i>sod</i>	Superoxide dismutase	P
cg3240		2,25	3,44		Putative multidrug efflux permease, MFS-type	
cg3253	1,56			<i>mcbR</i>	Global transcriptional repressor of sulfur metabolism, TetR-family	
cg3254	0,58				Putative membrane protein	S
cg3255	7,35	1,64		<i>uspA3</i>	Universal stress protein E	T
cg3264	1,72				Conserved hypothetical protein	KT
cg3265			1,60		Hypothetical protein	
cg3272			0,57		Putative membrane protein	S
cg3275	1,66			<i>fdxA</i>	Putative ferredoxin	C
cg3277			0,64		Hypothetical protein, containing double-stranded beta-helix domain	S
cg3282	2,30				Putative Cu ²⁺ transporting P-type ATPase	P

cg3292			0,56		Putative heavy-metal ion transporting P-type ATPase	P
cg3300			0,52		Putative Cu ²⁺ transporting P-type ATPase	P
cg3301			0,63		Putative sugar/metabolite permease, MFS-type	
cg3303			0,43		Putative transcriptional regulator, PadR-family	K
cg3304	1,78			<i>dnaB</i>	Putative replicative DNA helicase	L
cg3306		0,54	0,41	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	J
cg3307		0,34	0,42	<i>ssb</i>	Single-strand binding protein	L
cg3308	1,53	0,63		<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	J
cg3315	0,45		2,20		Putative transcriptional regulator, MarR-family	K
cg3316	0,46		2,05		Putative universal stress protein or related nucleotide-binding protein	T
cg3317	1,69				Putative membrane protein	
cg3319	2,46				Conserved hypothetical protein	R
cg3323	3,69				Inositol-3-phosphate synthase	I
cg3327		2,94	2,89	<i>dps</i>	Putative starvation-induced DNA protecting protein	P
cg3337	1,79				Putative membrane protein	V
cg3338	3,33				Putative membrane protein	V
cg3340			1,64	<i>dadA</i>	D-Amino-acid dehydrogenase	E
cg3343	2,16		1,67		Putative secreted membrane protein	
cg3344	2,29				Putative nitroreductase	C
cg3346	2,08			<i>leuS</i>	Leucine--tRNA ligase	J
cg3357			0,47	<i>trpP</i>	Permease, tryptophan-specific	
cg3359		0,62		<i>trpE</i>	Anthranilate synthase subunit I	EH
cg3359			0,39	<i>trpE</i>	Anthranilate synthase subunit I	EH
cg3369	2,08			<i>qcrA2</i>	Putative rieske iron-sulfur protein	PR
cg3370		0,58			Putative NADH-dependent flavin oxidoreductase	C
cg3380	0,61				Putative oxidoreductase protein	
cg3423	1,68			<i>trxC</i>	Thioredoxin	OC
cg3432	0,48			<i>rpmH</i>	50S ribosomal protein L34	J

Pivot-Tabelle der Mikroarrayhybridisierungen. Die relativen Expressionsergebnisse sind in den Spalten der jeweiligen Versuche angegeben. Eine leere Zelle bedeutet, dass in dem entsprechenden Versuch keine signifikante Veränderung zu messen war. (a) CDS nach Kalinowski *et al.*, 2003; (b) COG nach Tatusov *et al.*, 2003.

Tabelle VII.2

Für die LightCycler® Messungen verwendete Primer:

