

**Charakterisierung**  
**der Regulation des Prolinbiosyntheseweges**  
**in *Corynebacterium glutamicum***

**Inaugural-Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades**  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Oliver Alexander Ley**  
aus Bergisch-Gladbach

Köln, Februar 2005



1. Referent: Herr Prof. Dr. R. Krämer,  
Lehrstuhl für Biochemie der Universität zu Köln
2. Referent: Frau Prof. Dr. K. Schnetz,  
Lehrstuhl für Genetik der Universität zu Köln

Tag der Disputation: 3. Februar 2005

### Zusammenfassung

*Corynebacterium glutamicum* akkumuliert zum Schutz vor hyperosmotischem Stress kompatible Solute. Die bevorzugte osmoprotektive Substanz, die durch *de-novo*-Synthese akkumuliert wird, ist Prolin. Wird die Synthese von Prolin durch die Deletion von Genen des Prolinbiosyntheseweges verhindert, so synthetisiert *C. glutamicum* stattdessen Glutamin. Der Ersatz von Prolin durch Glutamin erlaubt dem Bakterium zwar auch eine Akklimation an hohe Osmolalitäten, die Wachstumsgeschwindigkeit, die bei der Akkumulation von Prolin als kompatibelem Solut gemessen werden kann, wird aber nicht erreicht.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Expressionskontrolle der Gene *proA*, *proB* und *proC* für den Aufbau eines hohen internen Prolinpools essentiell ist. Eine biochemische Aktivierung der kodierten Enzyme scheint nur in geringem Maße stattzufinden. Die Steigerung der Expression wird in Abhängigkeit von der externen Osmolalität reguliert und basiert auf einer *de-novo*-Synthese der mRNA. Durch unabhängig voneinander durchgeführte *real-time*-PCR und DNA-Microarray-Analysen konnten vergleichbare Faktoren für die Expressionssteigerung der Gene *proA*, *proB* und *proC* bestimmt werden. Mittels dieser Experimente konnte außerdem die Induktion von *proC* als Hauptregulationspunkt für die Einstellung der Prolinsyntheseleistung identifiziert werden. Bei der Untersuchung der Transkriptionskontrolle der drei Gene konnte die Beteiligung von alternativen Sigmafaktoren, zwei-Komponenten Systemen, veränderter mRNA-Stabilität und die stringente Kontrolle ausgeschlossen werden. Auch individuelle Transkriptionsfaktoren, die in der Promotorregion der Gene binden, konnten nicht identifiziert werden. Als möglicher Regulationsmechanismus sollte eine veränderte Aktivität der RNA-Polymerase in Betracht gezogen werden.

Der interne Prolinpool wird in *C. glutamicum* durch die Synthese und den Export von Prolin eingestellt, da ein Abbau von Prolin nicht möglich ist. Durch einen Prolinpuls bei einer konstanten Osmolalität konnte außerdem gezeigt werden, dass die Transkription von Transportsystemen (ProP und PutP), die Prolin aufnehmen, reprimiert wird. Übereinstimmend war auch nur eine transiente Aufnahme von Prolin zu beobachten. Transportsysteme für andere kompatible Solute wie BetP unterlagen dieser Regulation nicht. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass *C. glutamicum* Prolin nicht als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle verwenden kann, und die Akkumulation in der Zelle nur der Osmoprotektion dient.

**Abstract**

The Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* accumulates compatible solutes in response to osmotic stress. Proline is the preferred osmoprotective substance which is accumulated by *de-novo* synthesis. The deletion of the proline biosynthesis genes *proA* or *proC* showed that *C. glutamicum* can partly replace proline by the accumulation of glutamine. The impaired bacterial growth of the deletion strains under hyperosmotic conditions indicated that proline accumulation is important but not essential for osmoadaptation.

It could be demonstrated that the induction of *pro*-gene expression is essential for the accumulation of high internal concentrations of proline. Nevertheless a slight increase in enzyme activity was detectable. The expression of the proline biosynthesis genes was studied by means of northern-blot hybridisations and showed an upregulation depending on the external osmolality. Using the two different approaches real-time-PCR and DNA-microarray-analysis the induction of *pro*-gene expression could be quantified. The prolonged induction of *proC* showed the importance of this gene for proline synthesis. The mechanism regulating the transcription of *pro*-genes is still unknown. It could be demonstrated that the transcription is independent of two-component systems, alternative sigma factors, stringent control and mRNA-stability. Furthermore no individual transcription factor of *pro*-gene transcription could be identified. A changed activity of the RNA polymerase under hyperosmotic conditions should be considered as possible regulatory mechanism.

The internal pool of proline is controlled by the synthesis and the export of proline. A degradation of proline was not observed in *C. glutamicum*. Furthermore genes for proline uptake systems (ProP and PutP) are repressed by externally added proline in case of isoosmotic conditions. Genes encoding uptake systems for other compatible solutes e.g. BetP are not affected by this regulation. Proline cannot be used as carbon or nitrogen source. The major purpose of proline uptake in *C. glutamicum* is osmoprotection.

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	1
1.2 Osmotisches Potential und Zellturgor.....	1
1.3 Osmostress und Adaptation.....	2
1.4 Synthese von Prolin.....	5
1.5 Abbau von Prolin.....	8
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	9
II. Material und Methoden.....	10
2.1 Primer, Plasmide und Stämme .....	10
2.1.1 Stämme.....	10
2.1.2 Primer.....	12
2.1.3 Plasmide.....	13
2.1.4 Genomdatenbanken.....	15
2.2 Chemikalien.....	15
2.3 Nährmedien.....	15
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen, DNA-Transfer und Mutagenese.....	17
2.4.1.1 Anzucht kompetenter <i>E. coli</i> -DH5 $\alpha$ mcr-Zellen.....	17
2.4.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> -DH5 $\alpha$ mcr.....	17
2.4.1.3 Anzucht kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	18
2.4.1.4 Elektroporation von kompetenten <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	18
2.4.1.5 Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -Deletionsmutanten.....	19
2.4.1.6 Überexpression von Proteinen in <i>C. glutamiicum</i> .....	19
2.4.2 DNA-Arbeiten.....	20
2.4.2.1 Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	20
2.4.2.2 Gelelektrophorese und Gelextraktion .....	20
2.4.2.3 Restriktionsverdau.....	20
2.4.2.4 Klonierung von DNA.....	20
2.4.2.5 PCR Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.4.2.6 Sequenzierung .....	21
2.4.3 RNA-Arbeiten.....	21
2.4.3.1 RNA-Präparation.....	22

2.4.3.2	Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden.....	22
2.4.3.3	RNA-Hybridisierungen.....	24
2.4.3.4	Northern Blot-Analysen.....	24
2.4.3.5	Wasch- und Detektionsschritte, RNA-Hybridisierungen und Northern Blot.....	25
2.4.3.6	RNase-freier DNase-Verdau.....	27
2.4.3.7	Quantitative <i>real-time</i> -PCR.....	27
2.4.4	DNA-Microarrays.....	28
2.5	Biochemische Methoden.....	30
2.5.1	Untersuchung der internen Aminosäurekonzentrationen .	30
2.5.2	DNA-Affinitätsreinigung.....	32
2.5.3	SDS-Gelelektrophorese und Analyse prominenter Proteinbanden.....	35
2.5.4	Messung von Osmolalitäten.....	36
III.	Ergebnisse.....	37
3.1	Akkumulation interner Aminosäuren unter Osmostress.....	37
3.1.1	Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg im Wildtyp.....	37
3.1.2	Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in 13032 $\Delta$ <i>proA</i> .....	38
3.1.3	Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in 13032 $\Delta$ <i>proC</i> .....	39
3.2	Charakterisierung der Transkription von <i>proA</i> , <i>proB</i> , und <i>proC</i> .....	41
3.2.1	Auswirkung verschiedener Schockstärken auf die Transkription von <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> .....	41
3.2.2	Regulation der Gene <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> nach einem <i>downshock</i> .....	42
3.3	<i>Real-time</i> -PCR Analysen.....	43
3.3.1	Bestimmung der PCR-Effizienzen .....	44
3.3.2	Relative Veränderung der Transkriptmenge nach einem hyperosmotischen Schock.....	45
3.3.3	Vergleich der Transkriptmenge bei osmotisch adaptierten Zellen.....	46
3.4	Hemmung der Prolinakkumulation durch Chloramphenicol.....	47
3.5	Mögliche Wege der Transkriptionsregulation von <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> .....	49
3.5.1	Regulation der Gene <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> durch alternative Sigmafaktoren.....	49
3.5.2	Suche nach Transkriptionsfaktoren für <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> .....	52

3.5.2.1	Die Funktion von <i>orf2014</i> .....	56
3.5.2.2	Die Funktion von <i>orf1175</i> .....	57
3.5.3	Regulation von <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> über stringente Kontrolle.....	59
3.5.4	Titration von Transkriptionsfaktoren durch Erhöhung der Promotorkopienzahl .....	61
3.5.5	RNA-Stabilität in Abhängigkeit von der Osmolalität.....	62
3.6	Prolinabbau.....	63
3.6.1	Regulation von <i>orf486</i> im Wildtyp und in <i>13032Δorf486</i> .....	64
3.6.2	Regulation von <i>putP</i> im Wildtyp und in <i>13032Δorf486</i> .....	65
3.6.3	Vergleich der internen und externen Prolinkonzentration in Wildtyp und in <i>13032Δorf486</i> .....	66
3.7	Genregulation und Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Prolin- / Leucinpuls.....	69
3.7.1	Akkumulation interner Aminosäuren nach Prolin- / Leucinpuls.....	70
3.7.2	Regulation von <i>proP</i> .....	73
3.7.3	Regulation von <i>betP</i> .....	74
3.8	Veränderungen im Transkriptom von <i>C. glutamicum</i> bei hyperosmotischem Stress..	75
IV.	Diskussion.....	83
4.1	Bedeutung der Prolinakkumulation in <i>C. glutamicum</i> bei hyperosmotischem Stress.	83
4.2	Charakterisierung der Transkription von <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> .....	85
4.3	Wie wird die Transkriptionsregulation von <i>proA</i> , <i>proB</i> und <i>proC</i> erreicht?.....	87
4.4	Abbau und Kontrolle des internen Prolinpools in <i>C. glutamicum</i> .....	91
4.5	Regulation von <i>proP</i> und <i>betP</i> durch externes Prolin.....	95
4.6	Globale Veränderungen im Transkriptom von <i>C. glutamicum</i> nach hyperosmotischem Stress.....	97
V.	Zusammenfassung.....	100
VI.	Literaturverzeichnis .....	101
VII.	Anhang:.....	111



**Abkürzungen :**

Amp <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
ddNTP's	Didesoxynucleosidtriphosphate
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynucleosidtriphosphate
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kb	Kilobasen
Km <sup>R</sup>	Kanamycin Resistenz
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
N-Quelle	Stickstoffquelle
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
T <sub>i</sub>	Zeitpunkt i
TS	Transkriptionsstart



## I. Einleitung

### 1.1 *Corynebacterium glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum* ist ein Gram-positives, keulenförmiges Bodenbakterium mit hohem GC-Gehalt, das zur Gruppe der Actinomyceten gehört. Es wurde unter dem Namen *Micrococcus glutamicus* erstmals 1957 von Kinoshita beschrieben. Subspezies sind *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum* und *Brevibacterium lactofermentum* (Liebl *et al.*, 1991). *C. glutamicum* erhielt seinen Namen zum einen durch seine keulenförmige Gestalt und zum anderen durch die Fähigkeit, Glutamat auszuschcheiden. Diese Fähigkeit wird industriell zur Produktion von Aminosäuren genutzt. Mit optimierten Produktions-Stämmen werden auf diesem Weg jährlich große Mengen an L-Glutamat und L-Lysin hergestellt (Kiss *et al.*, 1992; Leuchtenberger *et al.*, 1996).

### 1.2 Osmotisches Potential und Zellurgor

Das osmotische Potential ist ein Teilaspekt des Wasserpotentials ( $\psi_w$ ). Das Wasserpotential wird von drei Faktoren bestimmt und gibt die freie Energie (Enthalpie) des Wassers bezogen auf eine Volumeneinheit an. Die drei Faktoren sind Konzentration von Soluten ( $\psi_s$ ), Druck ( $\psi_p$ ) und Schwerkraft ( $\psi_G$ ).

$$\psi_w = \psi_s + \psi_p + \psi_G$$

Osmotisch wirksame Substanzen in einer Lösung setzen das osmotische Potential ( $\psi_s$ ) durch "Verdünnung" des Wassers herab. Die Maßeinheit hierfür ist die Osmolalität, die die Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen in einem Kilogramm Lösungsmittel angibt (osm/kg).

$$\psi_s = -RT \ln \sum a$$

R = Gaskonstante (8,32 J mol K), T = absolute Temperatur (K), a = Aktivitäten der gelösten Stoffe

In Mikroorganismen ist durch die hohe Konzentration von osmotisch wirksamen Substanzen im Cytoplasma das Wasserpotential ( $\psi_w$ ) geringer als in ihrer Umgebung. Dieser Konzentrationsgradient würde normalerweise durch die Diffusion der Makromoleküle ausgeglichen werden (Fick'sches Gesetz), was aber durch die semipermeable Zellmembran verhindert wird. Nur Wasser kann zum Ausgleich des osmotischen Potentials ( $\psi_s$ ) über

Membran in die Zelle fließen (Osmose). Dadurch entsteht in der Zelle ein hydrostatischer Druck ( $\psi_P$ ), der solange ansteigt, bis er mit dem Wanddruck im Gleichgewicht ist. Dieser hydrostatische Druck wird Zellturgor genannt, er presst die Zellmembran an die Zellwand. Bei Gram-negativen Bakterien erreicht dieser Turgor einen Druck von 3 bis 5 bar (Csonka *et al.*, 1996) und bei Gram-positiven Bakterien einen Druck um 20 bar (Whatmore *et al.*, 1990). Ändert sich das externe osmotische Potential ( $\psi_S$ ), so entsteht für einen Mikroorganismus eine Stresssituation, da das ausbalancierte Gleichgewicht zwischen osmotischem Potential und hydrostatischem Druck verloren geht. Eine Verringerung des externen  $\psi_S$  erzeugt hyperosmotischen Stress und eine Erhöhung des externen  $\psi_S$  führt zu hypoosmotischem Stress.

### 1.3 Osmostress und Adaptation

Werden Mikroorganismen hypoosmotischem Stress ausgesetzt, so findet ein Wassereinstrom statt und der Zellturgor steigt (Booth *et al.*, 1999). Dies kann unter extremen Bedingungen zum Bersten der Zellen führen. Um dies zu verhindern, verringern Bakterien ihren internen Pool an osmotisch wirksamen Substanzen und erhöhen so ihr osmotisches Potential. Solute, die unter hyperosmolaren Bedingungen akkumuliert wurden, müssen nun wieder aus dem Cytoplasma geschleust werden. Dieser *Efflux* läuft über mechanosensitive Kanäle (Berrier *et al.*, 1992; Sukharev *et al.*, 1997). In *E. coli* wurden drei verschiedene Kanaltypen identifiziert, die nach ihrer Leitfähigkeit unterteilt wurden (Berrier *et al.*, 1996). Sie heißen MscM (mechanosensitive channel of mini conductance), MscS (mechanosensitive channel of small conductance) und MscL (mechanosensitive channel of large conductance). Auch in *C. glutamicum* sind solche mechanosensitiven Kanäle gefunden und charakterisiert worden, zum einen Kanäle, die in ihrer Leitfähigkeit MscS und MscL entsprechen (Ruffert *et al.*, 1999) und zum anderen noch mindestens ein drittes Effluxsystem (Nottebrock *et al.*, 2003). Über solche Kanäle werden Ionen und kompatible Solute unter hypoosmotischem Stress aus dem Cytoplasma geschleust, um den ursprünglichen Turgor wiederherzustellen. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzen die in *C. glutamicum* vorhandenen Effluxsysteme eine gewisse Substratspezifität. Sie transportieren unter solchen Bedingungen bevorzugt Prolin und Glycinbetain aus dem Cytoplasma (Ruffert *et al.*, 1998).

Gerät ein Mikroorganismus in eine hyperosmotische Stresssituation, so fließt Wasser aus dem Cytoplasma entlang des osmotischen Gradienten nach außen. Dies verringert den Zellturgor und die Zelle dehydratisiert. Um den Wasserfluss umzulenken und den Zellturgor

wiederherzustellen, verändern Mikroorganismen aktiv die interne Konzentration an osmotisch wirksamen Substanzen. Die Strategie, die von halophilen Archaea und halotoleranten Bakterien benutzt wird, ist die *salt-in*-Strategie, die interne Akkumulation von hohen KCl- (bzw. KCl und NaCl)-Konzentrationen. Der Zellstoffwechsel dieser Organismen ist an die Akkumulation hoher Ionenkonzentrationen entsprechend angepasst (Galinski *et al.*, 1994; Ventosa *et al.*, 1998). Bakterien, die Habitate geringerer Salzkonzentrationen besiedeln, verfolgen eine andere Strategie (*salt-out*). Diese Bakterien zeigen nach einem hyperosmotischen Schock einen zweiphasigen Adaptationsprozess, in dem zunächst  $K^+$ -Ionen akkumuliert und diese anschließend durch osmotisch wirksame Substanzen, die sogenannten kompatiblen Solute (siehe auch Abbildung 1) ersetzt werden. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie auch in hoher Konzentration den Zellstoffwechsel nicht stören. (Galinski *et al.*, 1994; Csonak *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996). Durch diese Akkumulation wird die interne Konzentration von osmotisch wirksamen Substanzen erhöht und durch den folgenden Wassereinstrom die Zelle rehydratisiert. Ein weiterer Vorteil, der sich durch die Akkumulation von kompatiblen Soluten ergibt, ist die Stabilisierung von Proteinstrukturen, da die kompatiblen Solute die Wasserstruktur nicht zerstören (Arakawa *et al.*, 1985). Zu den kompatiblen Soluten gehören Aminosäuren (z.B. Prolin), Derivate von Aminosäuren (z.B. Peptide, N-acetylierte-Aminosäuren), quartäre Amine (z.B. Glycinbetain, Carnitin), Polyole (z.B. Glycerol) und Zucker (z.B. Saccharose, Trehalose) (da Costa *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999). Die Akkumulation solcher Substanzen kann (je nach Organismus) über *de-novo*-Synthese oder durch Aufnahme aus der Umgebung erfolgen.

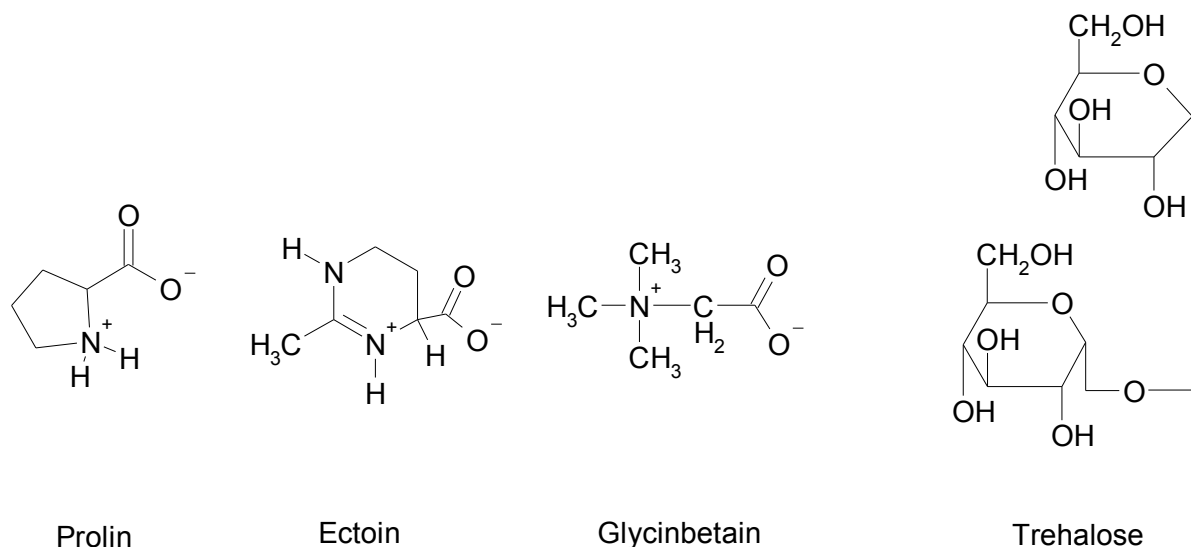


Abbildung 1: Wichtige compatible Solute in *C. glutamicum*

Eines der am besten untersuchten Systeme der Osmoadaptation existiert in *E. coli*. Dieses Enterobakterium akkumuliert direkt nach einem hyperosmotischen Schock Kaliumionen und synthetisiert Glutamat als Gegenion (Dinnbier *et al.*, 1988). Für die Aufnahme von Kalium stehen dem Bakterium die Transportsysteme TrkH/G, KdpFABC und Kup zur Verfügung (Schlösser *et al.*, 1995; Trchounian *et al.*, 1999; Epstein *et al.*, 1978). Die kurzzeitige Akkumulation von Kaliumglutamat wird langfristig dann durch die Akkumulation von Trehalose ersetzt (Dinnbier *et al.*, 1988). Die Synthese von Trehalose läuft über den osmotisch induzierten *otsAB*-Weg (Giaever *et al.*, 1988). Stehen dem Bakterium außerdem kompatible Solute zur Aufnahme zur Verfügung, so werden Substanzen wie Glycinbetain und Prolin durch die Systeme ProP und ProU in die Zelle aufgenommen (Kempf & Bremer, 1998). Diese Aufnahme von kompatiblen Soluten unterdrückt dann die endogene Synthese von Trehalose (Dinnbier *et al.*, 1988). *C. glutamicum* synthetisiert nach einem hyperosmotischen Schock Prolin, Trehalose und Glutamin als osmoprotektive Substanzen und auch eine Erhöhung der internen Kaliumionenkonzentration ließ sich nachweisen (Botzenhardt, 2004; Wolf *et al.*, 2003; Rönsch *et al.*, 2003; Burger, 2002; Frings *et al.*, 1993). Das Verhältnis von Prolin zu Trehalose ist dabei von der Stickstoffversorgung abhängig. Erfahren die Zellen Stickstoffhunger, so ersetzt Trehalose Prolin als wichtigstes kompatibles Solut (Wolf *et al.*, 2003). Besteht außerdem die Möglichkeit zur Aufnahme von kompatiblen Soluten, so werden Glycinbetain, Ectoin und Prolin bevorzugt in die Zelle transportiert und die Eigensynthese wird entsprechend vermindert (Rönsch *et al.*, 2003). Vier osmotisch regulierte Aufnahmesysteme für diese Substanzen sind in *C. glutamicum* bis jetzt gefunden worden (Peter *et al.*, 1998; Farwick *et al.*, 1995; Steger *et al.*, 2004): BetP (Glycinbetain), LcoP (Glycinbetain und Ectoin) und EctP (Glycinbetain, Prolin und Ectoin), die zur BCCT-Familie (Betain/Carnitin/Cholin-Transporter) gehören (Saier *et al.*, 1999) und ProP (Prolin und Ectoin), das sich in die MFS-Familie (*major facilitator superfamily*) einordnen lässt. Diese Transporter fungieren als Symporter und transportieren gleichzeitig Protonen (ProP) oder Natrium-Ionen (BetP, EctP und LcoP) über die Membran. Das am besten untersuchte Transportsystem aus dieser Gruppe ist BetP, für das gezeigt werden konnte, dass es sowohl osmosensorische als auch osmoregulatorische Eigenschaften besitzt. Der Stimulus, der zur Aktivierung von BetP führt, konnte als Erhöhung der internen Kaliumionenkonzentration identifiziert werden (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2003). Neben der Aufnahme als osmoprotektive Substanz kann Prolin für den Anabolismus außerdem über PutP in die Zelle transportiert werden (Peter *et al.*, 1997). Auf der Ebene der Expression konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *proP*, *lcoP* und *betP* von dem Zwei-Komponentensystem

MtrAB abhängig ist. Der genaue Mechanismus der Transkriptionsaktivierung konnte aber bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden (Möker *et al.*, 2004).

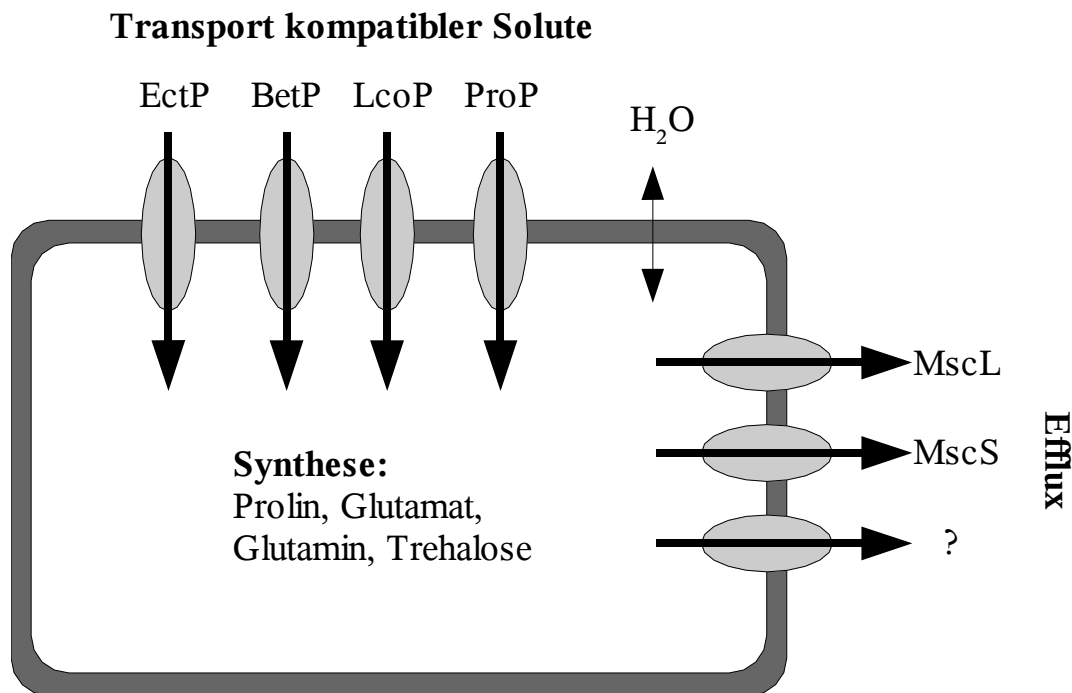


Abbildung 2: Wichtige Systeme der Osmoregulation in *C. glutamicum*

#### 1.4 Synthese von Prolin

Die Aminosäure Prolin wird aus Glutamat synthetisiert. Diese Synthese läuft über vier Reaktionsschritte, von denen drei enzymatisch katalysiert sind und einer spontan abläuft. Im ersten Reaktionsschritt wird das Glutamat von der  $\gamma$ -Glutamat-Kinase, dem Genprodukt von *proB*, unter ATP-Verbrauch zu 4-Glutamyl-Phosphat umgesetzt. Dieses instabile Zwischenprodukt wird von der 4-Glutamyl-Phosphat-Reduktase, dem Genprodukt von *proA*, unter Verbrauch von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  zu Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd reduziert. Anschließend erfolgt die spontane Zyklisierung des Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd zum  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat. Im letzten Reaktionsschritt wird dieses von der Pyrrolincarboxylat-Reduktase, dem Genprodukt von *proC*, zu Prolin reduziert. Das Reduktionsmittel ist wiederum  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Die entsprechenden Gene wurden für *C. glutamicum* 1996 von Ankri *et al.* identifiziert. Weiter konnten Ankri *et al.*, 1996 und Serebrijski *et al.*, 1995 zeigen, dass ein *bypass* für die Reduktion von 4-Glutamyl-Phosphat zu Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd (*proA*-Schritt) in *C. glutamicum* existiert. Dieser *bypass* läuft über das *asd*-Genprodukt, welches für die Aspartat- $\beta$ -semialdehyd-Dehydrogenase kodiert. Normalerweise reduziert die Aspartat- $\beta$ -

semialdehyd-Dehydrogenase Aspartyl- $\beta$ -Phosphat zu Aspartat- $\beta$ -semialdehyd (Reduktionsmittel ist NADPH + H<sup>+</sup>) und führt damit eine der Reduktion von 4-Glutamyl-Phosphat sehr ähnliche Reaktion durch. Substrat und Produkt unterscheiden sich in den zwei verschiedenen Reaktionen nur um je ein C-Atom. Entdeckt wurde der *bypass* dadurch, dass *proA*-Deletionsmutanten Prolin synthetisieren können. Die Deletion von *proB* oder *proC* hingegen führt zu einem prolin-auxotrophen Phänotyp unter Anzuchtbedingungen ohne Osmostress (Serebrijski *et al.*, 1995; Ankri *et al.*, 1996). Über die Anzucht der Deletionsmutanten bei Salzstress konnte außerdem gezeigt werden, dass kein zweiter osmoinduzierter Weg für die Synthese von Prolin existiert (Ley, 2001). Ein solcher Weg ist z. B. in *B. subtilis* vorhanden. Dort gibt es neben dem Weg über ProB, ProA und ProC einen zweiten osmotisch regulierten Weg über die Genprodukte von *proJ*, *proA* und *proH*. Dieser Weg wird von *B. subtilis* zur Prolinakkumulation unter Osmostress verwendet. Eine Deletion von *proJ* und *proH* führt zu einem Stamm, der unter Osmostress kein Prolin akkumuliert (Belitsky *et al.*, 2001; E. Bremer, persönliche Mitteilung). Da in *C. glutamicum* nur ein Weg für die Synthese von Prolin zur Verfügung steht, muss dieser in Bezug auf Menge und Aktivität der Enzyme strikt reguliert sein. Eine Überproduktion von Prolin bei geringer Osmolalität muss verhindert werden, wobei andererseits eine hohe Akkumulation von Prolin unter Osmostress möglich sein sollte. Dass die Expression der entsprechenden Gene nach einem hyperosmotischen Schock induziert wird, konnte inzwischen gezeigt werden (Ley, 2001). Über die Aktivität der Proteine der Prolin-Biosynthese in *C. glutamicum* ist aber wenig bekannt. Kawahara (*et al.* 1989) konnte zeigen, dass in der Subspezies *Brevibacterium lactofermentum* die Enzymaktivität der Pyrrolinecarboxylat-Reduktase (*proC*) unter Osmostress dreifach erhöht ist und die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamat-Kinase (*proB*) unter den gleichen Bedingungen unverändert bleibt. Die  $\gamma$ -Glutamat-Kinase ist das erste Enzym im Prolin-Biosyntheseweg. Gewöhnlich unterliegen die Enzyme, die den ersten Schritt eines Biosyntheseweg katalysieren, einer Endprodukthemmung, um eine Überproduktion zu verhindern. So konnte für *Escherichia coli* (Baich, 1969) und *Pseudomonas aeruginosa* (Leisinger *et al.*, 1979) gezeigt werden, dass die  $\gamma$ -Glutamat-Kinase durch Prolin inhibiert wird. Diese allosterische *feedback*-Inhibition konnte in *E. coli* durch eine einzelne Punktmutation (A zu G an Position 319) aufgehoben werden. Der entsprechende Stamm zeigte dann neben der Überproduktion von Prolin auch eine erhöhte Salztoleranz (Csonak *et al.*, 1988). In der Subspezies *Brevibacterium flavum* (Yoshinaga *et al.*, 1967) wurde hingegen keine Inhibition der  $\gamma$ -Glutamat-Kinase durch Prolin beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, dass auch in *C. glutamicum* keine Inhibition der  $\gamma$ -Glutamat-Kinase durch Prolin stattfindet, da



von *C. glutamicum* unter Osmostress intern hohe Prolinmengen durch Synthese akkumuliert werden (Wolf *et al.*, 2003; Ley, 2001; Rönsch *et al.*, 2003; Frings *et al.*, 1993; Guillouet *et al.* 1995).

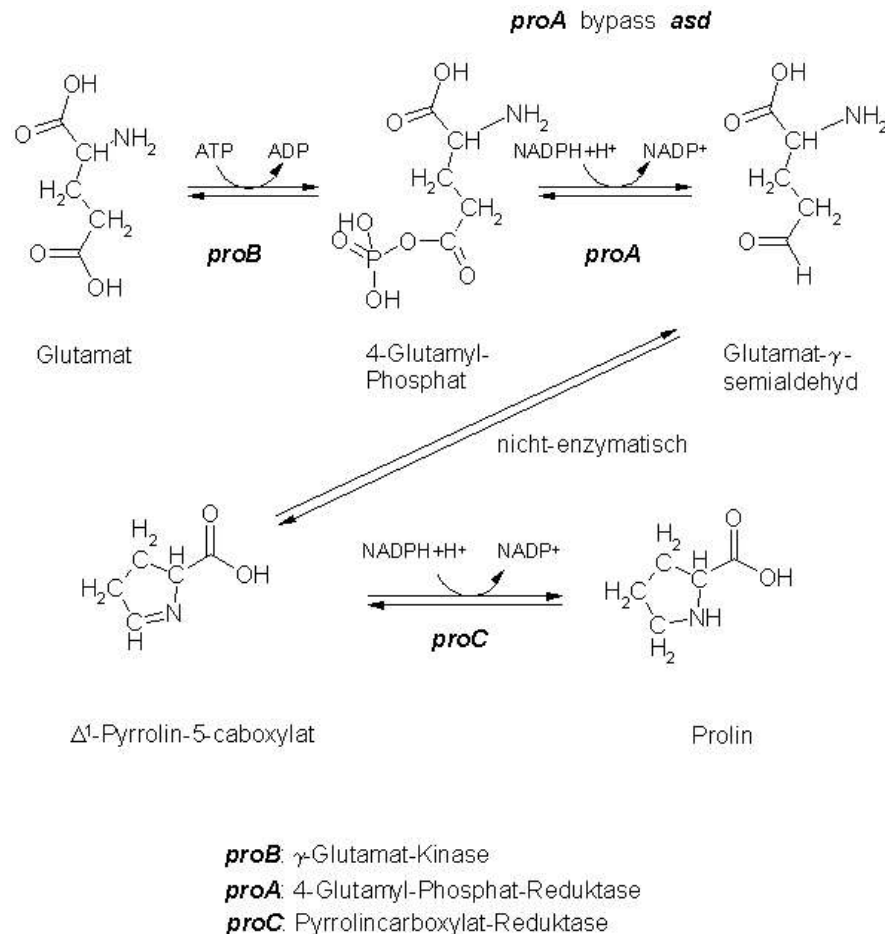


Abbildung 3: Weg der Prolin-Biosynthese in *Corynebacterium glutamicum*

Betrachtet man die Organisation der Prolinbiosynthese-Gene in *C. glutamicum*, so fällt auf, dass *proB* und *proA* durch einen Leserahmen (*unk*) von 912 Basenpaaren getrennt sind (Serebrijski *et al.*, 1995; Ankri *et al.*, 1996). Die Funktion dieses Leserahmens ist über Computeranalysen (Ankri *et al.*, 1996) den 2-Hydroxy-Dehydrogenasen zugeordnet worden. Eine Trennung der Gene ist ungewöhnlich, da in den meisten Bakterien *proB* und *proA* zusammenliegen und als Operon transkribiert werden (Omori *et al.*, 1991; Campanile *et al.*, 1993; Kosuge *et al.*, 1994; Limauro *et al.*, 1996). Trotz dieses zusätzlichen Leserahmens konnte aber auch für *C. glutamicum* ein *proB-unk-proA* Operon-Transkript nachgewiesen werden (Ley, 2001).

## 1.5 Abbau von Prolin

Neben seiner Rolle als kompatibles Solut bei hyperosmotischem Stress kann Prolin von vielen Organismen als Energiequelle genutzt werden. So können z.B. die Enterobakterien *S. typhimurium* und *E. coli* Prolin als C- und N-Quelle verwerten. In diesen beiden Organismen sind die benötigten Abbauaktivitäten auf dem Protein PutA vereinigt. PutA trägt sowohl die Prolin-Dehydrogenase (Prolin-Oxidase) als auch eine  $\gamma$ -Glutamyl-semialdehyd-Dehydrogenase (Pyrrolin-5-carboxylat-Dehydrogenase)-Aktivität. Die FAD-abhängige Prolin-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat, welches spontan zu Glutamat-semialdehyd hydrolysiert. Dieses wird anschließend von der NAD-abhängigen  $\gamma$ -Glutamyl-semialdehyd-Dehydrogenase zu Glutamat oxidiert (Wood & Zadworny, 1980; Wood, 1981 Ling *et al.*, 1994; Maloy *et al.*, 1987). Neben dieser enzymatischen Funktion von PutA ist für manche Enterobakterien auch beschrieben, dass PutA als Transkriptionsfaktor agieren kann. Sowohl in *E. coli* als auch in *S. typhimurium* reguliert PutA die Transkription von *putA* und *putP* (Prolinpermease) durch Bindung an die *put*-Kontrollregion (Brown *et al.*, 1992; Ostrovsky De Spicer *et al.*, 1991; Ostrovsky De Spicer *et al.*, 1993; Maloy *et al.*, 1997). Eine Erhöhung der internen Prolinkonzentration hebt die Repression auf und PutA assoziiert an der Membran, wo der Abbau von Prolin stattfindet. Die Elektronen im reduzierten FAD können so direkt an die Elektronentransportkette weitergegeben werden. (Brown *et al.*, 1993; Ostrovsky De Spicer *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2003). Durch die Aufklärung der Struktur der Prolin-Dehydrogenase-Domäne (von PutA aus *E. coli*) konnten 2003 von Lee Y. H. *et al.* erstmals den bekannten Funktionen Proteindomänen zugeordnet werden. Es wurde sowohl das aktive Zentrum ( $\beta_8\alpha_8$ -barrel), als auch der Bereich der DNA-Bindung identifiziert. Eine Membranassoziation wurde bei der isolierten Prolin-Dehydrogenase-Domäne aber nicht beobachtet. 2004 wurde der Bereich, der für die DNA-Bindung notwendig ist, von Gu *et al.* weiter eingegrenzt und auf die ersten 47 Aminosäuren festgelegt. Dieser Bereich schien auch für die von Lee Y. H. *et al.* beobachtete Dimerisierung des Proteins ausreichend zu sein.

Wie regulieren Organismen nun den Abbau und die Synthese von Prolin, um einen *futile cycle* zu vermeiden? Besonders unter hochosmolaren Bedingungen sollte der Abbau von Prolin verhindert werden, wenn der entsprechende Organismus Prolin zum Osmoschutz akkumulieren will. Eine solche reziproke Regulation von Prolinsynthese und Abbau konnte z.B. für *Arabidopsis thaliana* auf der Ebene der Transkription gezeigt werden. Während osmotischer Stress die Transkription der  $\Delta^1$ -pyrrolin-5-carboxylat-synthetase (bifunktionales Enzym) erhöhte, wurde die Transkription der Prolin-Dehydrogenase stark inhibiert. Ein

Wechsel zu normalen Wachstumsbedingungen kehrte die Regulation der Gene um und das akkumulierte Prolin wurde abgebaut (Peng *et al.*, 1996). Eine Regulation der Enzymaktivität der Prolin-Dehydrogenase in Bezug zur Osmolalität wurde 1990 von Ekena und Maloy in *S. typhimurium* gezeigt. In diesem Organismus wurde der Abbau von Prolin bei hoher Osmolalität auf enzymatischer Ebene inhibiert. Eine genau gegenläufige Regulation bei Osmostress findet statt, wenn nicht Prolin sondern Glutamat das bevorzugte kompatible Solut ist. So wird in *V. vulnificus* die Transkription des *putAP*-Operons sowohl durch Osmostress als auch durch Prolinzugabe aktiviert. Parallel steigt die Enzymaktivität von PutA an und Prolin wird zu Glutamat abgebaut, welches das Gram-negative Bakterium zum Osmoschutz akkumuliert (Lee J. H. *et al.*, 2003).

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bisher bekannt war, dass *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock Prolin akkumuliert und gleichzeitig die Transkription der für die Biosynthese benötigten Gene aktiviert. In dieser Arbeit sollte der Regulationsmechanismus dieser Transkriptionsaktivierung untersucht werden. Dafür sollte zuerst die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* in Abhängigkeit von der Stärke des osmotischen Stresses charakterisiert und quantifiziert werden. Über verschiedene methodische Ansätze sollte dann der Regulationsmechanismus eingegrenzt und nach putativen Transkriptionsfaktoren gesucht werden. Weiter war es geplant, die physiologische Bedeutung der Prolinakkumulation durch die Anzucht von entsprechenden Deletionsstämmen zu untersuchen. Hierbei sollten erstens Osmoschock- und zweitens Prolinpulseexperimente durchgeführt werden. Im weiteren Teil der Arbeit sollte die Funktion von *orf486* untersucht werden, das für das putative PutA aus *C. glutamicum* kodiert. Von besonderem Interesse war es außerdem, die globalen Veränderungen im Transkriptom von *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock zu analysieren.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Primer, Plasmide und Stämme

#### 2.1.1 Stämme

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Stämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp / Phänotyp</i>	<i>Referenz</i>
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
ATCC 13032 $\Delta proA$	Wildtyp ATCC 13032 mit einer Deletion von 798 Basen im <i>proA</i> Gen.	Ley, 2001
ATCC 13032 $\Delta proC$	Wildtyp ATCC 13032 mit einer Deletion von 313 Basen im <i>proC</i> Gen.	Ley, 2001
ATCC 13032 $\Delta proB$	Wildtyp ATCC 13032 mit einer Deletion von 201 Basen im <i>proB</i> Gen.	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta putA$	Wildtyp ATCC 13032 mit einer Deletion von 3006 Basen in <i>putA</i> ( <i>orf486</i> ).	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta leuC$	Wildtyp ATCC 13032 mit einer Deletion von <i>leuC</i>	Weinand, unveröffentlichte Arbeit
ATCC 13032 $\Delta mtrAB$	Wildtyp ATCC 13032 mit einer <i>in frame</i> Deletion von <i>mtrAB</i>	Möker <i>et al.</i> , 2004
ATCC 13032 pXMJ19 <i>lexA</i>	Wildtyp ATCC 13032 mit plasmidkodiertem <i>lexA</i> (Cgl1930) auf pXMJ19.	diese Arbeit
ATCC 13032 pXMJ19	Wildtyp ATCC 13032 mit pXMJ19 Leervektor.	diese Arbeit
ATCC 13032 PR <i>proA</i>	Wildtyp ATCC 13032 mit der Promotorregion von <i>proA</i> auf pXMJ19.	diese Arbeit

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp / Phänotyp</i>	<i>Referenz</i>
ATCC 13032 PR <i>proB</i>	Wildtyp ATCC 13032 mit der Promotorregion von <i>proB</i> auf pXMJ19.	diese Arbeit
ATCC 13032 PR <i>proC</i>	Wildtyp ATCC 13032 mit der Promotorregion von <i>proC</i> auf pXMJ19.	diese Arbeit
RS167	Restriktionsdefiziente Mutante des Wildtyp-Stamms ATCC 13032, $\Delta$ ( <i>cgIIM-cgIIR-cgIIR</i> )	Tauch <i>et al.</i> , 2002
RS167 $\Delta$ <i>orf1175</i>	RS167 mit einer <i>in frame</i> Deletion von <i>orf1175</i> (Cgl0671)	diese Arbeit
RS167 INT <i>sigH</i>	RS167 mit einer Integration in <i>sigH</i>	Universität Bielefeld, Kalinowski & Larisch, unveröffentlichte Arbeit
RS167 $\Delta$ <i>sigB</i>	RS167 mit einer Deletion von <i>sigB</i>	Universität Bielefeld, Kalinowski & Larisch, unveröffentlichte Arbeit
RS167 $\Delta$ <i>sigD</i>	RS167 mit einer Deletion von <i>sigD</i>	Universität Bielefeld, Kalinowski & Larisch, unveröffentlichte Arbeit
RS167 $\Delta$ <i>sigE</i>	RS167 mit einer Deletion von <i>sigE</i>	Universität Bielefeld, Kalinowski & Larisch, unveröffentlichte Arbeit
RS167 $\Delta$ <i>sigM</i>	RS167 mit einer Deletion von <i>sigM</i>	Universität Bielefeld, Kalinowski & Larisch, unveröffentlichte Arbeit
RS167 $\Delta$ <i>sigC</i>	RS167 mit einer Deletion von <i>sigC</i>	Universität Bielefeld, Kalinowski & Larisch, unveröffentlichte Arbeit

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp / Phänotyp</i>	<i>Referenz</i>
DH5 $\alpha$ mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda^-</math></i> <i>recA1 gyrA96 relA1 deoR <math>\Delta</math></i> <i>(lacZYA-argF) U169</i> $\Phi$ 80 <i>DlacZ <math>\Delta</math>M15mcrA <math>\Delta</math></i> <i>(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990

### 2.1.2 Primer

Tabelle 2: Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendete Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>orf1175</i> Primer A	AAGCTTGTATGGGTCTTTCCGTGGGT
<i>orf1175</i> Primer B	ATAGAATTGTCAGCAGCATTGCTTGTCACACTAGTGGGTG
<i>orf1175</i> Primer C	CACCCACTAGTGTGACAAGCAATGCTGCTGACAATTCTAT
<i>orf1175</i> Primer D	AAGCTTTACCCATGTACAATCCTTAC
<i>lexA</i> Start <i>Xba</i> I	CCCGGGTCTAGATGCCAACGGAAAACCAGATCC
<i>lexA</i> Stop <i>Kpn</i> I	CCCGGGGGTACCAAGCTTGCGCATCACGGAAAC
<i>lexA</i> seq	GGTGGGCAAATTGCCGCTG
<i>proAse</i> -290 <i>Xba</i> I	CCCGGGTCTAGAATGCATTGAACAACGGCACC
<i>proAas</i> TS <i>Kpn</i> I	CCCGGGGGTACCGGTTGCCCACTATACAGACC
<i>proBse</i> -400 <i>Xba</i> I	CCCGGGTCTAGAGGAGAAGGCTGAGTCTGTCA
<i>proBas</i> TS <i>Kpn</i> I	CCCGGGGGTACCGAGGCCACGACGTACCTGAG
<i>proCse</i> -500 <i>Xba</i> I	CCCGGGTCTAGACTTGACGACGGGCGCGTTCC
<i>proCas</i> TS <i>Kpn</i> I	CCCGGGGGTACCGGTTCCCACTGCCACTAA
<i>proA</i> RT se	GTCCCGGATATTGCAGTGTT
<i>proA</i> RT as	CGTTGGCTTCGATGATTTCT
<i>proB</i> RT se	AGGTGGGCACTGTATTCCAC
<i>proB</i> RT as	CGTCATCGAGTCGGATCTTT
<i>proC</i> RT se	TGCAACCATGATGAAGGAAA
<i>proC</i> RT as	TTCTTCGAGTTCTCGGATGG
<i>aceE</i> RT se	GAAGGCAAGATCGACGTCTC
<i>aceE</i> RT as	TATTCCTCAGGAGCGTTTGG

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>proA</i> bead 400	TGGACGTTACCGATCCTGAG
<i>proA</i> bead 400 Bio	GCGTGCAACGAGTTCATCTG
<i>proB</i> bead 400	CGTAAACGCGCATCTCAGGTA
<i>proB</i> bead 400 Bio	GGTTTTATCCTTCCCAGCG
<i>proC</i> bead 400	GTTGTTCTCGGTGTCGTTGT
<i>proC</i> bead 400 Bio	GGAGAGCACTTCGACGATAA
<i>putA</i> Primer A	AAGCTTGGTCAATGTCGGTGATGA
<i>putA</i> Primer B	GTTATAAATTTGGAGCGTGAAGGTCATTGCGTGGACGGAG CAATCTTGCCC
<i>putA</i> Primer C	CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTATAACCTCCAGC GTCCGAGTCCG
<i>putA</i> Primer D	AAGTTTACGGTCACGCTGTGCTCC
<i>putA</i> Genstart se	GTCGATGAATCTGCCTATTG
<i>putA</i> 500as	GTGTCATCCAAATGCTTCGC

### 2.1.3 Plasmide

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
pUC18	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZα</i> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i>	Viera & Messing, 1982
pK19mobsacB	Km <sup>R</sup> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> , Intergrationsvektor	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pGEM4z	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZα</i> <i>E. coli</i> -Vektor für in-vitro- Transkription	Promega, Mannheim
pGEM3z	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZα</i> <i>E. coli</i> -Vektor für in-vitro- Transkription	Promega, Mannheim
pDrive	Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , <i>lacZα</i> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i>	Qiagen, Hilden
pXMJ19	<i>ptac</i> , <i>lacI q</i> , Cam r	Jakoby <i>et al.</i> , 1999

<b>Plasmid</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pGEM4z <i>proA</i>	pGEM4z mit 0,5 kb Fragment aus dem <i>proA</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor.	Morbach, unveröffentlichte Arbeit
pGEM4z <i>proC</i>	pGEM4z mit 0,5 kb Fragment aus dem <i>proC</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor.	Morbach, unveröffentlichte Arbeit
pDrive <i>proB</i>	pDrive mit 0,5 kb Fragment aus dem <i>proB</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor.	Ley, 2001
pK19 <i>mobsacB-ΔputA</i>	Plasmid zur Deletion von 3006 Basen aus <i>orf486</i>	diese Arbeit
pDrive <i>putA</i>	pDrive mit 0,4 kb Fragment aus dem <i>orf486</i> . 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor.	diese Arbeit
pDrive <i>lcoP</i>	pDrive mit 0,5 kb Fragment aus dem <i>lcoP</i> -Gen	Weinand, 2004
pGEM4z <i>proP</i>	pGEM4z mit 0,5 kb Fragment aus dem <i>proP</i> -Gen.	Morbach, unveröffentlichte Arbeit
pGEM4z <i>betP</i>	pGEM4z mit 0,5 kb Fragment aus dem <i>betP</i> -Gen.	Morbach, unveröffentlichte Arbeit
pDrive <i>putP</i>	pDrive mit 0,5 kb Fragment aus <i>putP</i> . 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor.	Weinand, unveröffentlichte Arbeit
pXMJ19 <i>lexA</i>	Plasmidkodierte <i>lexA</i> zur Überexpression	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB-Δorf1175</i>	Plasmid zur <i>in frame</i> Deletion von <i>orf1175</i>	diese Arbeit
pXMJ19-PR- <i>proA</i>	Plasmidkodierte Promotorregion von <i>proA</i> (300bp)	diese Arbeit
pXMJ19-PR- <i>proB</i>	Plasmidkodierte Promotorregion von <i>proB</i> (400bp)	diese Arbeit
pXMJ19-PR- <i>proC</i>	Plasmidkodierte Promotorregion von <i>proC</i> (500bp)	diese Arbeit



### 2.1.4 Genomdatenbanken

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Anotationen des Genoms von *C. glutamicum* verwendet. Dies war notwendig da nicht in jeder Anotation jeder Leserahmen vorhanden ist. Die Unterscheidung der verschiedenen Anotationen untereinander ist über das entsprechende Kürzel (s.u.) gegeben.