Gen	Primer1	Primer2
<i>hisA</i>	ACTGAAGTGGCAGGAGCAGG	CCACCAGATGCCACGATAGG
<i>hisB</i>	CATCACCGTCGAGATCAACC	GAGGATCCATCTCTACGGCA
<i>hisC</i>	AAGATCGCCACCGAGCTGAA	CTAGCATCACGGCGTTCGATA
<i>hisD</i>	ACAAGCACGATGCCACTCTG	GCTCAAGAGGCTGGTGTGAA
<i>hisE</i>	ATCGAAGCCGGAGAG	GCCAGCCAACCATGAGAC
<i>hisF</i>	GGCACCATGCTGGATGTTGT	AATGGTCGCGGCAAGCACTG
<i>hisG</i>	TATCGCCATCTACGTTGCTG	TCGCGGTCGACGTTGTAATC
<i>hisH</i>	CGTGAGCTTCCGATCCAGAAG	TGCGCCTGCGTCACCTGATT
<i>hisI</i>	CAACGAGGTCCTCATGATGG	TTCACGGTCAGAAGGACGGT
<i>serA</i>	ACTGCTCGTGCGTTCTGCTA	ACGGCTCATCAGCTCATCCA
<i>serB</i>	AGGTGTGACTGCCGCGTTCT	GCCGCCAGCATCTCAATGAC
<i>serC</i>	CATCCGTCATCGGTACCTCA	CCAGCATCAGCAAGGTAGCA
<i>sigB</i>	GAAGCCACCAATGAGGAACT	GTGGCCTCAGAATCCTCAAT
<i>rplK</i>	GAGCATCCGGACGGTACTA	GAGCCACTAACCGGTGTGAA