NCBI: Ncgl-Nummern (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/chrom.cgi?db=G&gi=232>)

Degussa: *orf*-Nummern (nicht öffentlich verfügbar)

GIB: Cgl-Nummern ([http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Cglu\\_ATCC13032](http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Cglu_ATCC13032))

Bielefeld: Cg-Nummern ([http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Cglu\\_ATCC13032\\_UBIELEFELD](http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Cglu_ATCC13032_UBIELEFELD))

## 2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Carl Roth GmbH & Co. bezogen.

## 2.3 Nährmedien

*E. coli* wurde standardmäßig in Luria-Bertani-Medium (LB) bei 37 °C kultiviert. *C. glutamicum* wurde bei 30 °C in BHI (Komplexmedium), CgXII (Minimalmedium) oder MMI-Medium (Minimal-Medium) angezogen. Die Osmolalität der Medien wurde durch Zugabe von NaCl eingestellt.

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt ad 1L mit H<sub>2</sub>O; autoklaviert.

Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium (Difco, Detroit, USA):

37 g BHI ad 1L mit H<sub>2</sub>O; autoklaviert.

CgXII-Minimal-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993):

Für einen Liter wurden zugegeben: 42 g MOPS, 20 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g Harnstoff, 1,26 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , anschließend wurde der pH Wert mit NaOH auf 7 eingestellt und auf 915 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden folgende Substanzen zugegeben: siehe Tabelle 4. Zur Anzucht von Stämmen mit Deletionen in den Prolin-Biosynthese-Genen wurde zusätzlich 1 mM oder 10 mM L-Prolin zugefügt.

MMI-Medium:

Für einen Liter wurden 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g Harnstoff, 1,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 800 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Der pH Wert wurde mit NaOH auf 7 eingestellt und es wurde auf 915 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und die Substanzen aus Tabelle 4 wurden zugegeben.

Tabelle 4: Zusätze zum MMI- und CgXII-Medium

<i>Menge</i>	<i>Lösung</i>
80 ml	50 %ige (w/v) Saccharoselösung (autoklaviert)
1 ml	1 mM $\text{MgSO}_4$ -Lösung (autoklaviert)
1 ml	1 %ige (w/v) $\text{CaCl}_2$ -Lösung (sterilfiltriert)
1 ml	0,001 %ige Biotin-Lösung (sterilfiltriert)
1 ml	Protokatechusäure (30 mg/ml) (sterilfiltriert) nur für CgXII
1 ml	Spurensalzlösung (sterilfiltriert) 100 ml mit: 1 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 0,1g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,031 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 g $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen, DNA-Transfer und Mutagenese.

#### 2.4.1.1 Anzucht kompetenter *E. coli*-DH5 $\alpha$ mcr-Zellen

Für die Herstellung kompetenter DH5 $\alpha$ mcr-Zellen (Inoue *et al.*, 1990) wurde der Stamm von LB-Platte in LB-Flüssigmedium angeimpft und über Tag bei 37° C und 110 rpm inkubiert. Gegen Abend wurde 1 ml der dicht gewachsenen Kultur entnommen und in einem 2-Liter-Kolben mit 250 ml SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) überimpft. Über Nacht wurde bei Raumtemperatur 20-25° C und 140 rpm inkubiert. Die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) dieser Kultur sollte am nächsten Morgen ~0,6 betragen. Bei Erreichen dieser OD wurden die Zellen auf 4° C im Eis abgekühlt und anschließend bei 4° C und 2500 rpm für 10 min geerntet. Die Zellpellets wurden in 80 ml eiskaltem TB resuspendiert und vereinigt. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden die Zellen erneut bei 4° C und 2500 rpm für 10 min abzentrifugiert und in 20 ml eiskaltem TB resuspendiert. Der Suspension wurden 1,4 ml DMSO portionsweise zugegeben. Anschließend erfolgte das Aliquotieren à 200  $\mu$ l und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei – 80° C.

#### TB (sterilfiltriert):

10 mM PIPES, 250 mM KCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub> ad 170 ml mit H<sub>2</sub>O, pH 6,7 mit KOH. Anschließend 55 mM MnCl<sub>2</sub> zugeben, auf 200 ml mit H<sub>2</sub>O.

#### SOB-Medium (pro 250 ml):

5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,125 g NaCl, 625  $\mu$ l 1 M KCl. Nach dem Autoklavieren 1,25 ml steriles 2 M MgCl<sub>2</sub> zugeben.

#### 2.4.1.2 Transformation von *E. coli*-DH5 $\alpha$ mcr

Zur Transformation wurde ein 200  $\mu$ l Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut und mit 6  $\mu$ l eines Ligationsansatzes oder 1  $\mu$ l Plasmid versetzt. Anschließend wurde der Ansatz weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42° C im Wasserbad für 30 sec. Danach wurde sofort 400  $\mu$ l SOC-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37° C im Thermoblock geschüttelt. Nach Ablauf der

Regenerationszeit wurden die Zellen auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium (sterilfiltriert):

5g Trypton, 1,25g Hefeextrakt, 0,125g NaCl, 0,9g Glucose, 625 µl 1 M KCl, 1,25ml steriles 2 M MgCl<sub>2</sub> ad 250ml mit H<sub>2</sub>O.

2.4.1.3 Anzucht kompetenter *C. glutamicum*-Zellen.

*C. glutamicum* ATCC 13032 oder RS 167 wurde von BHI-Platte in LB-Medium mit 2% (w/v) Glucose angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 100 ml EPO Medium (Schäfer *et al.*,1994) in einem 1-Liter-Kolben auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 angeimpft. Die Kultur wurde nun für 24 Stunden bei 20 °C und 150 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Zeit sollte die optische Dichte bei ~ 1 liegen. Nun wurden die Zellen zunächst 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend durch eine Zentrifugation bei 4000 g für 10 Minuten geerntet. Anschließend wurden die Zellen viermal in 50 ml 10 %igem (v/v) eiskaltem Glycerol gewaschen und danach in 0,5 ml 10 %igem (v/v) eiskaltem Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden à 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

EPO-Medium (sterilfiltriert):

für 100 ml: 1 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,4 g Isonicotinsäurehydrazid, 2,5 g Glycin, 100 µl Tween 80.

#### 2.4.1.4 Elektroporation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen.

Zur Elektroporation wurden ein 50 µl Aliquot elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut. Gleichzeitig wurde die zu benutzende Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt. Nun wurden 6 µl des zu transformierenden Plasmids und die kompetenten Zellen in die Küvette gegeben. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Die Elektroporation erfolgte bei 600 Ω, 25 µF und 2,5 kV im Gene-Pulser (Biorad). Die Zeitkonstanten lagen bei optimaler Durchführung im Bereich um 12 ms. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 1 ml BHIS-Medium versetzt, in ein Falcon überführt und 1-1,5 Stunden bei 30 °C und 110 rpm regeneriert. Anschließend wurden die Zellen auf BHI-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und dann bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert.

#### BHIS-Medium (sterilfiltriert):

1,8 g BHI, 4,55 g D-Sorbitol ad 50 ml mit H<sub>2</sub>O.

#### 2.4.1.5 Herstellung von *C. glutamicum*-Deletionsmutanten.

Für die Herstellung von Deletionen im Chromosom von *C. glutamicum* wurde eine modifizierte Methode von Schäfer *et al.*, 1994 angewandt. Das Deletionsfragment wurde über eine SOE-PCR hergestellt und in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Dieser Vektor besitzt zwei Selektionsmarker, zum einen ein Kanamycin-Resistenzgen (*Km<sup>R</sup>*) und zum anderen das *SacB*-Gen, welches für die Levan-Sucrase kodiert, die eine Saccharose-Sensitivität erzeugt. Nach Kontrolle der Sequenz wurde der Vektor über Elektroporation nach *C. glutamicum* gebracht. Da der Vektor für *C. glutamicum* keinen Replikationsursprung besitzt, musste für seinen Erhalt eine Integration (homologe Rekombination) ins Genom erfolgen. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz (BHI-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin) und Saccharose-Sensitivität (BHI-Platten mit 10 % Saccharose) wurden die Klone identifiziert, bei denen das Plasmid ins Genom integriert worden war. Diese wurden in BHI-Medium über Tag angezogen und dann über Nacht in Hungermedium (MMI ohne C- und N-Quelle) inkubiert. Diese Inkubation ermöglichte Rekombinationsereignisse zwischen dem Deletionsfragment aus dem Vektor und dem intakten Gen auf dem Chromosom. Ergebnis einer solchen Rekombination ist ein Verlust des Vektoranteils und die Erzeugung eines Deletions- oder eines Wildtyp-Gens. Um die Klone zu identifizieren, bei denen eine Rekombination stattgefunden hatte, wurde auf Verlust der Kanamycinresistenz und der Saccharose-Sensitivität selektiert. Aus den erhaltenen Klonen wurden die Deletionsmutanten mittels PCR detektiert. Die Stammhaltung der

Deletionsmutanten erfolgte zum einen auf BHI-Platten bei 4° C, die alle vier Wochen erneuert wurden, und zum anderen in Form von Glycerin-Dauerkulturen bei -20 °C.

#### 2.4.1.6 Überexpression von Proteinen in *C. glutamicum*

Für die Überexpression von Proteinen oder die Erhöhung der Promotorkopienzahl wurde der IPTG-induzierbare Vektor pXMJ19 benutzt. Zur Konstruktion der Plasmide wurden die gewünschten DNA-Bereiche über PCR vervielfältigt und in diesen Vektor kloniert. Nach Kontrolle der Sequenz wurde die erstellten Plasmide über Elektroporation nach *C. glutamicum* gebracht. Nach der Selektion über Chloramphenicol erfolgte die Kontrolle der Stämme über PCR.

### 2.4.2 DNA-Arbeiten

#### 2.4.2.1 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasiden aus *E. coli* wurde das GFX-Micro-Plasmid-Prep-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) oder das NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers benutzt.

#### 2.4.2.2 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Das Auftrennen und Reinigen von PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen wurde über Gelelektrophorese mit 0,9 %igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Für die Analyse von Fragmenten kleiner als 1 kb wurden 2 %ige Nusive-Agarosegele verwendet. Nach der Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid konnten die gewünschten Banden für eine spätere Klonierung aus den Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraktion-Kits (Qiagen, Hilden) oder des NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Protokoll des Herstellers isoliert werden.

#### 2.4.2.3 Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA zur Klonierung und Analyse wurde mit Restriktionsenzymen von NEB (Schwalbach) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.4.2.4 Klonierung von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wie pUC18 oder pK19*mobsacB* wurde mit dem Ready-to-Go-Ligations-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) oder dem Rapid DNA Ligation Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die direkte Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pDrive wurde mit dem PCR-Kloning-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

#### 2.4.2.5 PCR Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) wurde zur in-vitro Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet. Dazu wurden jeweils zwei Primer benutzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung über DNA-Polymerase ermöglichte die Synthese der gewünschten DNA. Benutzt wurde die Taq-Polymerase aus dem Master-Mix Kit von QiaGen (Hilden); die Primer wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) oder Operon (Qiagen, Hilden) bezogen. Durchgeführt wurde die PCR im Mastercycler-gradient (Eppendorf GmbH, Hamburg).

PCR Ansatz:

- 10 µl Master-Mix (Qiagen, Hilden)
- je 1 µl Primer
- 1 µl "template"
- Wasser ad 20 µl.

Als *Template* diente: Zahnstocherspitze mit Zellen, chromosomale DNA oder verdünnte Plasmid-DNA. Ein Standard PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

Eine einmalige Denaturierung bei 94 °C für 3 Minuten am Anfang, dann 30 Zyklen à: 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden Primer-Anlagerung bei  $T_m^*$  der Primer und eine Primer-Verlängerung für 1 Minute pro kb bei 72 °C. Zum Schluss erfolgte ein Elongationsschritt bei 72° C für 10 Minuten, danach wurde der Ansatz auf 4° C gekühlt.

\* $T_m$  errechnete sich nach der Formel:  $4GC + 2AT = T_m$  °C

#### 2.4.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte im ZMMK Servicelabor der Universität zu Köln.

### 2.4.3 RNA-Arbeiten

Für RNA-Arbeiten wurden RNase-freie Plastikmaterialien, Wasser und Lösungen verwendet. Diese wurden (soweit möglich) durch 40-minütiges Autoklavieren bei 121 °C und einem Bar sterilisiert.

#### 2.4.3.1 RNA-Präparation

Für eine gesamt-RNA-Isolation aus *C. glutamicum* wurden das Nucleo-Spin-RNA-II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet.

#### Standard Anzuchtbedingungen:

Für eine RNA-Präparation wurde *C. glutamicum* am Vortag der Präparation von BHI-Platte in BHI-Medium angeimpft und über Tag bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen auf MMI-Medium mit 300 mM NaCl überimpft ( $OD_{600}=0,5$ ) und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Für die Anzucht prolinauxotropher Stämme wurde dem MMI-Medium 10 mM L-Prolin zugesetzt. Am nächsten Morgen wurden aus dieser Kultur eine MMI-Kultur mit 300 mM NaCl auf eine Start- $OD_{600}$  von 2 angeimpft und bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Prolinauxotrophe Stämme erhielten zusätzlich 1 mM L-Prolin ins Medium. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase, was einer  $OD_{600}$  von ~ 6 entspricht, wurden zweimal 1 ml Zellen geerntet (Referenzwerte vor dem Schock) und die restliche Kultur durch Zugabe von 750 mM NaCl einem osmotischen Schock unterworfen. Nun wurden in kurzen Abständen weitere Proben genommen.

#### Zellernte und -aufschluss:

Die entnommenen 1 ml Zellen wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen bei 30 °C und 10000 rpm für 1 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde in 700 µl RA1-Puffer + 7 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Aufschlussröhrchen mit 300 mg Glasperlen überführt. Nun erfolgte der Zellaufschluss mit dem FastPrep-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) durch zweimaliges Schütteln bei 6,5 m/s für je 30 Sekunden. Anschließend wurde der Aufschluss für zwei Minuten bei



14000 rpm und 4 °C zum Entfernen von Glasperlen und Zelltrümmern zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und mit 500 µl 70 %igem Ethanol gemischt. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte nach dem Protokoll des benutzten Kits. Nach der Präparation wurde die Konzentration der RNA im Photometer gemessen und die Integrität über eine denaturierende Gelelektrophorese kontrolliert.

#### 2.4.3.2 Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Die für Hybridisierungen mit spezifischen m-RNA's benötigten *antisense*-RNA-Sonden wurden über eine *in-vitro*-Transkription hergestellt, die von einem DNA-*Template* ausging. Zur Erstellung des Templates wurden zwei verschiedene Methoden benutzt:

##### a) Klonierung des DNA-Fragments in einen Transkriptionsvektor

Das DNA-Fragment (ca. 500 bp des kodierenden Bereichs) des entsprechenden Gens wurde dafür zuerst über PCR aus dem Genom vervielfältigt und anschließend über Gelelektrophorese gereinigt. Das so erhaltene Fragment wurde anschließend in einen Transkriptionsvektor wie pDrive, pGEM3z oder pGEM4z kloniert. Diese Vektoren besitzen beiderseits der "multiple cloning site" einen SP6- bzw. T7-Promotor für die entsprechende RNA-Polymerase. Für die *in-vitro*-transkription wurde das Plasmid am entgegengesetzten Ende der "multiple cloning site" des zu benutzenden Promoters (stromabwärts von 3'-Ende des *Inserts*) linearisiert und danach über Gelelektrophorese gereinigt.

##### b) Kopplung des T7-Promotors an das DNA-Fragment über PCR

Auch hier wurde als erstes das DNA-Fragment (ca. 500 bp des kodierenden Bereichs) des entsprechenden Gens über PCR vervielfältigt. Einer der beiden PCR-Primer trug dabei zusätzlich die Sequenz des T7-Promotors, der so gesetzt war, dass ein *anti-sense* RNA-Molekül entstehen würde. Das PCR-Produkt wurde über Gelelektrophorese gereinigt und konnte sofort für die *in-vitro*-Transkription eingesetzt werden.

Die Markierung der RNA-Sonden erfolgte mit Digoxigenin-11-dUTP.

#### *In-vitro*-Transkriptionsansatz:

- ~1 µg linearisiertes Plasmid oder 400 ng DNA-Fragment
- 2 µl 10 X Transkriptions-Puffer (Roche Diagnostics)
- 2 µl DIG-RNA-*Labeling-Mix* (Roche Diagnostics)

1 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas)  
2 µl SP6- oder T7-Polymerase (Roche Diagnostics)  
mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl auffüllen und mischen.

Die *in-vitro*-Transkription erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde das DNA-*Template* durch Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase und einer weiteren Inkubation von 25 Minuten bei 37° C entfernt.

#### 2.4.3.3 RNA-Hybridisierungen

Die Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Gene wurden über RNA-Hybridisierungen (Dot Blots) untersucht. Pro Dot wurden jeweils gleiche RNA Mengen, meist 3 µg aufgetragen. Hierfür wurde die RNA-Probe mit 90 µl 10 x SSC-Puffer mit Bromphenolblau vermischt. Der Transfer der Proben auf die Nylonmembran (BioBond Nylon Membrane, Sigma, Deisenhofen) wurde mit einem "Dot Blotter" (S&S Minifold I, Schleicher & Schüll, Dassel) durchgeführt. Hierfür wurde auf die Siebplatte des "Dot Blotter" ein mit 10 x SSC befeuchtetes Whatmann-Filterpapier gelegt und darauf die Nylonmembran, die zuvor gewässert und anschließend in 10 x SSC äquilibriert wurde. Auf die Nylonmembran wurde nun die Absaugplatte der Apparatur gelegt. Durch Anlegen eines Vakuums an die Apparatur wurde durch alle zu benutzenden Löcher 400 µl 10 x SSC-Puffer bei 100 mbar gesaugt. Jetzt wurden die RNA-Proben aufgetragen und bei 15 mbar langsam durchgesaugt. Zum Trocknen der Membran wurde die Pumpleistung noch für einige Minuten auf 100 mbar gestellt. Anschließend wurde die Membran entnommen und bei jeweils 125 mJ/cm<sup>2</sup> im UV-Crosslinker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) zweimal UV-fixiert.

Für die Hybridisierung wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die einstündige Prähybridisierung (Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran) erfolgte nach Zugabe von 12,5 ml Prähybridisierungslösung bei 50 °C im Hybridisierungsöfen. Nach Ablauf der Stunde wurde 1 µl DIG-markierter RNA-Sonde zugegeben und über Nacht bei 68 °C hybridisiert.

#### 2.4.3.4 Northern Blot-Analysen

Durch Northern Blot-Analysen wurden verschiedene m-RNA's nach einer Größentrennung mittels spezifischer Sonden detektiert. Die Auftrennung der gesamt-RNA nach Größe erfolgte über eine Gelelektrophorese über ein 1 %iges Agarosegel in einem Phosphatpuffer-System.

Als erstes wurden RNA-Proben mit deionisiertem Glyoxal denaturiert. Hierfür wurden 5 µg RNA-Probe (Gesamt-RNA) mit 4 µl 40 % (w/v) Glyoxal, 10 µl DMSO 100 % und 2 µl 10x Phosphat-Puffer gemischt und 1h bei 50 °C inkubiert. Als RNA-Größenmarker diente die RNA *high range ladder* von Fermentas. Nach der Denaturierung wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 5 µl Auftragspuffer wurden hinzugefügt. Die Gelelektrophorese wurde gestartet und der pH-Wert des Laufpuffers durch Umdrehen des Gels und Umpolen der Gelkammer, jeweils nach 30 Minuten, konstant gehalten. Nachdem die bromphenolblau Bande das untere Drittel des Gels erreicht hatte, wurde die Gelelektrophorese gestoppt und das Gel wurde 15 Minuten in 10 x SSC äquilibriert. Anschließend wurde das Gel auf eine Nylonmembran (BioBond Nylon Membrane, Sigma, Deisenhofen) in der Vaku-Blot-Apparatur (LKB VakuGene XL, Pharmacia, Freiburg) gelegt. Der Transfer der RNA auf die Membran wurde bei 50 mbar über einen Zeitraum von zwei Stunden durchgeführt, wobei das Gel ständig mit 10 x SSC-Lösung bedeckt war. Nach dem Transfer wurde die Membran für 10 Minuten auf Whatmann-Papier getrocknet und dann zweimal im UV-Crosslinker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) bei 125 mJ/cm<sup>2</sup> UV-fixiert. Jetzt wurden die ribosomalen RNA Banden und der Größenmarker über eine Methylenblaufärbung sichtbar gemacht. Die Membran wurde zwei Minuten in Färbelösung inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O entfärbt. Die angefärbten Banden wurden fotografiert und mit einem Stift markiert.

Für die folgende Sonden-Hybridisierung musste die RNA nun zuerst deglyoxiliert werden. Die Membran wurde dafür in ein Hybridisierungsröhrchen mit 20 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gegeben und 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nun wurden 20 ml Prähybridisierungslösung zur Membran gegeben. Die einstündige Prähybridisierung erfolgte bei 50 °C im Hybridisierungsofen. Nach Ablauf der Stunde wurden 1 µl DIG-markierter RNA-Sonde zugegeben und über Nacht bei 68° C hybridisiert.

### 2.4.3.5 Wasch- und Detektionsschritte, RNA-Hybridisierungen und Northern Blot

Nach der Hybridisierung der anti-*sense*-Sonde mit der RNA wurde die Membran zuerst zweimal 15 Minuten bei RT in Waschlösung A, zweimal 25 Minuten bei 65 °C in Waschlösung B und anschließend zwei Minuten bei RT in Waschlösung C gewaschen. Nun erfolgte die Blockierung der Membran mit 20 ml 1 x Blockierungslösung während einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Anschließend wurde das Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim) 1:10.000 in der 1 x Blockierungslösung verdünnt und die Membran wurde weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Zum Entfernen von nicht gebundenem

Antikörper-Konjugat wurde dreimal 20 Minuten bei RT mit Waschlösung C gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 Minuten in Detektionspuffer äquilibriert und zum Nachweis der Hybridisierung wurde die Membran mit CSPD-Reagenz (Roche, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:100 in Detektionspuffer benetzt. Die Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschweißt und 15 Minuten im Dunklen bei 37 °C inkubiert. Danach wurde eine weitere Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit war die Lumineszenz stark ausgebildet und die Signale wurden über den Fuji *luminescent image analyzer* LAS 100 (Raytest, Straubenhardt, Germany) detektiert. Für die Auswertung der Signale wurde die Software AIDA 2.0 (Raytest, Straubenhardt, Germany) benutzt.

### Waschlösung A:

2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

### Waschlösung B:

0,2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

### Waschlösung C:

Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween 20

### 20 x SSC:

3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat, pH 7,0 (mit HCl)

für 10 x SSC-Lösung wurde entsprechend in RNase-freiem Wasser verdünnt.

### Maleinsäurepuffer:

0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 (mit NaOH)

### Praehybridisierungs-/ Hybridisierungslösung:

für 100 ml: 50 ml Formamid, 20 ml 10 x Blocking-Reagenz, 25 ml 20 x SSC, 1 ml Na-Lauroylsarkosinat (10 % (w/v), 200 µl SDS 10 %ig (w/v), ad 100 ml Wasser.

### 10 x Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics) wurde in 100 ml Maleinsäurepuffer durch Erwärmen gelöst. Für eine 1 x Blockierungslösung wurde die fertige Lösung in Maleinsäurepuffer weiter verdünnt.

Detektionspuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH 9,0 (mit NaOH)

10xElektrophoresepuffer:

Lösung A: 27,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ad 1l  $\text{H}_2\text{O}$  (0,2 M)

Lösung B: 34,8g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ad 1l  $\text{H}_2\text{O}$  (0,2 M)

255 ml Lösung A mit 245 Lösung B mischen und auf einen Liter mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen. Der pH-Wert sollte bei 6,8 liegen.

Auftragspuffer:

50 % (v/w) Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau in 1x Phosphatpuffer

Methylenblau Färbelsg.

0,5 M Na-Acetat, 5 % Essigsäure, 0,04 % Methylenblau

Glyoxal-Deionisierung:

Ein 2 ml Eppendorfgefäß wurde zu einem Drittel mit AG 501-x8 Resin (Biorad, München) gefüllt und mit Glyoxal aufgefüllt. Nach dreiminütiger Inkubation wurde das Glyoxal in ein neues Eppendorfgefäß mit AG 501-x8 Resin überführt und wiederum 3 Minuten inkubiert. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis der pH-Wert des Glyoxals bei ca. 5 lag. Das Glyoxal wurde dann schnell à 20  $\mu\text{l}$  aliquotiert und in  $\text{N}_2$  schockgefroren. Gelagert wurden die Aliquots bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

2.4.3.6 RNase-freier DNase-Verdau

Um RNA-Proben für *real-time*-PCR oder Northern-Blot Experimente von DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde ein RNase-freier DNase-Verdau mit TURBO-DNase (Ambion, Austin, USA) durchgeführt. Hiefür wurde die RNA-Probe nach der Präparation mit dem Nucleo Spin RNA II Kit in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  10 x Puffer und 1  $\mu\text{l}$  (2 Units) DNase zugegeben und 30 Minuten bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Darauf wurde eine zweite Aufreinigung der RNA mit dem Nucleo Spin RNA II Kit durchgeführt.

#### 2.4.3.7 Quantitative *real-time*-PCR

Die *real-time* RT-PCR Experimente wurden im ICycler (Biorad, München) mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QiaGen, Hilden) durchgeführt. Es wurde die relative Veränderung in der Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* zu verschiedenen Zeitpunkten und Bedingungen untersucht. Als Referenzgen diente *aceE*, dessen Transkription nicht durch die externe Osmolalität verändert wird (Weinand, 2004). Eine RT-PCR-Reaktion enthielt jeweils 50ng DNA-freier Gesamt-RNA als Template. Die restlichen Bestandteile eines RT-PCR-Ansatzes (Puffer, Polymerase, usw..) wurden nach Angaben des Herstellers zugegeben. Um Pipetierfehler und Messfehler der Fluoreszenz auszugleichen, enthielt jede Probe außerdem 10  $\mu$ M Fluorescein. Das benutzte *real-time* PCR-Programm gestaltete sich folgendermaßen: Im ersten Schritt erfolgte die Übersetzung der mRNA in cDNA bei 50 °C für 30 Minuten. Danach erfolgte die Denaturierung des DNA/RNA Hybrids bei 95 °C für 13,5 Minuten. In diesem Schritt wurde gleichzeitig über Fluorescein die Grundfluoreszenz in den einzelnen Proben gemessen. Anschließend erfolgte die Amplifikation der cDNA in 40 Zyklen à: 15 sec 94 °C, 30 sec 59 °C und 30 sec 72 °C. Im letzten Schritt von jedem Zyklus wurde der Anstieg der Fluoreszenz, der durch die Einlagerung des SYBR Green Farbstoffes in die DNA detektierbar wird, in den einzelnen Proben gemessen. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente betrug jeweils ca. 100 Basen, da nur so eine gleichbleibende Effizienz der Polymerase gewährleistet werden kann. Im Anschluss an die 40 PCR-Zyklen wurde für jede Probe eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um das entstandenen Produkt zu kontrollieren. Alle Proben wurden jeweils als Dreifachbestimmungen vermessen. Die Qualität der Läufe wurde jeweils über PCR und *no template*-Kontrollen gewährleistet. Zur Auswertung der einzelnen Läufe wurde jeweils der Bereich der linear-logarithmischen Produktbildung bestimmt, bei der das Signal aus der Hintergrundfluoreszenz hervortrat ( $C_t$ -Wert). Für eine späteren Normalisierung der erhaltenen Daten auf das Referenzgen mussten die PCR-Effizienzen für alle Produkte ermittelt werden. Hierfür wurden für jedes Primerpaar eine DNA-Verdünnungsreihe über 4 dekadische Potenzen (1-1000 ng DNA) aufgestellt und anschließend als Dreifachbestimmung vermessen.

Die Auswertung und statistische Analyse aller gewonnen Daten erfolgte mit dem Programm REST©version2 (*Relative Expression Software Tool*).

#### 2.4.4 DNA-Microarrays

Um die globalen Veränderungen im Transkriptom von *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock zu untersuchen, wurden DNA-Microarray Experimente

durchgeführt. Die DNA-Microarrays wurden vom Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt und dort gemäß Hüser *et al.* (2003) produziert. Es wurden kompetitive Hybridisierungen mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNA-Populationen durchgeführt, die jeweils einer Referenz und einer Testbedingung entsprachen.

### cDNA-Synthese und Labelling

Die DNA-freie Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde nach Hüser *et al.* (2003) über eine indirekte *Labelling*-Technik fluoreszenzmarkiert, indem während einer reversen Transkription Aminoallyl-Nukleotide (aa-dUTP) in die cDNA eingebaut wurden. Für einen 30 µl-Ansatz wurden 5,8 µg der Gesamt-RNA mit 2,5 µg 5'-aminomodifizierten Hexameren vermischt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Die Nukleinsäuren wurden anschließend zum *Primerannealing* 5 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die reverse Transkription durch Zugabe von je 0,5 mM dNTPs, 0,8 mM aa-dUTP (Sigma, Taufkirchen, D), 3 µl 100 mM DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, D), 300U *SuperScript RNase H Reverse Transkriptase* (Invitrogen, Karlsruhe, D) und 6 µl *First-strand-Puffer* (Invitrogen) gestartet wurde. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42 °C erfolgte die Zugabe von je 10 µl 0,5 mM EDTA und 10 µl 1M NaOH. Die RNA wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 70 °C im basischen Milieu hydrolysiert und der Reaktionsansatz anschließend durch die Zugabe von 10 µl 1M HCl neutralisiert. Die synthetisierten cDNAs wurden mit dem *MinElute PCR Purification*-Kit (Qiagen, Hilden, D) gereinigt und in 24 µl destilliertem H<sub>2</sub>O (pH = 8,0) eluiert. Nach der Kontrolle der cDNA über eine Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl 1M Natriumbicarbonat (pH = 9,0) zugegeben und die cDNA wurde mit Aliquots von Cy3- oder Cy5-monofunktionellen NHS-Estern (Amersham Biosciences, Freiburg, D) gemischt. Deren Herstellung erfolgte nach Hüser *et al.* (2003). Die Ansätze wurden 30 Minuten im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Während dieser Zeitspanne wurden die Fluoreszenzfarbstoffe an die Aminoallylgruppen gekoppelt. Nicht in Nukleinsäuren eingebaute NHS-Ester wurden durch Zugabe von 4,5 µl Hydroxylamin für 15 Minuten im Dunkeln *gequencht* und durch eine Aufreinigung mit dem *MinElute PCR Purification*-Kits aus dem System entfernt.

### DNA-Microarray-Hybridisierung

Vor der Hybridisierung mussten die Slides zuerst vorbereitet werden. Dafür wurden die Arrays 5 Minuten in 2 % SDS inkubiert und anschließend dreimal in MilliQ-Wasser gewaschen. Es folgte eine Inkubation bei 50 °C in MilliQ-Wasser für 30 Minuten. Darauf

wurden die Slides für 5 Minuten in kochendes MilliQ-Wasser überführt. Anschließend wurden die Slides kurz in 70 % Ethanol gewaschen und trocken zentrifugiert für 3 Minuten bei 185g. Nun konnten die Slides vorhybridisiert werden. Dafür wurden die DNA-Microarrays 45 min in DIG Easy-Hyb (Roche Diagnostics) inkubiert. Einem einminütigem Waschschrift in MilliQ-Wasser folgte ein kurzer Waschschrift in 70 % Ethanol. Anschließend wurden die DNA-Microarrays 3min bei 185 g zentrifugiert. Zur Vorbereitung der cDNAs wurden die zu vergleichenden Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben miteinander gemischt und vakuumgetrocknet. Vor der Hybridisierung erfolgte die Resuspension in 75 µl Hybridisierungslösung und die Denaturierung der Nukleinsäuren für 5min bei 65 °C. 70 µl der cDNA-Lösung wurde luftblasenfrei auf den prähybridisierten DNA-Microarray pipettiert und mit einem Glasträger bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in einer *in situ*-Hybridisierungskammer (TeleChem International, Sunnyvale, USA) für 16h bei 42 °C. Danach wurde der Glasträger vorsichtig entfernt und der DNA-Microarray nach Hüser *et al.* (2003) gewaschen.

### Signaldetektion und Auswertung

Nach der Zentrifugation (3min, 185xg) im Anschluss an alle Waschschriftte erfolgte die Signaldetektion mit einem *ScanArray 4000* Microarray Scanner (Perkin-Elmer, Boston USA), indem beide Fluoreszenzfarbstoffe getrennt voneinander angeregt und detektiert wurden. Die erhaltenen Bilder wurden zur Signal-Hintergrund-Zuordnung, Spottedetektion und Quantifizierung mit dem Programm *ImaGene* (Version 5.0, Biodiscovery, Los Angeles, USA) bearbeitet. Im Anschluss daran wurde zur Normalisierung der Daten und zur statistischen Analyse via t-Test die *EMMA* Microarray Datenanalyse-Software (Dondrup *et al.*, 2003) verwendet.

## **2.5 Biochemische Methoden**

### **2.5.1 Untersuchung der internen Aminosäurekonzentrationen .**

#### Anzuchtbedingungen für Osmoschock Experimente:

Für eine Untersuchung der internen Konzentrationen an Prolin, Glutamat und Glutamin im Wildtyp und in den Stämmen 13032 $\Delta$ *proA*, 13032 $\Delta$ *proC* und 13032 $\Delta$ *mtrAB* wurden folgende Anzuchtbedingungen verwandt: Die entsprechenden Stämme wurden am Vortag der Untersuchung jeweils von BHI-Platte in BHI-Medium angeimpft und über Tag bei 30 °C und



125 rpm inkubiert. Nach 8 Stunden wurde mit diesen Zellen MMI-Medium mit 300 mM NaCl (für 13032 $\Delta$ *mtrAB* CgXII-Medium), das mit 10 mM Prolin versetzt war, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach 14 Stunden wurde aus dieser Kultur eine neue MMI-Kultur mit einem Zusatz von 300 mM NaCl auf eine OD<sub>600</sub> von 2 angeimpft und bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (mit einer OD<sub>600</sub> von 6-7) wurden zweimal 1 ml Zellen von der Kultur als Probe entnommen (Referenzwert vor dem Schock). Nun wurde die Kultur durch Zugabe von 750 mM NaCl einem osmotischen Schock unterworfen. Nach dem osmotischen Schock wurden in kurzen Abständen weitere Proben aus der Kultur entnommen und das weitere Wachstum verfolgt.

### Anzuchtbedingungen für Prolin-/Leucinpuls Experimente:

Für eine Untersuchung der internen Konzentrationen an Prolin, Glutamat und Glutamin im Wildtyp und in den Stämmen 13032 $\Delta$ *proA*, 13032 $\Delta$ *proC*, 13032 $\Delta$ *proB*, 13032 $\Delta$ *leuC* und 13032 $\Delta$ *mtrAB* wurden folgende Anzuchtbedingungen verwandt: Die entsprechenden Stämme wurden am Vortag der Untersuchung jeweils von BHI-Platte in BHI-Medium angeimpft und über Tag bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach 8 Stunden wurde mit diesen Zellen MMI-Medium mit verschiedenen Osmolalitäten (für 13032 $\Delta$ *mtrAB* CgXII-Medium) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 überimpft. Das Medium enthielt jeweils 10 mM Prolin für die Stämme WT, 13032 $\Delta$ *proA*, 13032 $\Delta$ *proC*, 13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *mtrAB*, für den Stamm 13032 $\Delta$ *leuC* war es mit 10 mM Leucin versetzt. Die Stämme wurden über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach 14 Stunden wurden aus den ausgewachsenen Kulturen jeweils neue MMI-Kulturen ohne Zusatz von Prolin oder Leucin auf eine OD<sub>600</sub> von 2 angeimpft und bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach Inkubation für 4 Stunden wurden jeweils zweimal 1 ml Zellen von der Kultur als Probe entnommen (Referenzwert vor der Aminosäurezugabe). Nun erfolgte der entsprechende Aminosäurepuls. Abschließend wurden in kurzen Abständen weitere Proben aus der Kultur entnommen und das Wachstum verfolgt

### Probenentnahme und Aufarbeitung:

Je 1 ml Kultur wurde über eine Absauganlage (Hölzl, Dörfen) auf einen Glasfaserfilter (Millipore) abgesaugt. Durch zweimaliges Spülen mit je 2 ml isoosmolarem MOPS-Puffer wurden die Zellen auf dem Filter gewaschen. Anschließend wurde der Filter mit den Zellen in ein Eppendorf-Gefäß übertragen. Nun erfolgte der Aufschluss der Zellen in einer 0,1 %igen

(w/v) Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid-Lösung (CTAB) über einen Zeitraum von 10 Minuten. Nach Entnahme des Filters wurden die Zelltrümmer bei 15300 rpm und 20 °C für 15 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei – 20 °C gelagert.

Messung der internen Aminosäuren:

Die Messung der internen Konzentrationen von Glutamat, Glutamin und Prolin erfolgte durch Auftrennung an der HPLC Typ HP 1100 (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn). Es wurde eine *reversed-phase* HPLC mit einer Vorsäule (40 x 4 mm Nucleodur 100-5 C-18 ec von Machery und Nagel, Düren) und einer Hauptsäule (EC 125/4 Nucleodur 100-5 C-18 ec von Machery und Nagel, Düren) durchgeführt. Die Derevatisierung (Schuster, 1988) der Aminosäuren erfolgte mit o-Phthaldialdehyd 2-Mercaptopropionsäure und 9-Fluorenylmethyl-Chlorformiat. Die mobile Phase bestand aus 40 mM Natriumacetat pH 6,2 mit einem Zusatz von 5 % Methanol/Acetonitril (1/1; v/v) (Puffer A) und aus Acetonitril/Methanol (1/1; v/v) (Puffer B). Tabelle 5 zeigt die Gradienten der Laufmittel. Nach der Auftrennung erfolgte die Detektion der derevatisierten Aminosäuren am Fluoreszenzdetektor HP1100 *series fluorescence detector*. Die Anregungswellenlänge betrug 230 nm und die Emissionswellenlänge 450 nm für primäre Aminosäuren, für sekundäre Aminosäuren wurde eine Anregungswellenlänge von 266nm und eine Emissionswellenlänge von 310nm verwendet. Die Bestimmung der internen Konzentrationen wurde über Vergleichsläufe mit Aminosäurestandards der Konzentrationen 100 µM, 200 µM, 300 µM und 400 µM erzielt. Die erhaltenen Konzentrationen wurden anschließend auf das Gewicht der Biotrockenmasse der Zellen bezogen, wobei sich die BTM nach der Formel:  $BTM = 0,36 * OD_{600}$  [g/l] errechnete.

Tabelle 5: Lauffmittelgradient für die HPLC Analyse

<b>Zeit [min]</b>	<b>Puffer A [%]</b>	<b>Puffer B [%]</b>	<b>Fluss [ml/min]</b>
0	90	10	1
3	80	20	1
3,5	70	30	1
5,5	62	38	1
7	35	65	1
8,8	0	100	1
10,8	0	100	1

### 2.5.2 DNA-Affinitätsreinigung

Die DNA-Affinitätsreinigung diente zur Suche von Proteinen, die in der Promotorregion von *proA*, *proB* oder *proC* binden. Als Affinitätsmatrix wurden magnetische Kügelchen, Dynabeads<sup>®</sup>M-280 Streptavidin (DynaL, Oslo, Norway), verwendet, an die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung DNA-Fragmente gekoppelt wurden. Die DNA-Fragmente enthielten jeweils die putative Promoterregion des untersuchten Gens.

#### Erstellung der Affinitätsmatrix

Um genug Material für die Kopplung zu erhalten, wurden die DNA-Fragmente über PCR generiert, wobei jeweils ein 5'-Biotin markierter Primer verwendet wurde. Für die PCR-Ansätze wurde das MasterMix-Kit (QiaGen) verwendet. Als Template diente chromosomale DNA aus *C. glutamicum*. Es wurden jeweils 20 PCR-Reaktionen (je 50 µl) vereinigt und über eine Microcon-30 Säule (Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert und gereinigt. Hierfür wurde die DNA auf die Säule gegeben und 12 Minuten bei 12000RCF und RT zentrifugiert, anschließend wurde dreimal mit 500 µl 1 x DNA Bindepuffer gewaschen. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte, nach Umdrehen der Säule, bei 1000 RCF und RT für 4 Minuten. Für die Kopplung wurden nun die *beads* vorbereitet. Es wurden 4 mg *beads* (10 mg/ml) durch Magnetseparation von Lagerpuffer getrennt. Anschließend wurde zuerst zweimal mit je 500 µl 1 x PBS pH 7,4 + 0,1 % BSA und danach zweimal mit je 500 µl 2 x DNA-Bindepuffer gewaschen. Abschließend wurden die *beads* in 1 x DNA-Bindepuffer aufgenommen. Das Volumen wurde so gewählt, dass die Endkonzentration der *beads* bei 10-20 mg/ml lag. Jetzt wurde die gereinigte und biotinylierte DNA zugegeben und 30 min bei RT und 500 rpm im Thermoblock inkubiert. Nach der Kopplung wurden die *beads* dreimal mit 500 µl 1 x DNA-Bindepuffer gewaschen und anschließend in TE-Puffer mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> bei 4 °C gelagert. Die Qualität der Kopplung wurde jeweils über eine Gelelektrophorese (vgl. DNA-Menge vor und nach Bindung) kontrolliert.

#### Herstellung des Proteinextraktes

Für die Herstellung des Rohextraktes wurden verschiedene Bedingungen getestet (siehe Ergebnisteil), wobei die Standardanzucht folgendermaßen aussah:

Der Wildtyp wurde über Tag in BHI Medium (30 °C, 125 rpm) angezogen und über Nacht an MMI Medium (30 °C, 125 rpm) angepasst. Nach 14 Stunden wurde aus der Kultur in 11 MMI-Medium der entsprechenden Osmolalität (siehe Ergebnissteil) auf eine OD<sub>600</sub> von 2 überimpft. Nach Wachstum (30 °C, 125 rpm) der Kultur auf OD<sub>600</sub> 6 wurde je nach Bedingung ein

Salzschock durchgeführt. Es wurde weitere 60 Minuten bei 30 °C, 125 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Beckman-Zentrifuge 4 °C, 4500 rpm, 13 min, Rotor J1a 10.500) und direkt auf Eis gestellt. Die Zellen wurde dann in 4 ml eiskaltem Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte an der *Fast-Prep* (5 \* 30 sec bei 6,5 <sup>m</sup>/sec) mit anschließendem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (4 °C, 15300 rpm, 4min). Der erhaltene Überstand wurde erneut zentrifugiert, um die Membranen abzutrennen (4 °C, 80000 rpm, 30 min, Rotor TLA 100.4). Nach dieser Zentrifugation wurde der Proteinextrakt abgenommen und in N<sub>2</sub> schockgefroren. Das Endvolumen betrug ca. 4 ml.

### Proteinreinigung über die DNA-Affinitätsmatrix

Alle Schritte der Proteinreinigung wurden (soweit nicht anders angegeben) auf Eis und im Kühlraum (4 °C) durchgeführt.

Als erstes wurden die *beads* dreimal mit je 500 µl 1 x DNA Bindepuffer gewaschen und anschließend kurz in Proteinbindepuffer äquilibriert. Nach folgender Magnetseparation wurden die *beads* im Rohextrakt (ca. 1,5 ml) resuspendiert und 45 Minuten geschüttelt. Darauf wurde der Rohextrakt abgenommen und die *beads* wurden einmal mit 500 µl Proteinbindepuffer für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die *beads* ein weiteres mal für 45 Minuten in einem frischen Rohextrakt unter Schütteln inkubiert. Vor der Elution wurden unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl Proteinbindepuffer entfernt. Dann erfolgte die Elution gebundener Proteine mit ansteigender NaCl-Konzentration (von 200 bis 1000 mM) in Elutionspuffer. War die Bindung der Proteine bei einer höheren Osmolalität erfolgt, so wurde die NaCl-Konzentration im Elutionspuffer entsprechen angepasst. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug jeweils 20 µl.

### Proteinbindepuffer:

TrisHCl	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
NaCl	var. (Standard: 100 mM)
Glycerin	10 %(v/v)
Triton X 100	0,05 % (w/v)
Complete	400 µl in 10 ml Volumen

2xElutionspuffer:

TrisHCl	40 mM
EDTA	2 mM
DTT	2 mM
NaCl	var.
Glycerin	20 % (v/v)
Triton X 100	0,1 % (w/v)
Complete	400 µl in 25 ml Volumen

Aufschlusspuffer:

TrisHCl	50 mM
KCl	70 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Complete	400 µl in 10 ml Volumen

2xDNA Bindepuffer:

NaCl	2M
EDTA	1 mM
TrisHCl pH 7,5	10 mM

### 2.5.3 SDS-Gelelektrophorese und Analyse prominenter Proteinbanden

Die bei der DNA-Affinitätsreinigung erhalten Proteine wurden als erstes über eine denaturierende SDS-PAGE (Lämmli) der Größe nach aufgetrennt. Als Gelsystem diente ein 15 %iges Trenngel und ein 6 %iges Sammelgel (siehe Tabelle 6). Nach dem Gellauf wurde eine kolloidale Coomassie Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988) durchgeführt. Hierfür wurde das Gel zuerst zwei Stunden in Methanol (40 %) / Essigsäure (10 %) fixiert. Anschließend wurde kurz in H<sub>2</sub>O gespült und über Nacht in Färbelösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit H<sub>2</sub>O entfärbt. Das Färben/ Entfärben der Gele wurde drei bis viermal wiederholt. Anschließend wurden prominente Proteinbanden ausgeschnitten und zur Identifizierung an das ZMMK gegeben. Hier erfolgte zuerst ein tryptischer Verdau der Proteine. Danach wurde die Masse der daraus resultierenden Proteinfragmente über MALDI-tof-MS bestimmt. Die Zuordnung des *Peptide Mass Fingerprint* zu den entsprechenden Leserahmen im Genom von *C. glutamicum* erfolgte dann über eine Datenbanksuche mit Mascot.

Tabelle 6: SDS Trenn- und Sammelgel

<i>Trenngel</i>		<i>Sammelgel</i>	
Lsg.	Volumen	Lsg.	Volumen
Acrylamid 30 % Bisarylamid 0,8 %	5 ml	Acrylamid 30 % Bisarylamid 0,8 %	0,8 ml
1,5 M TrisHCl pH 8,8 8 mM EDTA, 0,4 % SDS	2,5 ml	0,5 M TrisHCL pH 6,6 8 mM EDTA, 0,4 % SDS	0,83 ml
H <sub>2</sub> O	2,3 ml	H <sub>2</sub> O	1,7 ml
TEMED	5 µl	TEMED	3,3 µl
APS (10 %)	100 µl	APS (10 %)	50 µl

### Kolloidale-Coomassie-Färbelösung

Für die Kolloidale-Coomassie-Färbelösung wurden Lösung A und Lösung B im Verhältnis 98:2 gemischt, kräftig gerührt und mit 20 % Methanol versetzt.