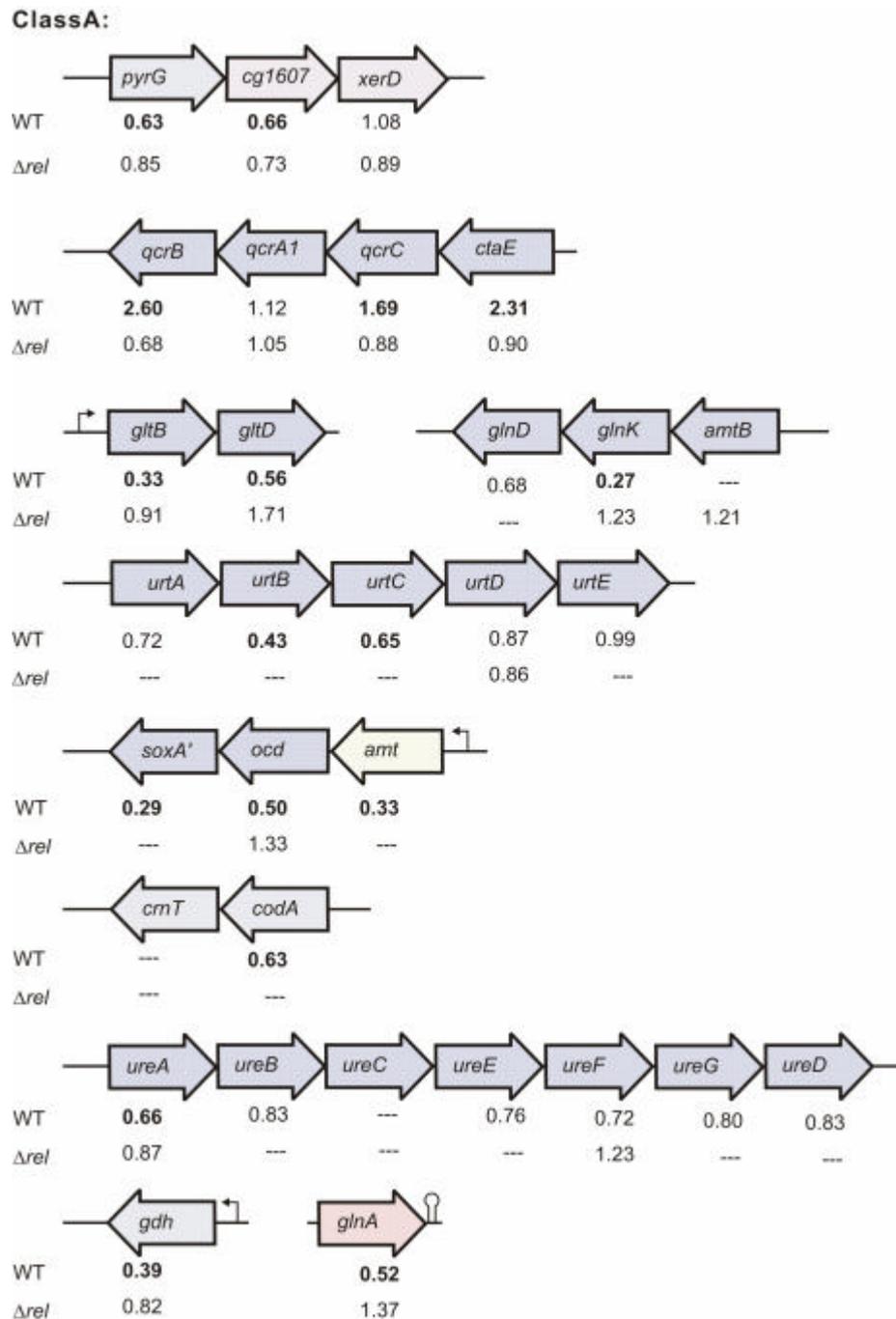
Messdaten LightCycler®

Gen	t ₀	t ₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₂₀	t ₂₅
<i>hisA</i>	19,73	18,87	18,10	18,22	18,59	19,38
<i>hisB</i>	28,85	29,50	27,83	27,88	29,10	29,02
<i>hisC</i>	29,51	29,67	27,49	27,80	28,57	29,54
<i>hisD</i>	22,76	28,96	26,94	26,67	27,47	28,22
<i>hisE</i>	19,29	18,85	18,42	18,60	18,70	19,38
<i>hisF</i>	23,09	22,93	21,41	21,36	21,94	22,92
<i>hisG</i>	21,03	21,64	18,98	18,95	18,99	21,27
<i>hisH</i>	33,46	31,97	31,57	31,97	32,35	33,55
<i>hisI</i>	18,92	18,09	17,96	18,12	18,09	18,79
<i>serA</i>	23,03	21,26	20,03	20,06	20,49	21,78
<i>serB</i>	23,02	21,51	21,04	21,54	21,88	22,96
<i>serC</i>	27,01	26,82	25,32	25,62	26,26	27,23

	t ₀ (rel ⁺)	t ₁₀ (rel ⁺)	t ₀ (rel ⁻)	t ₁₀ (rel ⁻)
<i>hisB</i>	31,11	28,26	23,63	23,83
<i>hisC</i>	35,30	34,57	29,76	29,66
<i>sigB</i>	18,34	16,40	17,54	17,19
<i>rplK</i>	28,77	30,88	20,11	20,66

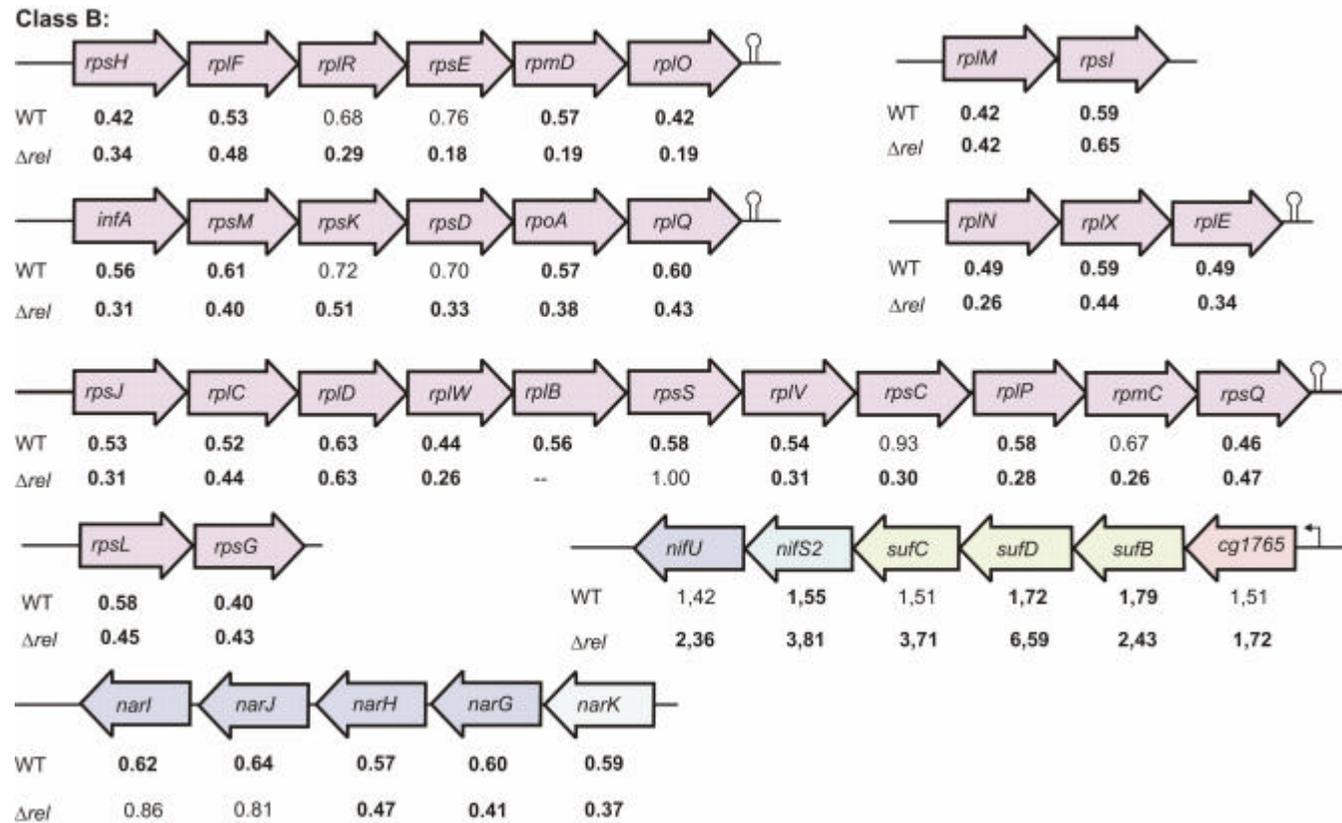
Crossing-points der LightCycler® Messungen für die zeitaufgelöste Analyse der Histidin- und Serinbiosynthesegene (IV.3.1) sowie der *rel*-Abhängigkeit ihrer Expression (IV.3.2).