#### Lösung A:

20 g 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

100 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>O auf 980

#### Lösung B:

5 % (w/v) Serva-Blau G-250

### **2.5.4 Messung von Osmolalitäten**

Die Osmolalitäten der benutzten Medien wurde mit dem Osmomat 030 (Gonotec) gemessen. Das Gerät misst die Osmolalität über die Gefrierpunktniedrigung in der Lösung. Zur Zweipunkteichung des Geräts diente eine 0,3 osm/kg NaCl-Lösung und dest. Wasser.

### III. Ergebnisse

#### 3.1 Akkumulation interner Aminosäuren unter Osmostress

*C. glutamicum* akkumuliert nach einem hyperosmotischen Schock intern hohe Mengen an Prolin durch Biosynthese (Ley, 2001; Rönsch, 2000; Frings *et al.*, 1993; Guillouet *et al.* 1995). Die Synthese von Prolin läuft dabei über die drei Enzyme  $\gamma$ -Glutamat-Kinase (*proB*), 4-Glutamyl-Phosphat-Reduktase (*proA*) und Pyrrolincarboxylat-Reduktase (*proC*) (Serebrijski *et al.*, 1995; Ankri *et al.*, 1996). Dass ein zweiter, nur bei hoher Osmolalität aktiver Weg existiert, konnte ausgeschlossen werden (Ley, 2001). Der interne Gehalt an Prolin wird in *C. glutamicum* also nur über die Regulation von einem Biosyntheseweg eingestellt. Dies wirft die Frage auf, durch welche kompatiblen Solute Prolin ersetzt wird, wenn die Synthese von Prolin nicht ( $\Delta$ *proC*) oder nur eingeschränkt ( $\Delta$ *proA*) möglich ist. Um dies zu untersuchen, wurden die entsprechenden Deletionsmutanten hyperosmotisch geschockt und die Akkumulation von Glutamat, Glutamin und Prolin mit der des Wildtyps verglichen. Die verschiedenen Stämme wurden jeweils in BHI-Medium vorkultiviert und dann über Nacht an MMI-Medium mit einem Zusatz von 10mM Prolin angepasst. Die ausgewachsenen Zellen wurden dann auf  $OD_{600} = 2$  in frisches MMI-Medium (ohne Prolin) der entsprechenden Osmolalität überimpft. Nach Inkubation der Zellen für 4 Stunden bei 30 °C und 125 rpm wurde dann der hyperosmotische Schock in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt und die Proben für die HPLC-Analyse wurden genommen.

Die entsprechenden Experimente wurden jeweils zweimal wiederholt und zeigten jeweils den gleichen zeitlichen Verlauf in Wachstum und Akkumulation interner Aminosäuren.

##### 3.1.1 Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg im Wildtyp

Der hyperosmotische Schock im Wildtyp stellt das Referenzexperiment dar, mit dem die anderen Stämme oder Bedingungen verglichen werden sollten. Durchgeführt wurde ein hyperosmotischer Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium. Die Osmolalität des Mediums wurde jeweils durch die Zugabe von NaCl eingestellt. Die Akkumulation interner Aminosäuren und das Wachstum unter diesen Bedingungen sind in Abbildung 4 zu sehen. Während der interne Gehalt von Glutamat nahezu konstant bei 300  $\mu$ mol/gBTM blieb, wurde kurzzeitig Glutamin und langfristig Prolin akkumuliert. Die interne Glutaminmenge war nach 45 Minuten mit 200  $\mu$ mol/gBTM am höchsten. Der interne Gehalt von Prolin stieg nach 30

Minuten von 180  $\mu\text{mol/gBTM}$  auf knapp 700  $\mu\text{mol/gBTM}$ . Diese Akkumulation dauerte drei Stunden. Im Wachstum zeigte der Wildtyp eine einstündige *lag*-Phase nach der Salzzugabe. Nach dieser Stunde waren die Zellen dann an die höhere Osmolalität adaptiert und wuchsen exponentiell weiter ( $T_d$  von 3,6 h). Insgesamt zeigte sich also, dass Prolin das dominierende kompatible Solut unter diesen Wachstumsbedingungen ist.

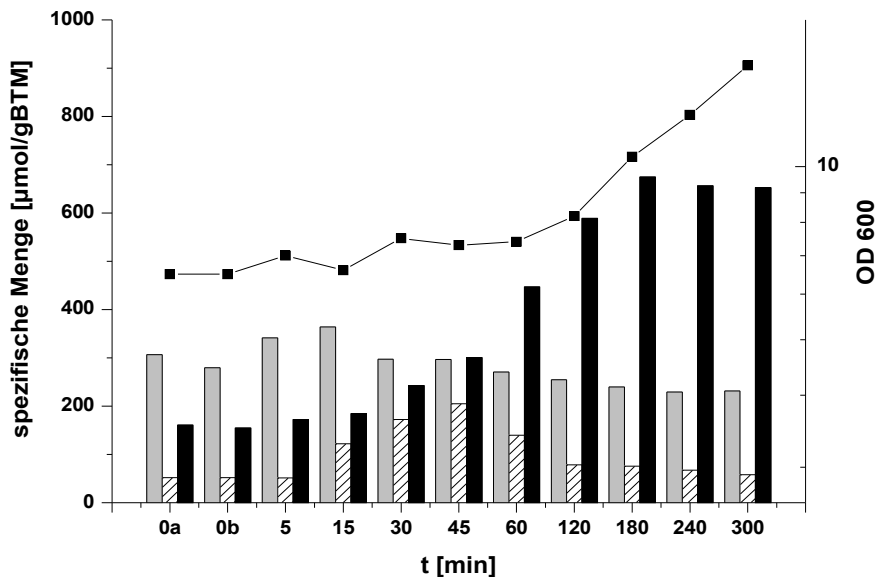


Abbildung 4: Wachstum und interne Akkumulation von Aminosäuren im Wildtyp nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium. Die Salzzugabe erfolgte nach  $T_{0AB}$ . Graue Säulen = Glutamat, schwarze Säulen = Prolin, gestreifte Säulen = Glutamin, Quadrate = OD<sub>600</sub>

### 3.1.2 Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in 13032 $\Delta proA$

Im Stamm 13032 $\Delta proA$  wurde untersucht, welche Aminosäuren von *C. glutamicum* akkumuliert werden, wenn nur eine geringe Synthese von Prolin stattfindet. Dies war möglich, da dem Stamm 13032 $\Delta proA$  ein Enzym im Prolinbiosyntheseweg fehlt. Die Funktion dieses Enzyms kann aber zum Teil durch den *asd bypass* ersetzt werden und macht so eine geringe Synthese von Prolin möglich. Für das Experiment wurde wie im Wildtyp ein hyperosmotischer Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium durchgeführt. Die Akkumulation interner Aminosäuren und das Wachstum von 13032 $\Delta proA$  ist in Abbildung 5 dargestellt. Der interne Gehalt von Prolin war für 13032 $\Delta proA$  vor und nach der Salzzugabe deutlich geringer als im Wildtyp. Eine starke Akkumulation von Prolin über den *asd bypass*



war dem Stamm 13032 $\Delta$ *proA* also nicht möglich. Das erreichte Maximum lag nach fünf Stunden bei knapp 140  $\mu\text{mol/gBTM}$ . Die interne Menge von Glutamat veränderte sich während dieser Zeit kaum und blieb bei einem Wert um 300  $\mu\text{mol/gBTM}$ . Eine starke Akkumulation zeigte dieser Stamm für die Aminosäure Glutamin. Für diese Aminosäure stieg die interne Menge nach dem Salzschock von  $\sim 70$   $\mu\text{mol/gBTM}$  auf ein Maximum von  $\sim 400$   $\mu\text{mol/gBTM}$  an. Diese hohe Akkumulation von Glutamin war im Gegensatz zum Wildtyp nicht kurzzeitig, sondern blieb langfristig erhalten. Im Wachstum verhielt sich der Stamm 13032 $\Delta$ *proA* ähnlich wie der Wildtyp. Die *lag*-Phase nach dem Salzschock dauerte eine Stunde, danach waren die Zellen an die höhere Osmolalität adaptiert und wuchsen exponentiell weiter. Die Verdopplungszeit war hier aber deutlich länger als für den Wildtyp und betrug 5,2 Stunden.

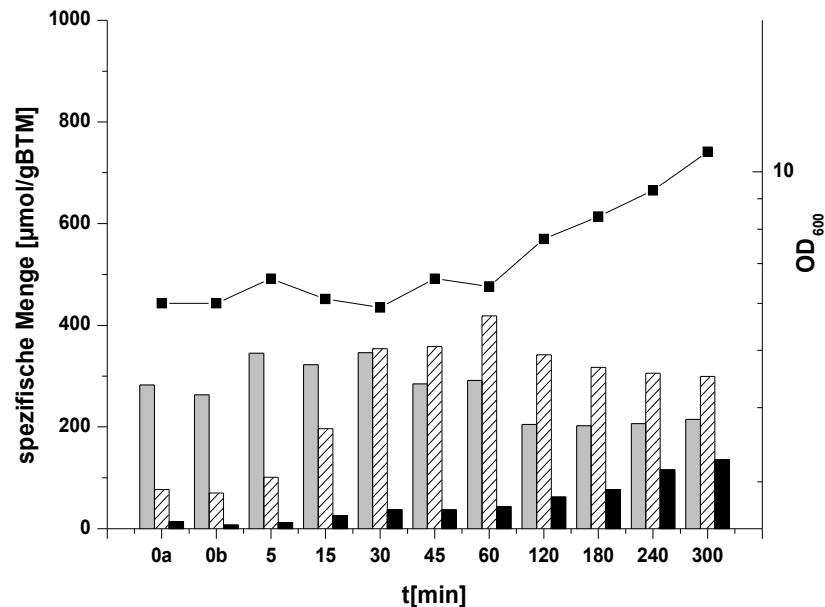


Abbildung 5: Wachstum und interne Akkumulation von Aminosäuren im 13032 $\Delta$ *proA* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium. Die Salzzugabe erfolgte nach  $T_{0A/B}$ . Graue Säulen = Glutamat, schwarze Säulen = Prolin, gestreifte Säulen = Glutamin, Quadrate =  $\text{OD}_{600}$

### 3.1.3 Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in 13032 $\Delta$ *proC*

Der Stamm 13032 $\Delta$ *proC* ist prolinauxotroph und hat keine Möglichkeit mehr zur Synthese von Prolin (Serebrijski *et al.*, 1995; Ankri *et al.*, 1996). Dieser Stamm war somit nicht mehr in der Lage, ohne die Zugabe von Prolin zu wachsen. Mit diesem Stamm wurde untersucht, wie

sich die Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Osmoschock ändert, wenn durch Prolinhunger bedingt kein Wachstum möglich ist. Das Experiment wurde wie im Wildtyp durchgeführt: ein hyperosmotischer Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. In diesem Fall erfolgte die Salzzugabe aber bei der Stagnation des Wachstums, die durch den internen Mangel an Prolin ausgelöst wurde und nicht bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase. Die Akkumulation interner Aminosäuren und das Wachstum von 13032 $\Delta$ *proC* ist in Abbildung 6 dargestellt. Der interne Gehalt von Glutamat war in diesem Stamm leicht erniedrigt und betrug ca 210  $\mu$ mol/gBTM. Nach dem Salzschock blieb er aber wie im Wildtyp und wie in 13032 $\Delta$ *proA* nahezu unverändert. Die interne Menge von Prolin lag bei  $\sim$ 10  $\mu$ mol/gBTM. Dieser geringe interne Pool an Prolin blieb über die gemessenen fünf Stunden in den Zellen stabil. Eine Neusynthese von Prolin fand nicht statt. Der interne Gehalt von Glutamin war deutlich höher als im Wildtyp, lag vor dem Salzschock schon bei  $\sim$ 130  $\mu$ mol/gBTM und stieg dann auf 400  $\mu$ mol/gBTM an. Wie in 13032 $\Delta$ *proA* wurde auch von 13032 $\Delta$ *proC* Glutamin in Anpassung an die hohe Osmolalität akkumuliert. Ein Wachstum war dem Stamm 13032 $\Delta$ *proC* aber dennoch nicht möglich, da Prolin für den Zellanabolismus fehlte.

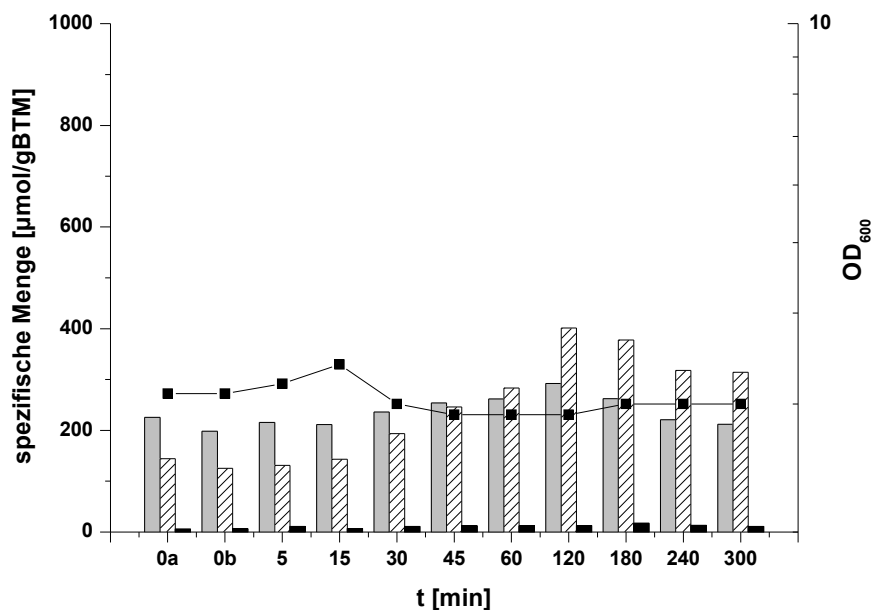


Abbildung 6: Wachstum und interne Akkumulation von Aminosäuren im 13032 $\Delta$ *proC* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium. Die Salzzugabe erfolgte nach  $T_{0A/B}$ . Graue Säulen = Glutamat, schwarze Säulen = Prolin, gestreifte Säulen = Glutamin, Quadrate =  $OD_{600}$

### 3.2 Charakterisierung der Transkription von *proA*, *proB*, und *proC*

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, spielt die Akkumulation von Prolin eine wichtige Rolle bei der Anpassung von *C. glutamicum* an hyperosmotischen Stress. Hier wurde nun untersucht, wie die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* in Abhängigkeit von der externen Osmolalität reguliert wird. Dass eine generelle Induktion der Gene durch die Zugabe von Salz erfolgt, konnte bereits gezeigt werden (Ley, 2001). Unbekannt war aber, ob eine graduelle Antwort der Transkription in Abhängigkeit von der Schockstärke möglich ist. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene hyperosmotische Schockbedingungen (3.2.1) und ein hypoosmotischer Schock (3.2.2) getestet.

#### 3.2.1 Auswirkung verschiedener Schockstärken auf die Transkription von *proA*, *proB* und *proC*

Die Transkriptionsregulation der Gene *proA*, *proB* und *proC* in Abhängigkeit von verschiedenen Salzkonzentrationen wurde im Wildtyp untersucht. Hierfür wurde ATCC13032 über Tag in BHI-Medium kultiviert und abends in MMI-Medium überimpft. Es wurden in diesem Fall die Osmolalitäten 0,3, 0,9 und 1,7 osm/kg benutzt. Die Einstellung der Osmolalitäten erfolgte jeweils durch Zugabe von Natriumchlorid zum Grundmedium. Nach 14 Stunden wurden die ausgewachsenen Kulturen auf identische frische MMI-Medien überimpft. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug ~2. Nach Inkubation bis zur exponentiellen Wachstumsphase wurde die Osmolalität der Medien durch Zugabe von NaCl unterschiedlich stark erhöht. Die Kulturen bei 0,36 osm/kg wurden einmal mit 300 mM NaCl (auf 0,9 osm/kg) und einmal mit 500 mM NaCl (auf 1,7 osm/kg) geschockt. Die Kultur bei 0,9 osm/kg erhielt 750 mM NaCl für eine Endosmolalität von 2,2 osm/kg und der Kultur bei 1,7 osm/kg wurde 250 mM NaCl zugefügt, um 2,2 osm/kg zu erreichen. Vor dem Salzschock (T<sub>0</sub>) und zu verschiedenen Zeitpunkten danach (T<sub>5</sub>-T<sub>180</sub>) wurden jeweils Zell-Proben genommen und deren RNA isoliert. Der Nachweis der mRNA-Transkripte erfolgte dann, nach Übertrag der RNA-Proben (3 µg pro Punkt) auf eine Nylonmembran, über dig-markierte-*antisense* RNA-Sonden. Das Ergebnis der Experimente ist in Abbildung 7 zu sehen. Wurden die Zellen einem moderaten osmotischen Schock von 0,36 auf 0,9 osm/kg unterworfen, so war eine leichte Erhöhung der Transkription nach 15 Minuten zu beobachten. Danach sank die Transkriptmenge wieder auf den basalen Level ab. Die stärkeren osmotischen *shifts* von 0,3 auf 1,7 osm/kg und von 0,9 auf 2,2 osm/kg führten zu vergleichbaren Veränderungen in

den Transkriptionsmustern. In beiden Fällen war eine deutliche Aktivierung der Transkription nach 30 und 60 Minuten zu beobachten. Der osmotische Schock von 1,7 zu 2,2 osm/kg führte hingegen zu keiner Veränderung in der Transkription der untersuchten Gene. Dies war zu vermuten, da in diesem Fall sowohl die relative als auch die absolute Veränderung in der Osmolalität am geringsten war.

Ein Vergleich der Grundexpression bei den verschiedenen Osmolalitäten kann hier nicht dargestellt werden, da die verschiedenen Blots unterschiedlich lange belichtet wurden. Die Belichtungszeiten wurden jeweils der Signalstärke und den Hintergrund des entsprechenden Blots angepasst.

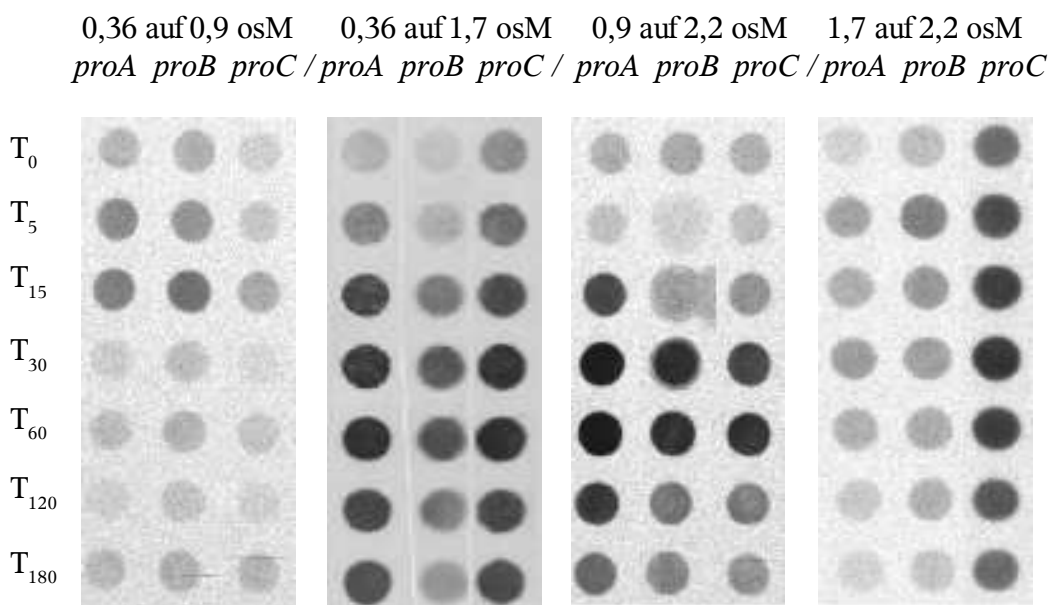


Abbildung 7: Transkription von *proA*, *proB* und *proC* nach verschiedenen Veränderungen in der externen Osmolalität. Alle Experimente wurden in MMI-Medium durchgeführt.

### 3.2.2 Regulation der Gene *proA*, *proB* und *proC* nach einem *downshock*

Werden Zellen hypoosmotischem Stress ausgesetzt, so findet ein Wassereinstrom statt und der Zellturgor steigt (Booth *et al.*, 1999). Solute, die in der Zelle akkumuliert wurden, müssen nun schnell aus der Zelle ausgeschleust werden, um ein Bersten der Zelle zu verhindern. Der Efflux der Solute läuft dabei über mechanosensitive Kanäle (Berrier *et al.*, 1992; Sukharev *et al.*, 1997). *C. glutamicum* transportiert unter solchen Bedingungen bevorzugt Prolin und Glycinbetain aus dem Cytoplasma (Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock *et al.*, 2003). Die interne Prolinmenge wird nach einem *downshock* also aktiv verringert, um das interne osmotische Potential zu erhöhen. Hier wurde nun untersucht, ob sich hypoosmotischer Stress auch auf die Expression der Gene *proA*, *proB* und *proC* auswirkt.

Für dieses Experiment wurde der Wildtyp in BHI-Medium vorkultiviert und dann über Nacht an eine Osmolalität von 1,7 osm/kg (MMI-Medium) angepasst. Nach 14 Stunden wurde dann auf MMI-Medium mit einer Osmolalität von 1,7 osm/kg überimpft und bis zur exponentiellen Phase inkubiert. Dann wurden die Zellen pelletiert und in gleichem Volumen MMI-Medium mit einer Osmolalität von 0,36 osm/kg resuspendiert. Vor ( $T_0$ ) und nach ( $T_5$ - $T_{180}$ ) Veränderung der Osmolalität wurden Zell-Proben genommen und die enthaltene RNA wurde isoliert. Die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* wurde anschließend über ein RNA-Hybridisierungsexperiment untersucht. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, führte der Wechsel zur geringeren Osmolalität zu einer verminderten Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC*. Dieser Effekt blieb für eine Stunde bestehen, was mit der Zeit der *lag*-Phase des Zellwachstums übereinstimmte (hier nicht dargestellt). Nach der Stunde stieg die Transkriptmenge von *proC* dann wieder an. Ein hypoosmotischer Schock führt also nicht nur zum Ausschleusen von Prolin aus der Zelle, es wird auch die Transkription der Gene für die Prolinbiosynthese reprimiert.

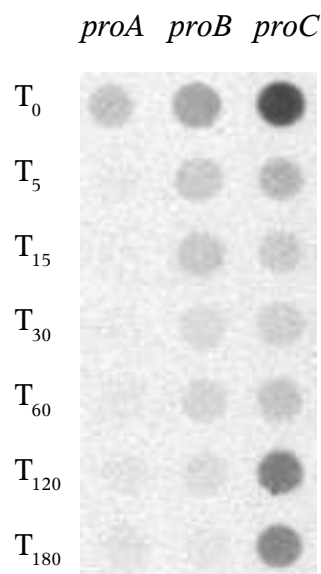


Abbildung 8: Transkription von *proA*, *proB* und *proC* nach einem hypoosmotischen Schock von 1,7 auf 0,36 osm/kg.

### 3.3 *Real-time*-PCR Analysen

In den RNA-Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* nach einem hyperosmotischen Schock induziert wird. Diese Hybridisierungsexperimente erlaubten aber keine genaue Aussage über den Induktionsfaktor

der Gene. Um die relativen Veränderungen der mRNA-Transkriptmengen zu quantifizieren, wurden *real-time-PCR* Analysen durchgeführt. Zur statistischen Absicherung dieser Experimente wurden alle verwendeten RNA-Proben jeweils als Dreifachbestimmungen gemessen.

### 3.3.1 Bestimmung der PCR-Effizienzen

Eine Voraussetzung zur mRNA Quantifizierung über *real-time-PCR* ist die Bestimmung der PCR-Effizienz für die benutzten Primerpaare. Die PCR-Effizienz gibt die Zuwachsrate in einem PCR-Zyklus während der linear-logarithmischen Produktbildung an. In diesem Bereich der Produktbildung werden bei der *real-time-PCR* einzelne Proben miteinander über den  $C_T$ -Wert verglichen. Die erhaltenen  $C_T$ -Werte sind hierbei der Menge an vorhandener mRNA proportional. Liegen mehr Kopien von einem Transkript vor, so wird der  $C_T$ -Wert kleiner. Die Korrelation zwischen  $C_T$ -Wert-Abnahme und -Zunahme der Kopienzahl eines Transkripts wird über die PCR-Effizienz hergestellt. Bei einer PCR-Effizienz von z.B. 2 entspricht eine Differenz von einem Zyklus einem Unterschied in der Transkriptmenge um den Faktor 2 und eine Differenz von zwei Zyklen einem Faktor von 4 (usw.). Um einen genauen Vergleich der mRNA-Mengen für *proA*, *proB*, *proC* und *aceE* möglich zu machen, wurden für diese Gene die PCR-Effizienzen bestimmt. Es wurden DNA-Verdünnungsreihen erstellt und für jedes Gen und jede DNA-Konzentration der  $C_T$ -Wert ermittelt. Die Bestimmung der  $C_T$ -Werte in Abhängigkeit von der DNA-Menge ist als Beispiel für *proA* in Abbildung 9 zu sehen. Die erhaltenen  $C_T$ -Werte wurden dann gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen (Abb. 10) und über die Steigung der Punkte wurde die PCR-Effizienz errechnet (siehe Tabelle 7).

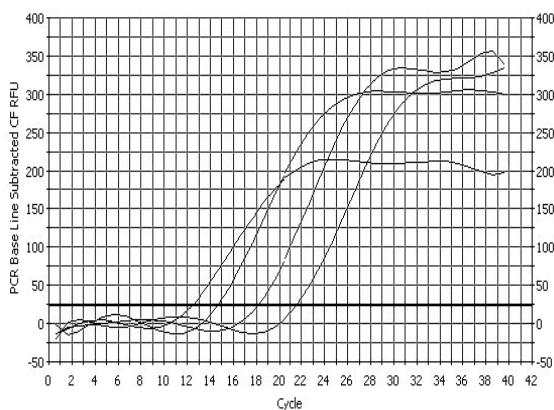


Abbildung 9: Bestimmung der  $C_T$ -Werte für *proA* in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge

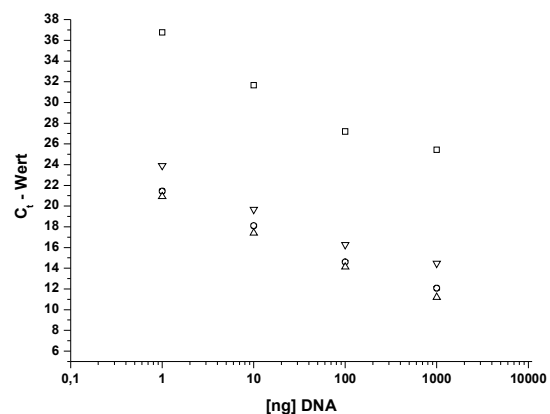


Abbildung 10: Bestimmung der PCR-Effizienz für *proA* (Kreise), *proB* (Dreiecke), *proC* (umgekehrte Dreiecke) und *aceE* (Quadrate).

Tabelle 7: PCR-Effizienz der verwendeten Primerpaare

	<i>proA</i>	<i>proB</i>	<i>proC</i>	<i>aceE</i>
<b>PCR-Effizienz</b>	2,07	2,03	2,07	1,82
<b>Korrelation</b>	-1	-1	-0,99	-0,98

Für die Gene *proA*, *proB* und *proC* ergab sich eine PCR-Effizienz von nahezu 2 und für *aceE* eine Effizienz von 1,82. Die so ermittelten Werte wurden für die Bestimmungen der relativen Transkriptmengen (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3) benutzt.

### 3.3.2 Relative Veränderung der Transkriptmenge nach einem hyperosmotischen Schock

Zur Bestimmung der relativen Änderungen der Transkriptmengen von *proA*, *proB* und *proC* nach einem osmotischen Schock wurden *real-time*-PCR-Experimente durchgeführt, beschrieben in Abschnitt 2.4.3.7. Für jedes Gen wurde pro Reaktionsansatz ein ~100 bp großes Fragment amplifiziert. Es wurden RNA-Proben von Zellen vor und 60 Minuten nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg verwendet. Das gewählte Referenzgen, das durch einen Osmoschock nicht beeinflusst werden sollte, war *aceE* (Pyruvat-dehydrogenase) (Weinand, 2004). Die Bildung der PCR-Produkte in den Reaktionsansätzen wurde über den Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Als interkalierender Farbstoff wurde SYBR Green I benutzt, der sich in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA einlagert und seine Fluoreszenz dabei um ein Vielfaches verstärkt. Nach Abschluss der Messung wurde die erste Auswertung der Daten mit der I-Cycler-Software durchgeführt. Die Hintergrund-Fluoreszenz, die in den einzelnen Reaktionen vorlag, wurde von der Software automatisch entfernt. Dafür wurde vor Beginn der *real-time*-PCR die Grundfluoreszenz in den einzelnen Proben gemessen. Um die entsprechenden Transkriptmengen in den einzelnen Proben zu bestimmen, wurde aus der linear-logarithmischen Phase der Produktbildung (meist ein Bereich von 4 bis 5 Zyklen während der gesamten PCR) über die Software der Zyklus ( $C_t$ -Wert) extrapoliert, bei dem das Produkt aus dem Hintergrund hervortrat. Im Anschluss an jede PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführte, um die Spezifität der PCR zu kontrollieren. Für alle Produkte war immer ein steiler Abfall in der Fluoreszenz bei Erreichen der Schmelztemperatur des PCR-Produktes zu beobachten. Dies zeigte, dass nur ein Hauptprodukt pro PCR-Ansatz gebildet wurde.

Folgende Formel wurde benutzt, um eine auf die PCR-Effizienz korrigierte und auf das Referenzgen normalisierte Auswertung der Daten zu erhalten:

$$R = \frac{(E_{\text{ziel}})^{\Delta C_t \text{ ziel (MEAN Kontrolle - MEAN Test)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref (MEAN Kontrolle - MEAN Test)}}$$

R = Faktor der Genregulation,  $E_{\text{ziel}}$  = PCR Effizienz Zielgen,  $E_{\text{ref}}$  = PCR Effizienz Referenzgen

$\Delta C_{\text{ziel/ref}}$  = Differenz der  $C_t$  Werte bei verschiedenen Bedingungen

Die drei unabhängig voneinander durchgeführten *Upshock*-Experimente ergaben folgende Regulationsfaktoren für die Gene *proA*, *proB* und *proC* (Tabelle 8):

Tabelle 8: Regulationsfaktoren nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

	<i>Upshock I</i>	<i>Upshock II</i>	<i>Upshock III</i>
<i>proA</i>	3,1 *	1,6	4,9 *
<i>proB</i>	1,8	1,1	2,5 *
<i>proC</i>	2,5 *	2,7 *	4,6 *
* Signifikante Regulation, p-Wert < 0,05			

Obwohl die Größenordnung der Regulationsfaktoren variierte, zeigen diese Ergebnisse eine deutliche Regulation der Gene *proA* und *proC* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. Der Faktor der Transkriptionsaktivierung lag für *proA* bei 3,1 bis 4,9 und für *proC* zwischen 2,5 und 4,6. Für das Gen *proB* konnte in diesen Analysen kein einheitliches Ergebnis gewonnen werden. Nur in einem der drei Experimente zeigte sich eine signifikante Induktion (Tabelle 8., UpshockIII).

### 3.3.3 Vergleich der Transkriptmenge bei osmotisch adaptierten Zellen

Die Methode der quantitativen *real-time*-PCR wurde auch benutzt, um einen genauen Vergleich der Gentranskription von *proA*, *proB* und *proC* in osmotisch adaptierten Zellen durchzuführen. Hierfür wurde *C. glutamicum* in Minimalmedium angezogen und dann zum einen an eine Osmolalität von 0,36 osm/kg und zum anderen an eine Osmolalität von 2,2 osm/kg angepasst. Von jeder Kultur wurden anschließend zwei Proben gezogen und die



RNA wurde präpariert. Mit der erhaltenen RNA wurden dann die *real-time*-PCR-Experimente durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.3.7), um die Transkriptmengen zu vergleichen. Die erhaltenen C<sub>t</sub>-Werte wurden über die PCR-Effizienz bereinigt und auf das Referenzgen normalisiert. Das Referenzgen für diese Experimente war wiederum *aceE*. Die erhaltenen Regulationsfaktoren sind in Tabelle 9 angegeben. Man sieht, dass die Gene *proA* und *proB* in Zellen, die an hohe oder geringe Osmolarität angepasst sind, gleichbleibend transkribiert wurden. Nur das Gen *proC* war unter konstant hochosmolaren Bedingungen deutlich aktiviert. Der Faktor der Aktivierung lag bei 2,8. Dies deutet darauf hin, dass die Menge an vorhandener Pyrrolin-5-carboxylat-reductase einen wichtigen Regulationspunkt für die Akkumulation von Prolin darstellt.

Tabelle 9: Regulation von *proA*, *proB* und *proC* in osmotisch adaptierten Zellen.  
Vergleich 0,36 osm/kg zu 2,2 osm/kg

	<i>Vergleich I</i>	<i>Vergleich II</i>
<i>proA</i>	1,4	1,1
<i>proB</i>	1	1,2
<i>proC</i>	2,8 *	2,8 *
* p-Wert < 0,05		

### 3.4 Hemmung der Prolinakkumulation durch Chloramphenicol

Nach einem hyperosmotischen Schock akkumuliert *C. glutamicum* intern große Mengen Prolin. Zeitgleich mit dieser Akkumulation werden die Gene des Biosynthesewegs induziert. Ob die Neubildung von Enzymen des Biosynthesewegs aber wirklich notwendig für eine Akkumulation von Prolin ist, oder ob die vorhandenen Enzyme die Syntheseleistung übernehmen können, war unbekannt. Um dies zu untersuchen, wurde im Wildtyp die Proteinsynthese nach einem hyperosmotischen Schock unterbunden. Der Wildtyp wurde hierfür nach Anzucht in BHI über Tag und MMI über Nacht in MMI-Medium einer Osmolalität von 0,3 osm/kg kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden Chloramphenicol (50 µg/ml Endkonz.) und Natriumchlorid (1,05 M) zugegeben. Eine Kontroll-Kultur erhielt nur Natriumchlorid (1,05 M). Das Ergebnis, die interne Akkumulation von Prolin unter beiden Bedingungen, ist in Abbildung 11 zu sehen. Für die Kontrolle zeigte sich das gewohnte Bild, eine Akkumulation von Prolin, die nach drei Stunden ihr Maximum (650 µmol/gBTM) erreichte. Danach fiel die interne Menge von Prolin langsam wieder ab und

lag bei Erreichen der stationären Phase bei ca.  $350 \mu\text{mol/gBTM}$ . Für die Zellen, die mit Chloramphenicol inhibiert wurden, zeigte sich ein anderes Bild. Zwar war auch hier eine Akkumulation von Prolin zu beobachten, diese war aber deutlich geringer als in den Kontrollbedingungen. Die interne Menge stieg hier von 40 auf ein Maximum von  $180 \mu\text{mol/gBTM}$ , was auch nach drei Stunden erreicht wurde, an. Die vorhandenen Enzyme des Prolinbiosynthesewegs waren also nicht in der Lage, die Menge von Prolin zu akkumulieren, die im Wildtyp normalerweise nach einem hyperosmotischen Schock vorhanden ist. Eine Neusynthese der Enzyme ist für eine hohe Akkumulation von Prolin also notwendig. Andererseits zeigt der leichte Anstieg der internen Prolinmenge in den inhibierten Zellen, dass die vorhandenen Enzyme auf der Ebene der Aktivität reguliert werden. Dass diese Veränderung der internen Prolinmenge auf einer geringen Neusynthese von Enzymen beruht, ist unwahrscheinlich, da sich die optische Dichte der Kultur über einen Zeitraum von 24 Stunden nicht änderte. Man kann also von einer effektiven Inhibition der Proteinsynthese durch das zugegebene Chloramphenicol ausgehen.

Dieses Experiment zeigt also, dass die Induktion der Transkription notwendig ist, um einen hohen Pool an internem Prolin aufzubauen.

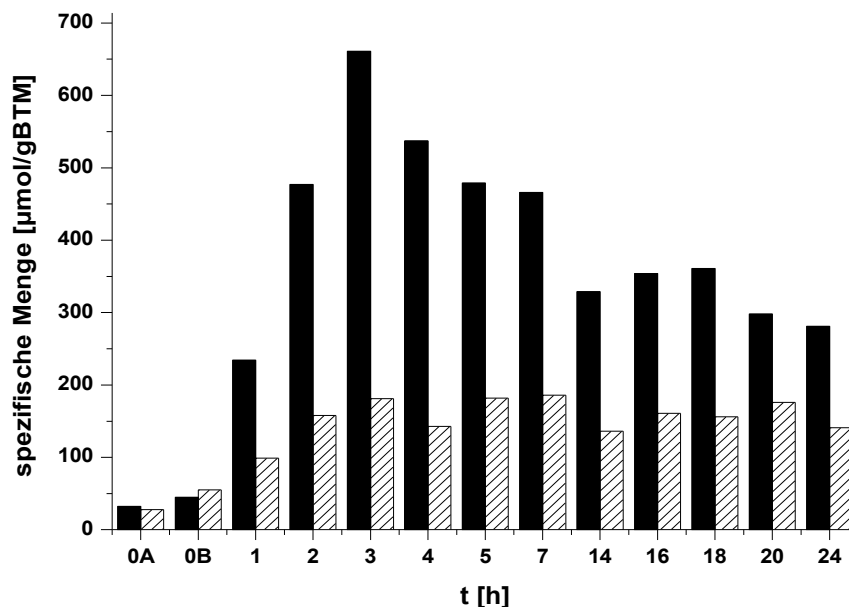


Abbildung 11: Interne Akumulation von Prolin im Wildtyp nach einem Schock von  $0,36$  auf  $2,2 \text{ osm/kg}$  in MMI. Schwarze Säulen = Kontrollbedingungen, gestreifte Säulen = Inhibition durch Chloramphenicol

### 3.5 Mögliche Wege der Transkriptionsregulation von *proA*, *proB* und *proC*

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt werden konnte, wird die Expression der Gene *proA*, *proB* und *proC* in Abhängigkeit von der externen Osmolalität reguliert und ist essentiell für den Aufbau des internen Prolinpools. Von besonderem Interesse war es nun, den Regulationsmechanismus dieser Gene zu untersuchen. Denkbar wäre es zum Beispiel, dass der Promotor der Gene von einem alternativen Sigmafaktor erkannt wird oder dass ein spezifischer Transkriptionsfaktor die Expression der Gene reguliert. Dies würde in beiden Fällen die *de-novo*-Synthese der mRNA beeinflussen. Eine andere Möglichkeit wäre z.B., dass die Stabilität der mRNA unter hyperosmotischen Bedingungen spezifisch gesteigert wird. In diesem Abschnitt wurden nun verschiedene regulatorische Mechanismen untersucht.

#### 3.5.1 Regulation der Gene *proA*, *proB* und *proC* durch alternative Sigmafaktoren

Sigmafaktoren vermitteln sequenzspezifische DNA-Kontakte und erlauben so der RNA-Polymerase, an bestimmte Promotoren zu binden. Unter „normalen“ Wachstumsbedingungen ist die RNA-Polymerase mit dem *housekeeping* Sigmafaktor (*sigA*,  $\sigma^{70}$ ) bestückt. Ein Austausch des Sigmafaktors findet z.B. in Anpassung an die Wachstumsphase (z.B. Sporulation) oder an veränderte Umgebungsbedingungen (z.B. Hitzestress) statt und stellt so die Transkription auf die veränderten Bedingungen ein (Wagner, 2000, p 36-40). In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Aktivierung der Transkription von *proA*, *proB* und *proC* nach einem hyperosmotischen Schock abhängig von einem alternativen Sigmafaktor ist. Von Dr. Jörn Kalinowski (Universität Bielefeld) wurden sechs Stämme bereitgestellt, in denen jeweils das Gen für einen einzelnen Sigmafaktor (*sigB*, *D*, *M*, *C*, *E*) deletiert oder inaktiviert (*sigH*) war. Mit diesen Stämmen wurden ein *upshock*-Experiment von 0,9 auf 2,2 osm/kg (siehe Abschnitt 2.4.3.1) durchgeführt, um das Wachstum und die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* zu untersuchen. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen das Wachstum der sechs Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm RS167. Alle sieben Stämme zeigten vergleichbares exponentielles Wachstum vor der Salzzugabe, eine ca. einstündige *lag*-Phase nach der Salzzugabe und Wiederaufnahme des Wachstums nach Anpassung an die höhere Osmolalität. Ein veränderter Wachstumsphänotyp in Abhängigkeit von der Salzzugabe war bei keinem der Stämme sichtbar. Keiner der untersuchten Sigmafaktoren schien also für das Wachstum nach einem hyperosmotischen Schock notwendig zu sein. Die Veränderung der Transkription unter diesen Bedingungen ist beispielhaft für das Gen *proC* in Abbildung 14

dargestellt. Alle sieben Stämme zeigten in dem RNA-Hybridisierungsexperiment eine basale Transkription von *proC* vor der Salzzugabe ( $T_{0A/B}$ ) und eine Aktivierung 30, 60 und 180 Minuten nach dem hyperosmotischen Schock. Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch für die Gene *proA* und *proB* (hier nicht dargestellt) in allen sieben Stämmen, nämlich eine basale Transkription vor der Salzzugabe und Aktivierung nach dem hyperosmotischen Schock. Die untersuchten alternativen Sigmafaktoren sind für eine Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* also nicht notwendig.

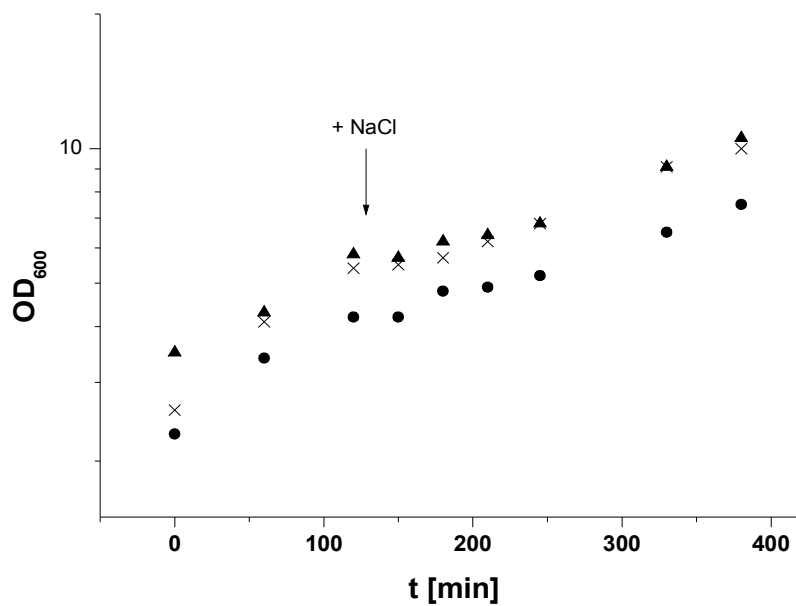


Abbildung 12: Wachstum von  $\Delta sigD$  (Kreuz),  $\Delta sigE$  (Kreise) und RS167 (Dreiecke) nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

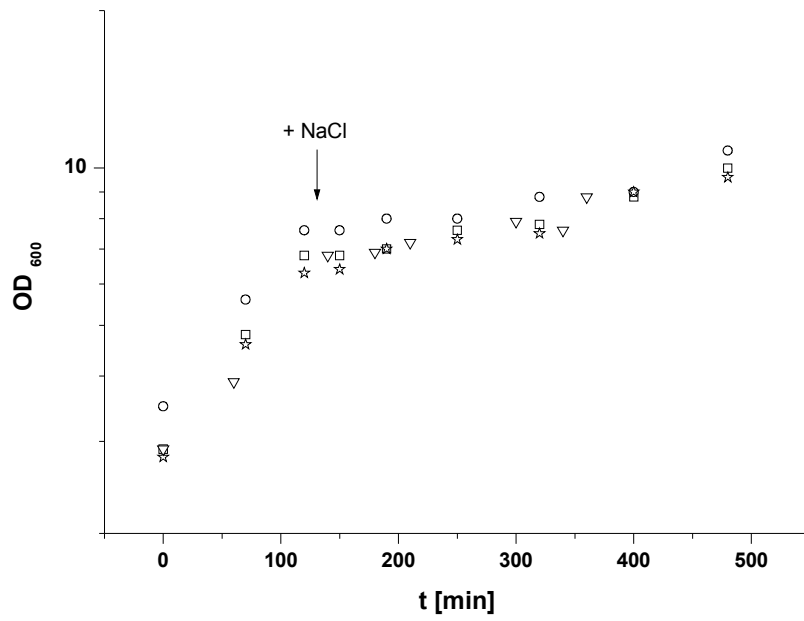


Abbildung 13: Wachstum von  $\Delta sigB$  (Quadrate),  $\Delta sigM$  (Kreise),  $XsigH$  (Sterne) und  $\Delta sigC$  (umgekehrte Dreiecke) nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

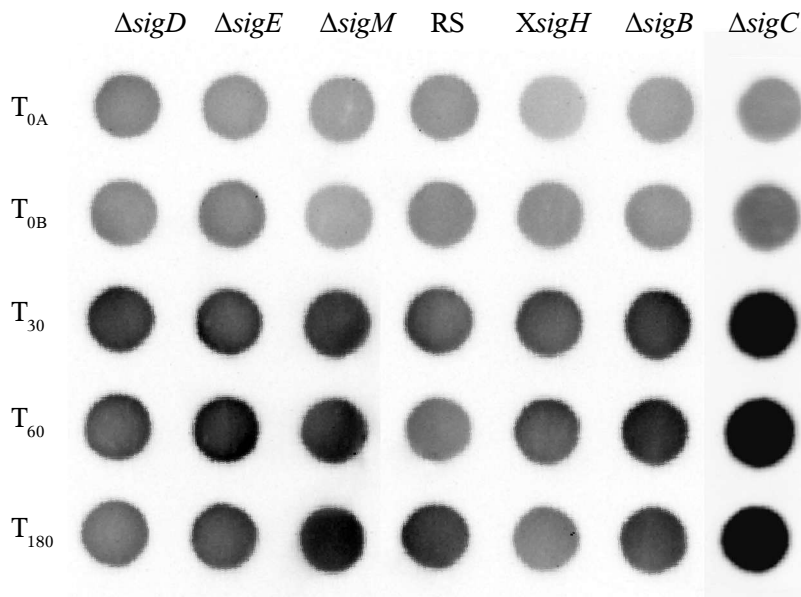


Abbildung 14: Transkription von *proC* in  $\Delta sigB$ ,  $D$ ,  $M$ ,  $E$ ,  $C$ ,  $H$  und RS 167 nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

### 3.5.2 Suche nach Transkriptionsfaktoren für *proA*, *proB* und *proC*

Die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* wird in Abhängigkeit von der externen Osmolalität reguliert. Die Induktion der Gene ist dabei unabhängig von dem Vorhandensein alternativer Sigmafaktoren. Eine solche Art der Regulation kann durch einen individuellen Transkriptionsfaktor vermittelt werden, der je nach Signal in der Promotorregion der Gene bindet oder abdissoziiert. Als direkter Ansatz zur Identifizierung von Proteinen, die in den Promoterregionen der Gene *proA*, *proB* und *proC* binden, wurde die Methode der DNA-Affinitätsreinigung über *magnetic beads* gewählt (siehe Abschnitt 2.5.2). Bei dieser Methode wird ein DNA-Fragment über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an eine magnetische Matrix gekoppelt. Diese Affinitäts-Matrix kann dann Proteinen als Bindungspartner dienen. Da die Transkriptionsstartpunkte für *proA*, *proB* und *proC* bekannt waren (Ley, 2001), konnten Primerpaare gewählt werden, um die entsprechenden DNA-Bereiche zu amplifizieren. Es wurden 400 bp DNA-Fragmente für die Promotorbereiche der drei Gene erstellt, wobei der Transkriptionsstart jeweils in der Mitte des Fragments lag. Diese Fragmente wurden an die *magnetic beads* gekoppelt. Die durchgeführten Kontrollen zeigten jeweils immer deutlich, dass die biotinylierte DNA an die *beads* gebunden hatte.