Abbildung VII.1



Putative Operons der Klasse A. Für jedes Experiment mit dem *C. glutamicum* RES 167 und der Δrel -Mutante sind die relativen Expressionsraten angegeben. Fett gedruckte Werte stellen signifikante Änderungen in der Transkription dar. Bekannte Transkriptionsstartpunkte sind mit Pfeilen und Rho-unabhängige Terminatoren durch Hairpins gekennzeichnet.

Abbildung VII.2



Putative Operons der Klasse B. Für jedes Experiment mit dem *C. glutamicum* RES 167 und der Δrel -Mutante sind die relativen Expressionsraten angegeben. Fett gedruckte Werte stellen signifikante Änderungen in der Transkription dar. Bekannte Transkriptionsstartpunkte sind mit Pfeilen und Rho-unabhängige Terminatoren durch Hairpins gekennzeichnet.

Die wesentlichen Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation veröffentlicht worden:

Brockmann-Gretza, O., Kalinowski J. (2006). Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in the presence and absence of the *rel* gene encoding (p)ppGpp synthase. *BMC Genomics* **7**: 230

Weitere Publikationen:

Tauch A., Homann I., Mormann S., Rüberg S., Billault A., Bathe B., Brand S., **Brockmann-Gretza O.**, Rückert C., Schischka N., Wrenger C., Hoheisel J., Möckel B., Huthmacher K., Pfefferle W., Kalinowski J. (2002). Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J. Biotechnol.* **95**: 25-38.

Wehmeier L., **Brockmann-Gretza O.**, Pisabarro A., Tauch A., Pühler A., Martin J. F., Kalinowski J. (2001). A *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 mutant with a defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p)ppGpp accumulation upon amino acid starvation. *Microbiology*. 2001, **147**: 691-700.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler, für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit diese an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten, bedanken.

Herrn Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der „Coryne“-Gruppe, die stets hilfsbereit waren und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich danke Ihnen ganz besonders für die vielen schönen Stunden in Labor, Kaffeeraum und die vielen geselligen Momente.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde, die mir über so viele Jahre zur Seite standen.

Mein grösster Dank geht an meine Eltern, die mich die ganze Zeit über unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht vollendet worden wäre.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und nur angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Zitate sind als solche kenntlich gemacht.

Die Anfertigung dieser Dissertation erfolgte unter der Betreuung von Prof. Dr. Alfred Pühler am Lehrstuhl für Genetik der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den 12.12.2006

(Olaf Brockmann-Gretza)

(Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ISO 9706)