Da unklar war, unter welchen Bedingungen ein putativer Faktor an die DNA binden würde und unter welchen Wachstumsbedingungen er vorhanden wäre, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Zum einen wurde die Osmolalität des Mediums und zum anderen die Osmolalität des Proteinbindepuffers variiert. Ein Überblick der Bedingungen ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Überblick über die getesteten Bedingungen bei der DNA Affinitätsreinigung

<i>Affinitätsmatrix</i>	<i>Anzucht der Zellen</i>	<i>Osmolalität im Proteinbindepuffer</i>	<i>Elution bei [X] mM NaCl</i>	<i>Proteinbanden auf der SDS PAGE</i>
<b><i>proA</i></b>	0,3 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	3 Proteinbanden
	0,3 osm/kg	+ 300 mM NaCl	300-1000	Keine Proteinbanden
	0,3 osm/kg	+ 500 mM NaCl	500-1000	Keine Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 2,2 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	8 Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 2,2 osm/kg	+ 300 mM NaCl	300-1000	Keine Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 2,2 osm/kg	+ 500 mM NaCl	500-1000	Keine Proteinbanden
<b><i>proB</i></b>	0,3 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	6 Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 1,8 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	6 Proteinbanden
	Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	6 Proteinbanden
	Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg	+ 700 mM NaCl	700-300, 1000	Keine Proteinbanden
<b><i>proC</i></b>	0,3 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	5 Proteinbanden
	0,3 osm/kg	+ 300 mM NaCl	300-1000	Keine Proteinbanden
	0,3 osm/kg	+ 500 mM NaCl	500-1000	Keine Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 2,2 osm/kg	+ 0 mM NaCl	200-1000	10 Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 2,2 osm/kg	+ 300 mM NaCl	300-1000	3 Proteinbanden
	Schock von 0,3 auf 2,2 osm/kg	+ 500 mM NaCl	500-1000	Keine Proteinbanden

Der beste Reinigungserfolg bei dieser Methode wurde mit Zellextrakten aus hyperosmotisch geschockten Zellen und bei einer geringen Osmolalität während der Proteinbindung erzielt. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Elutionsfraktionen einer solchen Proteinreinigung für die Promotorregionen von *proC* und *proB*. Die auf den SDS-Gelen markierten Proteinbanden konnten hier erfolgreich identifiziert werden (siehe Tabelle 11). Die Proteinbande Nummer eins zeigte eine hohe Ähnlichkeit zum *transcription termination factor rho*. Dieses Protein wurde sowohl in der Promoterregion von *proA* als auch in der von *proC* gefunden. Die Proteinbanden Nummer zwei und drei wiesen Ähnlichkeiten zur DNA Polymerase I und zur  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III auf. Diese Proteine konnten mit allen drei DNA-Fragmenten gereinigt werden. Das Protein in Bande Nummer vier war ein bekanntes Protein aus *C. glutamicum*, das stressensitive Restriktionssystem CgIIR. Auch dieses Protein wurde in allen Promotorregionen gefunden. Das Protein in Bande Nummer fünf zeigte Ähnlichkeit zu zwei verschiedenen Proteinen, zum einen zur Exonuclease II und zum anderen zum *catabolite repressions control proteine crc*. Diese Protein wurde nur in der Promotorregion von *proA* und *proC* gefunden. Die beiden Proteine sechs und sieben wurden nur in der Promoterregion von *proB* erfolgreich identifiziert. Protein Nummer sechs hatte Ähnlichkeit zum Transkriptionsrepressor LexA und Protein Nummer sieben hatte Ähnlichkeit zum *integration host factor* IHF.

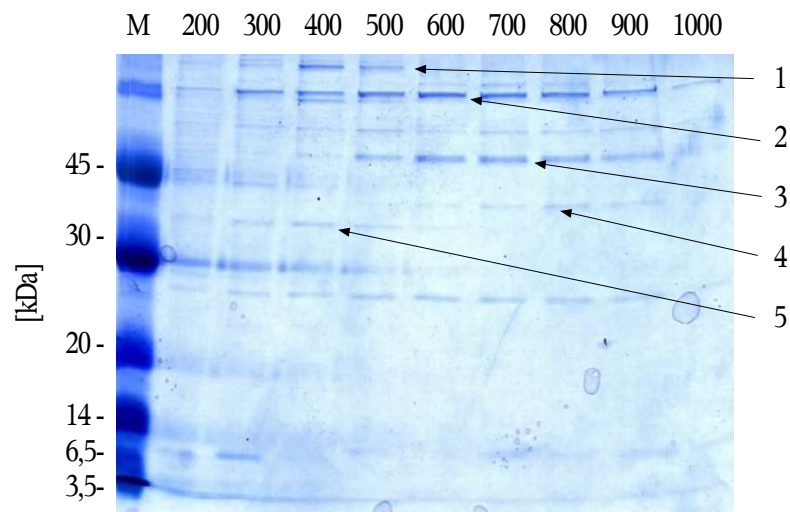


Abbildung 15: Elutionsfraktionen der Proteinreinigung mit der Promotorregion von *proC*. Die Elution der Proteine erfolgte bei 200 bis 1000 mM NaCl im Elutionspuffer



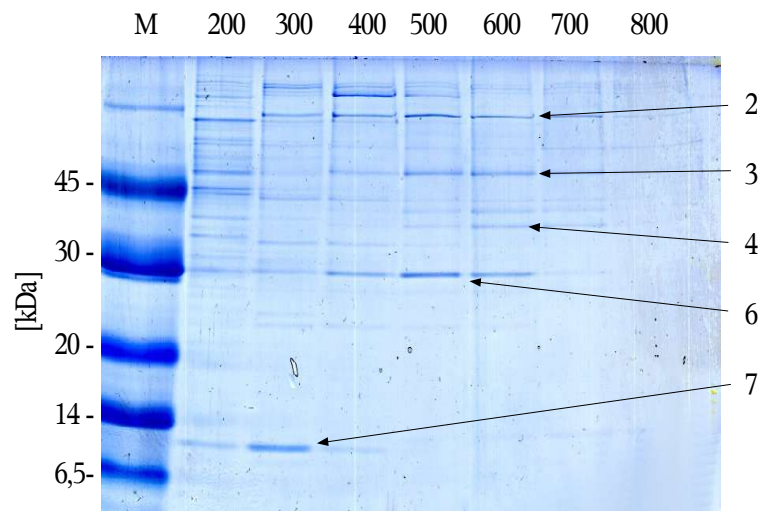


Abbildung 16: Elutionsfraktionen der Proteinreinigung mit der Promotorregion von *proB*. Die Elution der Proteine erfolgte bei 200 bis 1000 mM NaCl im Elutionspuffer

Tabelle 11: Übersicht der identifizierten Proteine in den Promotorregionen von *proA*, *proB* und *proC*

<i>Protein</i>	<i>orf</i>	<i>Ähnlichkeit / Funktion</i>	<i>Masse</i> [Da]	<i>proA</i>	<i>proB</i>	<i>proC</i>
1	1800	<i>transcription termination factor rho</i>	83976	ja	nein	ja
2	2682	DNA-Polymerase I	97785	ja	ja	ja
3	2242	$\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III	50350	ja	ja	ja
4	3249	CgIIR	39765	ja	ja	ja
5	1175	Exonuclease II oder <i>catabolite repressions control</i> proteine Crc	34442	ja	nein	ja
6	2014	Transkriptionsrepressor LexA	25116	nein	ja	nein
7	2510	integration host factor	11834	nein	ja	nein

Es konnten also insgesamt sieben verschiedene Proteine gefunden werden, deren Funktion auch jeweils eine DNA-Bindung beinhalten sollte. Unter diesen Proteinen wurden zwei putative Transkriptionsfaktoren gefunden. Zum einen *orf2014* mit einer hohen Ähnlichkeit zum Transkriptionsrepressor LexA und *orf1175* mit mit Ähnlichkeit zum *catabolite repressions control* proteine *crc*. Auf die Untersuchung der Funktion dieser Gene gehen die Abschnitte 3.5.2.1 und 3.5.2.2 weiter ein.

### 3.5.2.1 Die Funktion von *orf2014*

Der Leserahmen 2014 ist in der *C. glutamicum* Genomdatenbank der Degussa als putativer Transkriptionsrepressor LexA anotiert. LexA ist der Regulator der SOS-Antwort, der eine Vielzahl von Genen reguliert, die wichtige Funktionen bei der Reperatur und dem Umbau von DNA haben. Die Funktion von LexA wird seinerseits durch RecA reguliert. Wird die Induktion von Genen notwendig, die von LexA reprimiert werden, so kann RecA die Autoproteolyse von LexA herbeiführen (Wagner, 2000, p 266-270).

Um die Funktion des Proteins zu untersuchen, das von *orf2014* kodiert wird, wurde versucht, das Gen durch Insertion oder Deletion zu inaktivieren. Trotz verschiedener Konstrukte und Transfertechniken der Plasmide (Elektroporation, Konjugation) war aber weder eine Insertion noch eine Deletion möglich. Dies weist auf eine essentielle Funktion von *orf2014* hin. Um trotzdem mögliche Effekte des Gens auf die Expression von *proA*, *proB* und *proC* zu untersuchen, wurde ein Überexpressionsplasmid konstruiert. Dieses Plasmid (pXMJ19*lexA*) konnte dann problemlos nach *C. glutamicum* gebracht werden. Als Kontrollstamm wurde der Wildtyp mit dem Leerplasmid pXMJ19 transformiert. Nach Kontrolle beider Stämme über PCR und Restriktionsanalyse wurde die Transkription von *proB* und die Akkumulation von internem Prolin nach einem hyperosmotischen Schock untersucht. Hierfür wurden die Stämme 13032pX*lexA* und 13032pX in BHI mit Zusatz von Chloramphenicol (30 µg/ml) angezogen und abends auf MMI-Medium (0,9 osm/kg) + Chloramphenicol (30 µg/ml) überimpft. Nach 14 Stunden wurde auf frisches MMI-Medium (0,9 osm/kg) + Chloramphenicol (30 µg/ml) mit einer optischen Dichte von 2 angeimpft und die Synthese von LexA wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 6 wurde ein hyperosmotischer Schock mit 750 mM NaCl durchgeführt. Vor und nach dem Schock wurden Proben für RNA-Hybridisierungen und HPLC-Analysen genommen. Der Vergleich der Transkription von *proB* in den Stämmen 13032pX*lexA* und 13032pX ist in Abbildung 17 zu sehen. Beide Stämme zeigten eine Erhöhung der *proB*-Transkriptmenge nach dem hyperosmotischen Schock, wobei das Maximum jeweils nach 60 Minuten erreicht wurde. Die Überexpression von *lexA* schien also keinen Einfluss auf die osmoregulierte Transkriptionsaktivierung von *proB* zu haben. Die interne Prolinakkumulation der beiden Stämme ist in Abbildung 18 gezeigt. Beide Stämme akkumulierten zwar deutlich langsamer Prolin als der Wildtyp (vgl. Abb. 1), zeigten untereinander aber keinen Unterschied. Die Prolinsynthese wurde durch die Überexpression von *orf2014* also auch nicht beeinflusst.

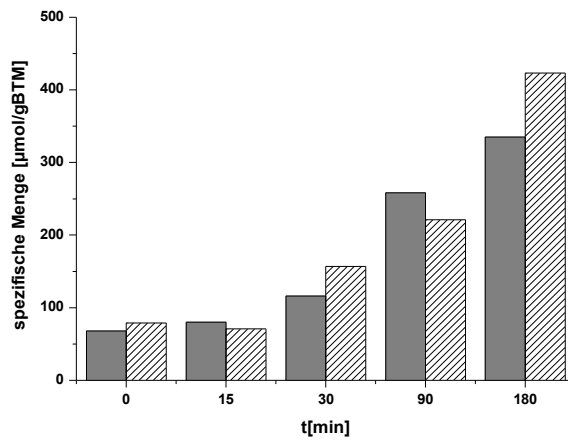


Abbildung 18: Interne Akkumulation von Prolin in 13032pXlexA (graue Säulen) und 13032pX (gestreifte Säulen) nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. Das Medium enthielt 1 mM IPTG

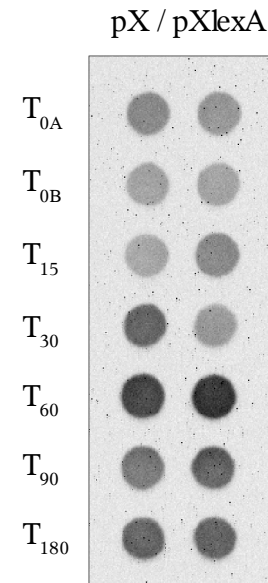


Abbildung 17: Transkription von *proB* in 13032pXlexA und 13032pX nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

### 3.5.2.2 Die Funktion von *orf1175*

Das Gen aus Leserahmen 1175 ist anotiert als Exonuclease III (Genomdatenbank der Degussa). Eine Vergleich der Aminosäuresequenz zu bekannten Proteinen (BLAST) deckte aber auch eine Ähnlichkeit zum *catabolite repression control protein* aus *Acinetobacter sp.* ADP1 und *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 auf. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen dem Protein aus *C. glutamicum* und dem aus *Acinetobacter sp.* ADP1 lag bei 34 % und die Ähnlichkeit bei 49 %, für *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lagen die Werte bei 30 % und 47 %. Das *catabolite repression control protein* ist ein wichtiger Regulator für die Transkription von Genen in Abhängigkeit von der C-Quelle.

Um die Funktion des hier gefundenen Proteins zu untersuchen, sollte das entsprechende Gen deletiert werden. Hierfür wurde eine *in-frame* Deletion mit dem Vektor pK19*mobsacB*Δ*orf1175* im Stamm RS167 durchgeführt. Nach Kontrolle des erhaltenen Stamms über PCR wurde die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* untersucht. Es wurde ein Standard *upshock*-Experiment von 0,9 auf 2,2 osm/kg (wie in Abschnitt 2.4.3.1 beschrieben) durchgeführt Die Veränderung in der Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* unter diesen Bedingungen ist in Abbildung 19 zu sehen. Vor dem Salzschock ( $T_{0A}$ ,  $T_{0B}$ ), zeigte sich eine basale Transkription der drei Gene, die nach dem Wechsel zur höheren

Osmolalität deutlich verstärkt wurde. Das Transkriptionsmuster war analog zur Transkription dieser drei Gene im Wildtyp. Die Deletion von *orf1175* hatte also keinen Einfluss auf die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC*.

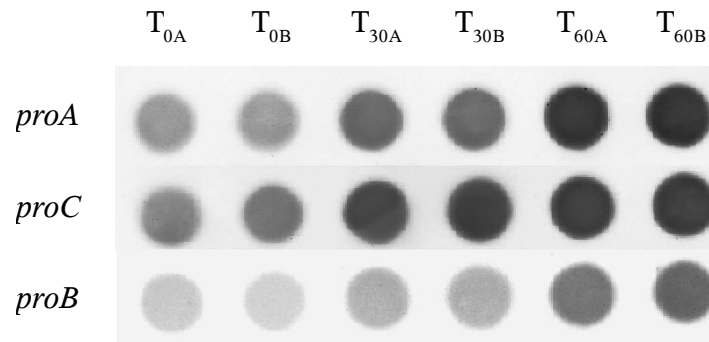


Abbildung 19: Transkription von *proA*, *proB* und *proC* in RS167 $\Delta$ *orf1175* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg.

Weiterhin blieb aber die Möglichkeit bestehen, dass *orf1175* eine Rolle bei der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus spielt. Diese mögliche Funktion wurde über das Wachstumsverhalten der Mutante auf verschiedenen C-Quellen untersucht. Die Mutante wurde hierfür auf Maltose, Saccharose, Fruktose, Glukose, Acetat und Glutamat (alle jeweils 4 %) bei tiefer (0,36 osm/kg) und hoher (2,2 osm/kg) Osmolalität angezogen. Als Vergleich diente der Wildtyp. Vorkultiviert wurden die Stämme über Tag in BHI und über Nacht in MMI-Medium mit Acetat (4 %) als C-Quelle. Insgesamt konnten unter allen getesteten Bedingungen keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen den zwei Stämmen beobachtet werden. In Abbildung 20 ist beispielhaft das Wachstum der beiden Stämme auf 4 % Saccharose dargestellt. Das gleichartige Wachstumsverhalten lässt sich hier, wie es auch in den anderen Bedingungen möglich war, gut erkennen. Die Deletion von *orf1175* hat also keinen Einfluss auf das Wachstum auf verschiedenen C-Quellen.

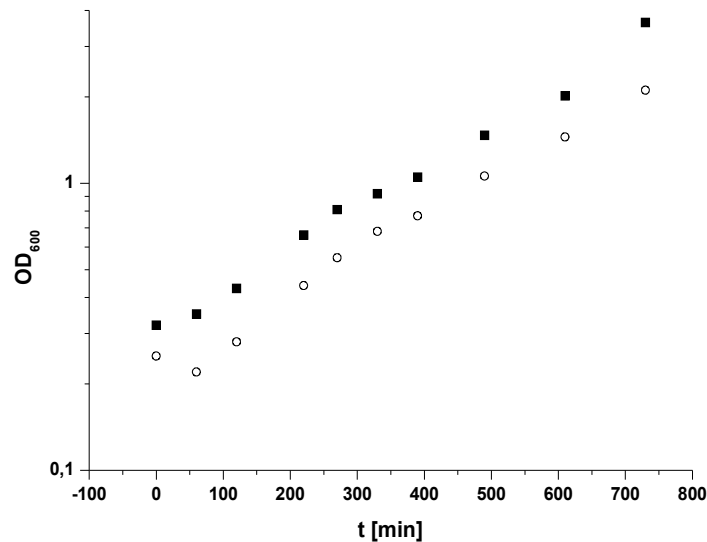


Abbildung 20: Wachstum von RS167 $\Delta$ orf1175 (Kreise) und dem Wildtyp (Quadrate) in MMI-Medium (0,36 osm/kg) mit 4 % Saccharose

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich weder für *orf1175* noch für *orf2014* ein Einfluss auf die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* nachweisen ließ. Die Suche nach individuellen Transkriptionsfaktoren der drei Gene konnte den Regulationsmechanismus also nicht aufklären.

### 3.5.3 Regulation von *proA*, *proB* und *proC* über stringente Kontrolle

Ein weitere Möglichkeit, die Transkription von *proA*, *proB* und *proC* zu regulieren, ist die stringente Kontrolle. Die stringente Kontrolle stellt die Zelle auf die Verfügbarkeit bzw. den Mangel von Aminosäuren ein. Die erste Antwort auf Aminosäuremangel ist die Akkumulation des Effektormoleküls (p)ppGpp. Das Signal für die Akkumulation ist die Menge von beladenen t-RNA's. Verschiebt sich das Verhältnis von beladenen zu unbeladenen t-RNAs, so können die unbeladenen t-RNAs am Ribosom an eine codon-abhängige Bindungsstelle binden, welche das sogenannte „*hungry codon*“ enthält. Diese Bindung aktiviert das Ribosom-assoziierte Protein RelA, welches mit der Synthese von (p)ppGpp beginnt. Die normale *steady-state*-Konzentration von (p)ppGpp in wachsenden Zellen beträgt ca. 10-30  $\mu$ M. Unter Aminosäuremangel steigt die Konzentration um Faktor 20 an. Das (p)ppGpp, auch „*alarmon*“ genannt, hat eine hormonähnliche Funktion und hat auf viele Prozesse Einfluss wie z.B.: Inhibition stabiler RNA-Synthese (t- und r-RNAs), Inhibition der Synthese des Translationsapparates, Inhibition der Synthese von RNA-Polymerase-

Untereinheiten (Ausnahme: Sigmafaktoren), Aktivierung der Synthese und des Metabolismus von Aminosäuren. Ein Ansatzpunkt für die Regulation durch (p)ppGpp scheint die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase zu sein (Wagner, 2002, p288-302).

Die stringente Kontrolle stellt also einen wichtigen Regulationspunkt für die Justierung der internen Aminosäurepools dar. Hier wurde nun untersucht, ob die Prolinakkumulation in *C. glutamicum* über diesen Mechanismus reguliert wird. Hierfür wurde eine *relA*-Mutante (keine (p)ppGpp Synthese) einem hyperosmotischen Schock unterworfen und sowohl Wachstum als auch Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* wurden analysiert. Der hyperosmotische Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg wurde in MMI-Medium durchgeführt, wobei dem Medium für diesen Stamm jeweils 50 mg/l Serin und Histidin zugegeben werden mussten. Das Transkriptionsmuster in  $\Delta relA$  für die Gene *proA*, *proB* und *proC* ist in Abbildung 22 dargestellt. Zu sehen ist ein RNA-Hybridisierungsexperiment, es wurden jeweils 3  $\mu$ g RNA pro Punkt aufgetragen. Die Abbildung zeigt, dass die Gene *proA*, *proB* und *proC* in der Mutante wie im Wildtyp reguliert werden. Die basale Transkription der Gene wird nach dem hyperosmotischen Schock induziert, wobei das Maximum nach ca. 60 Minuten erreicht wird. Die Deletion des *relA* Gens hatte also keinen Einfluss auf die Transkription der *pro*-Gene. Im Wachstum (siehe Abbildung 21) zeigte die Mutante nach dem Osmoschock einen auffälligen Phänotyp, die *lag*-Phase war mit ca. 6 Stunden deutlich länger als im Wildtyp. Dieser Wachstumsnachteil lässt sich aber nicht auf eine Fehlregulation der Gene *proA*, *proB* und *proC* zurückführen, wie aus der mRNA Analyse ersichtlich ist.

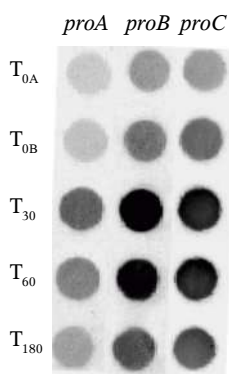


Abbildung 22: Transkription von *proA*, *proB* und *proC* in  $\Delta relA$  nach einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. Das Medium enthielt Serin und Histidin in einer Konzentration von 50 mg/l

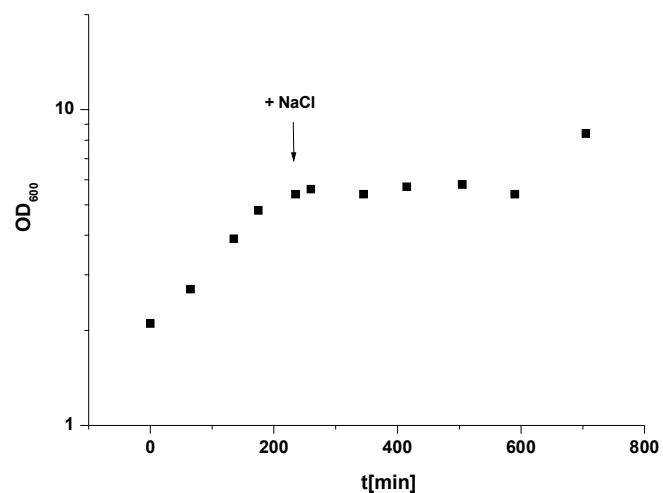


Abbildung 21: Wachstum von  $\Delta relA$  nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI. Das Medium enthielt Serin und Histidin in einer Konzentration von 50 mg/l

### 3.5.4 Titration von Transkriptionsfaktoren durch Erhöhung der Promotorkopienzahl

Die Suche nach Transkriptionsfaktoren mittels einer DNA-Affinitätsreinigung führte nicht zur Identifizierung des Regulators der Gene *proA*, *proB* und *proC*. Ein mögliche Erklärung dafür ist, dass der putative Transkriptionsfaktor in einer geringen Kopienzahl in der Zelle vorliegt. Falls dies der Fall ist, könnte eine Erhöhung der Zahl der Bindestellen in der Zelle zu einem Regulationsverlust der Zielgene führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Kopienzahl der Promotorbereiche von *proA*, *proB* und *proC* im Wildtyp erhöht. Hierfür wurden jeweils die DNA-Bereiche stromaufwärts vom Transkriptionsstart mittels PCR vervielfältigt. Die Größe der Fragmente betrug für *proA* 400 bp, für *proB* 500 bp und für *proC* 600 bp. Diese Fragmente wurden nach pXMJ19 kloniert und anschließend sequenziert. Die Transformation der Plasmide in den Wildtyp erfolgte über Elektroporation und die Kontrolle der erhaltenen Klone (13032PR*proA*, 13032PR*proB* und 13032PR*proC*) erfolgte über PCR. Mit den Klonen wurde dann ein hyperosmotischer Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium durchgeführt, beschrieben in Abschnitt 2.4.3.1. Das Medium enthielt in diesem Fall einen Zusatz von Chloramphenicol (30 µg/ml) zum Erhalt des Vektors. Vor und nach dem Schock wurden jeweils Proben für ein RNA-Hybridisierungsexperiment genommen. Die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* in den drei Stämmen ist in Abbildung 23 zu sehen.

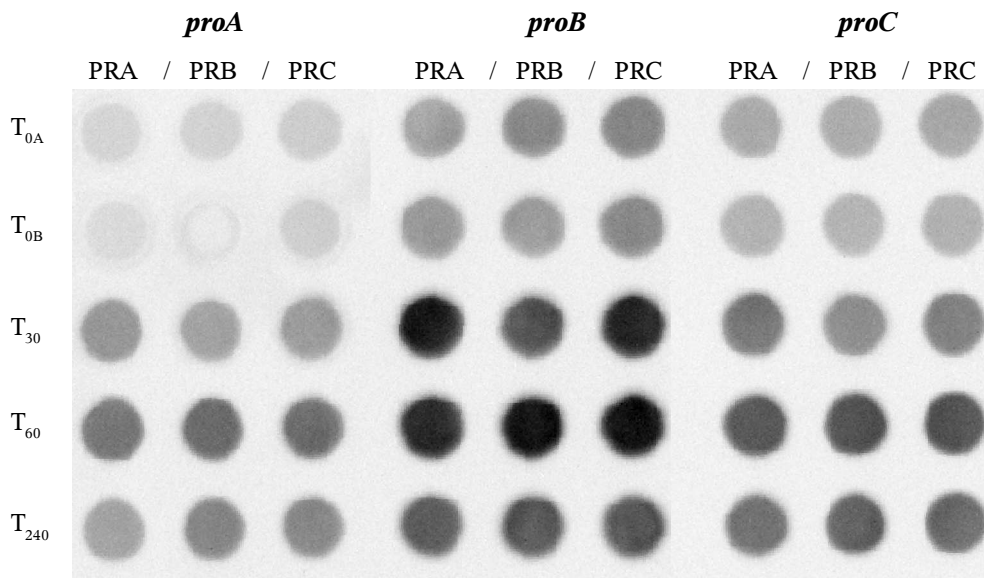


Abbildung 23: Transkription von *proA*, *proB* und *proC* in den Stämmen 13032PR*proA* (PRA), 13032PR*proB* (PRB) und 13032PR*proC* (PRC) nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg.

Alle drei Stämme zeigten untereinander (und auch zum Wildtyp, vgl. Abb. 7) keinen Unterschied in der Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC*. Wie im Wildtyp wurde die Transkription der drei Gene nach einem hyperosmotischen Schock angeschaltet und erreichte nach ca. 60 Minuten ihr Maximum. Die Erhöhung der Kopienzahl der Promotorbereiche von *proA*, *proB* und *proC* hatte also keine Auswirkung auf die Transkription der Gene. Die Vermutung, dass der putative Faktor nur in einer geringen Menge in der Zelle vorliegt, konnte also nicht bestätigt werden.

### 3.5.5 RNA-Stabilität in Abhängigkeit von der Osmolalität

Die beobachtete Steigerung der Transkriptmenge von *proA*, *proB* und *proC* nach einem hyperosmotischen Schock kann auf zweierlei Arten erklärt werden. Zum einen könnte die Synthese der mRNA unter diesen Bedingungen erhöht sein und zum anderen könnte der Abbau spezifisch verlangsamt sein. Da sich bis jetzt keine Hinweise auf einen Proteinfaktor finden ließen, wurde nun untersucht, ob sich die Stabilität der mRNA spezifisch ändert. Bei diesem Experiment wurde die Abbaugeschwindigkeit von *proA*, *proB* und *proC* mit der Abbaugeschwindigkeit von *aceE* und *gapDH* bei niedriger und hoher Osmolalität verglichen. Die Gene *aceE* und *gapDH* wurden als Referenzgene gewählt, da gezeigt werden konnte, dass beide nach einem hyperosmotischen Schock nicht reguliert werden (Weinand, 2004). Anhand dieser Gene sollte der normale mRNA *turn-over* unter diesen Bedingungen sichtbar gemacht werden.

Für dieses Experiment wurde der Wildtyp über Tag in BHI-Medium angezogen und abends in MMI-Medium mit einer Osmolalität von 0,36 osm/kg und 2,2 osm/kg überimpft. Aus beiden Kulturen wurde nach 14 Stunden in frisches MMI-Medium mit 0,36 und 2,2 osm/kg auf  $OD_{600}=2$  überimpft. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Referenzwerte genommen. Nun wurde, um eine Neusynthese von mRNA auszuschließen, Rifampicin (40 µg/ml Endkonz.) zu den Kulturen gegeben. In kurzen Abständen (nach 2, 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten) wurden weitere Proben genommen. Die RNA wurde aus den Proben präpariert und der Nachweis der mRNA-Transkripte erfolgte über ein RNA-Hybridisierungsexperiment, es wurden jeweils 3 µg RNA pro Punkt aufgetragen.



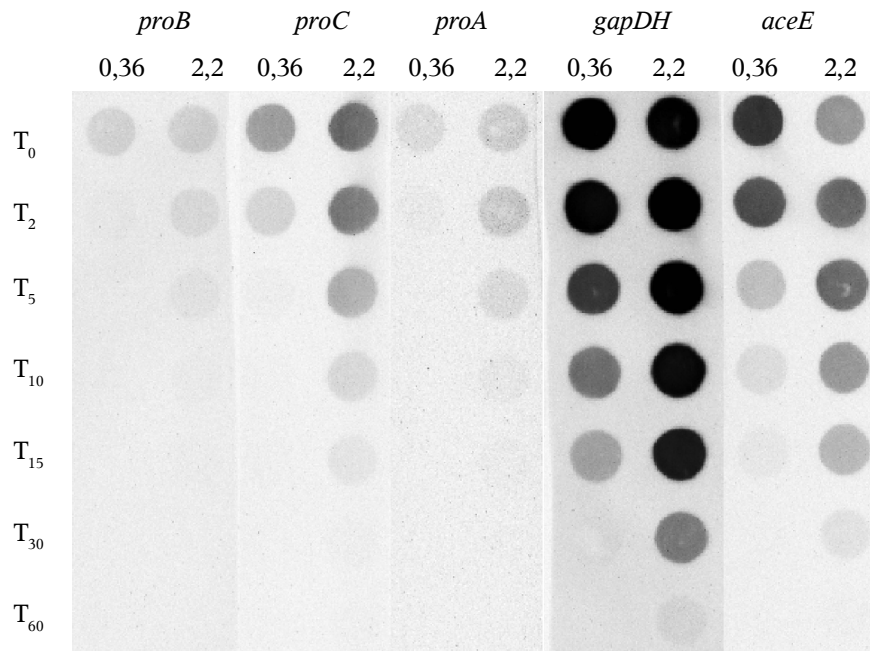


Abbildung 24: Nachweis des mRNA turn-over für *proA*, *proB*, *proC*, *gapDH* und *aceE* bei hoher (2,2 osm/kg) und niedriger (0,36 osm/kg) Osmolalität

Man erkennt in Abbildung 24 deutlich, dass die mRNA-Synthese durch Rifampicin inhibiert worden ist. Sowohl bei 0,36 osm/kg als auch bei 2,2 osm/kg ist ein Abbau der mRNA für alle fünf untersuchten Gene zu beobachten. Der Vergleich der Abbaugeschwindigkeit zwischen den zwei Osmolalitäten zeigt, dass der Abbau bei 0,36 osm/kg deutlich schneller vonstatten geht als bei 2,2 osm/kg. Bei der niedrigen Osmolalität war für die Gene *proA* und *proB* schon nach zwei Minuten, für das Gen *proC* nach fünf Minuten kein Transkript mehr zu detektieren. Unter hyperosmotischem Stress (bei 2,2 osm/kg) verlängerte sich die Halbwertszeit der mRNA. Hier waren die Transkripte von *proA* und *proB* nach 10 Minuten und für *proC* erst nach 30 Minuten nicht mehr zu detektieren. Der Vergleich mit den Referenzgenen *gapDH* und *aceE* zeigte ein ähnliches Bild, langsamer RNA-Abbau bei hochosmolaren Bedingungen und schneller RNA-Abbau bei niedriger Osmolalität. Die Stabilität der Transkripte von *proA*, *proB* und *proC* wurde unter hochosmolaren Bedingungen also nicht spezifisch verändert.

### 3.6 Prolinabbau

Um die interne Konzentration einer Aminosäure einzustellen, ist nicht nur der Anabolismus, sondern auch der Katabolismus von großer Bedeutung. Beide Wege sollten genau justiert sein, um einen *futile cycle* zu vermeiden. Da *C. glutamicum* je nach äußerer Osmolalität intern hohe Mengen an Prolin akkumuliert, sollte auch in diesem Fall der Abbauweg entsprechend reguliert werden. Der Abbau von Prolin zu Glutamat erfolgt sowohl in Pro- als auch in

Eukaryoten über zwei enzymatische Schritte (Strecker *et al.*, 1955; Strecker *et al.*, 1971; Dendinger *et al.*, 1970). In den Enterobakterien *E. coli* und *S. typhimurium* werden diese Reaktionen durch das Protein PutA katalysiert, welches zwei katalytisch aktive Domänen besitzt: eine Prolin-Dehydrogenase (Prolin-Oxidase) und eine  $\gamma$ -Glutamyl-semialdehyd-Dehydrogenase (Pyrrolin-5-carboxylat-Dehydrogenase) (Wood & Zadworny, 1980; Wood, 1981; Ling *et al.*, 1994; Maloy *et al.*, 1987). Über Computeranalysen (BLAST) konnte im Genom von *C. glutamicum* ein Leserahmen (*orf486*) mit einer hohen Ähnlichkeit zum PutA aus *S. typhimurium* gefunden werden. Die Aminosäuresequenz zeigte eine Identität von 27 % und hatte eine Ähnlichkeit von 43 %. Außerdem waren beide funktionellen Domänen (Prolin-Oxidase und Pyrrolin-5-carboxylat-Dehydrogenase) vorhanden. Um die Funktion von *orf486* zu untersuchen, wurde das entsprechende Gen im Genom von *C. glutamicum* deletiert. Diese Deletion erfolgte mit dem Vektor pK19 $\Delta$ *orf486*.

### 3.6.1 Regulation von *orf486* im Wildtyp und in 13032 $\Delta$ *orf486*

Die Transkription von *putA* wird in vielen Bakterien in Abhängigkeit von der internen Prolinkonzentration reguliert, wobei für manche Bakterien (z.B. *E. coli* und *S. typhimurium*) gezeigt werden konnte, dass PutA als Transkriptionsfaktor seiner eigenen Expression dient. Ob *orf486* in *C. glutamicum* vergleichbar reguliert wird, wurde hier untersucht. Zwei verschiedene Experimente wurden mit dem Wildtyp und mit 13032 $\Delta$ *orf486* durchgeführt: zum einen ein Prolinpuls (10mM) bei einer geringer Osmolalität von 0,36 osm/kg und zum anderen ein hyperosmotischer Schock von 0,36 auf 2,2 osm/kg. Unter beiden Bedingungen sollte *C. glutamicum* intern Prolin akkumulieren, in dem einen Fall durch Aufnahme und im anderen Fall durch interne Synthese. Die internen Mengen, die akkumuliert werden, sind dabei aber deutlich unterschiedlich. Während der interne Gehalt von Prolin eine Stunde nach einem solchen Salzschock von ca. 20 auf 250  $\mu$ mol/gBTM ansteigt (vgl. Abb. 11) wird bei Prolinzugabe ohne Osmostress nur eine interne Menge um 50  $\mu$ mol/gBTM (vgl. Abb. 29A) erreicht. Die Mutante konnte ebenfalls untersucht werden, da konstruktionsbedingt bei der Deletion von *orf486* die ersten 200 Basenpaare des Gens im Genom verblieben waren. So war es möglich, zu untersuchen, ob eine Autoregulation des Gens erfolgt. In beiden Experimenten wurde jeweils die Transkription von *orf486* vor und eine Stunde nach der Zugabe von NaCl (1,05 M) oder Prolin (10 mM) analysiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen mit unabhängigen RNA-Proben durchgeführt. Wie in Abbildung 25 zu sehen, wurde die Transkription des Gens im Wildtyp nach dem Prolinpuls leicht und nach dem hyperosmotischen Schock stark angeschaltet. Die Mutante zeigte zwar deutlich schwächere

Signale, die Veränderung der Transkription war aber vergleichbar. Die schwachen Signale in der Mutante waren vermutlich auf eine schwächere Hybridisierung der Sonde zurückzuführen. Die Sonde war gegen die ersten 500 Basen des *putA*-Gens konstruiert, so dass in der Mutante nur 200 Basen für die Hybridisierung bereitstanden. Aufgrund des gleichartigen Transkriptionsmusters kann eine Autoregulation für *orf486* ausgeschlossen werden.

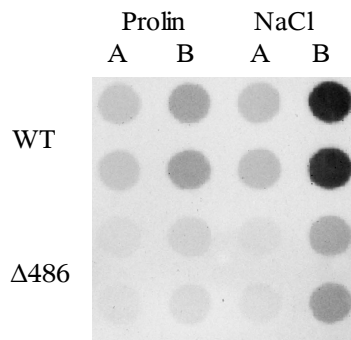


Abbildung 25: Regulation von *orf486* im Wildtyp und in  $\Delta orf486$  vor (A) und nach (B) Prolin (10 mM) oder Salzzugabe (1,05 M)

### 3.6.2 Regulation von *putP* im Wildtyp und in $13032\Delta orf486$

Das Gen *putP* kodiert für die Prolinpermease von *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1997). In *E. coli* steht die Transkription dieses Gens unter der Kontrolle von PutA. Ist wenig Prolin vorhanden, so bindet PutA an die *put*-Kontrollregion, die zwischen *putA* und *putP* liegt und reprimiert so die Transkription der zwei Gene (Brown & Wood, 1992; Ostrovsky *et al.*, 1991; Ostrovsky *et al.*, 1993). In *C. glutamicum* ist eine solche Organisation der Gene nicht vorhanden. Ob die Transkription von *putP* in *C. glutamicum* trotzdem vom putativen PutA reguliert wird, wurde hier untersucht. Hierfür wurden ein Prolinpuls (10mM) im Wildtyp und in  $13032\Delta orf486$  durchgeführt und die Transkription von *putP* analysiert. Die Osmolalität des Mediums betrug 0,36 osm/kg. Der Nachweis der Transkripte wurde in diesem Fall über eine Northern-Blot Analyse geführt. Abbildung 26-1 zeigt eine Methylenblau-Färbung des Blots, die deutlich macht, dass gleiche RNA-Mengen (5  $\mu$ g) übertragen wurden und kein Abbau stattfand. Die Entwicklung des Blots (Abbildung 26-2) zeigte dann ein deutliches Signal bei ca. 1700 Basen, welches einem monocistronischen *putP* Transkript entspricht. Dieses Signal war sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante vor der Prolinzugabe (A) stark ausgeprägt und wurde nach der Zugabe von Prolin (B) schwächer. Die Transkription von *putP* wurde also im Wildtyp und in der Mutante durch den Prolinpuls abgeschaltet. Eine Regulation von *putP* durch das von *orf486* kodierte Protein fand also nicht statt.

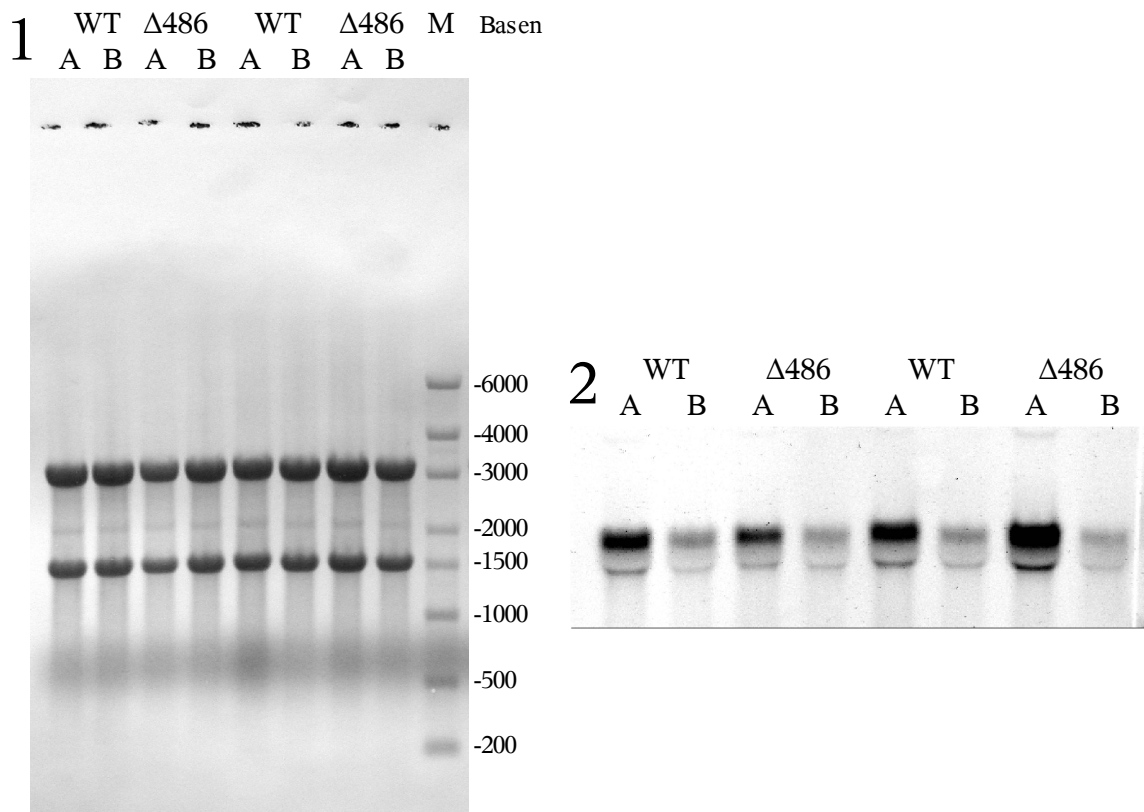


Abbildung 26-1: Methylenblau Färbung der RNA nach dem Transfer auf die Nylonmembran. A = Vor Prolinzugabe, B = 60 Minuten nach Prolinzugabe. 26-2: Signale nach Hybridisierung mit einer putP-Sonde A = vor Prolinzugabe, B = 60 Minuten nach Prolinzugabe.

### 3.6.3 Vergleich der internen und externen Prolinkonzentration in Wildtyp und in 13032 $\Delta$ orf486

In Abschnitt 3.6.1 konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Prolin ins Wachstumsmedium von *C. glutamicum* zu einer Induktion der Transkription von *orf486* führte. Dies ist neben der Ähnlichkeit von *orf486* zu *putA* aus *E. coli* ein weiteres Indiz dafür, dass in diesem Leserahmen ein Enzym für den Abbau von Prolin kodiert sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde versucht, mit Rohextrakten aus dem Wildtyp und aus 13032 $\Delta$ orf486 verschiedene PutA-Enzymtests durchzuführen. Für *C. glutamicum* konnte aber weder mit dem von Abrahamson und Mitarbeitern 1983 beschrieben, noch mit dem 1970 von Dendinger und Brill publizierten Enzymtest ein PutA-Assay etabliert werden. Aus diesem Grund wurde ein indirekter Nachweis für die Funktion des von *orf486* kodierten Proteins geführt. Für diesen Nachweis wurde es sich zu Nutzen gemacht, dass das nach einem hyperosmotischen Schock akkumulierte Prolin von *C. glutamicum* bei Erreichen der stationären Wachstumsphase wieder abgebaut wird (Wolf *et al.*, 2003). Wenn mit der Deletion von *orf486* nun der einzige Weg zum Abbau von Prolin in *C. glutamicum* zerstört würde, so sollte ein Abbau des

akkumulierten Prolins nicht mehr möglich sein. Die einzige andere Möglichkeit, den internen Prolinpool zu verringern, wäre dann der Export. In diesem Experiment wurde nun untersucht, wie sich die interne und externe Prolinkonzentration im Stamm 13032 $\Delta$ *orf486* und im Wildtyp nach einem hyperosmotischen Schock ändert. Es wurde ein Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium durchgeführt. Wie aus Abbildung 27 und 28 ersichtlich akkumulierten beide Stämme nach der Salzzugabe intern vergleichbare Mengen an Prolin mit einem Maximum von etwa 600 bzw. 700  $\mu\text{mol/gBTM}$ . Nach Erreichen der stationären Phase sank die interne Menge von Prolin dann langsam wieder ab. Diese Abnahme war in beiden Stämmen schon nach 20 Stunden sichtbar und setzte sich über den untersuchten Zeitrahmen von 80 Stunden fort. Für beide Stämme konnte dieses Verhalten in drei unabhängig durchgeführten Experimenten beobachtet werden, von denen in Abb. 27 und 28 jeweils eins dargestellt ist. Die Untersuchung des im Medium vorhandenen Prolins zeigte, dass bei beiden Stämmen vor dem Salzschock extern 10-20  $\mu\text{mol/gBTM}$  Prolin im Medium vorhanden war. Diese Menge konnte konstant in drei Experimenten gemessen werden. Nach dem Salzschock war dann für beide Stämme eine vermehrte Ausscheidung von Prolin zu beobachten. Die nach der Salzzugabe im Medium gemessenen Prolinmengen zeigten jedoch für beide Stämme in den einzelnen Experimenten und im Vergleich der Experimente untereinander starke Veränderungen. So nahm z.B. in dem hier dargestellten Experiment die externe Menge von Prolin in 13032 $\Delta$ *orf486* von 600  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_1$ ) zuerst auf 300  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_{20}$ ) ab und stieg dann wieder auf 500  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_{30}$ - $T_{50}$ ) bzw. 750  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_{80}$ ) an. Im Wildtyp wurde hier extern zuerst 200  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_1$ - $T_{20}$ ), dann ca. 550  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_{50}$ - $T_{70}$ ) und schließlich 5  $\mu\text{mol/gBTM}$  ( $T_{80}$ ) gemessen (dieser letzte Abfall wurde nur einmal beobachtet). Eine strikte Kontrolle der ausgeschiedenen Prolinmenge schien weder dem Wildtyp noch 13032 $\Delta$ *orf486* möglich zu sein. Im Wachstum zeigte sich kein Unterschied zwischen den Stämmen. Beide erreichten eine Endbiomasse um  $\text{OD}_{600} \sim 30$  beim Wachstum im hochosmolaren Medium. Die Deletion von *orf486* führte also weder zu einem Wachstumsphänotyp noch zu einer signifikanten Veränderung des internen oder externen Prolinpools. Die Funktion von *orf486* blieb somit ungeklärt und es konnte sich generell keine PutA-Aktivität in *C. glutamicum* feststellen lassen. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte in Wachstumsexperimenten gezeigt werden, dass *C. glutamicum* Prolin weder als C- noch als N-Quelle benutzen kann (Daten nicht gezeigt).

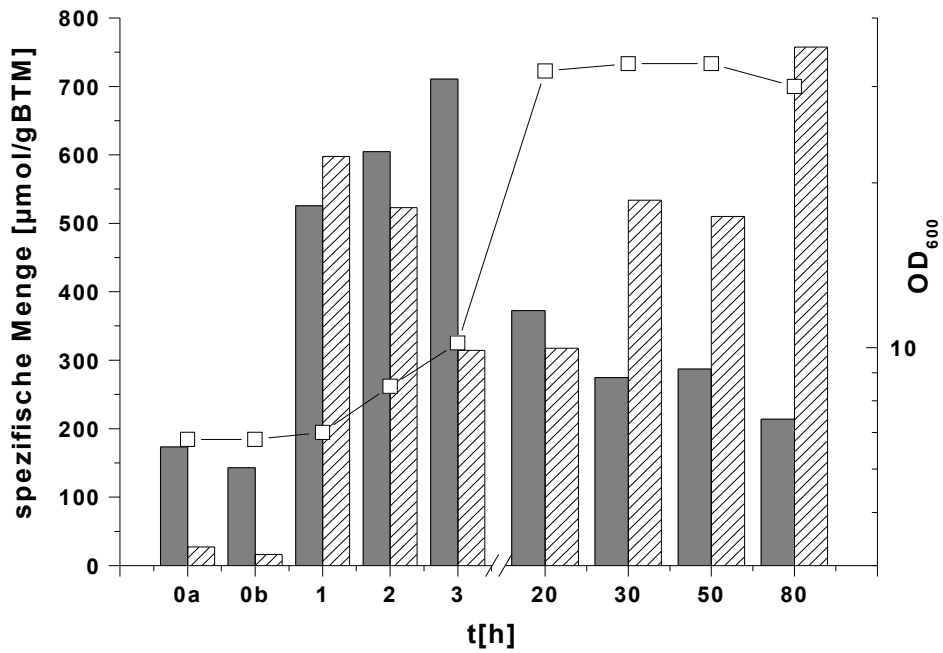


Abbildung 27: Interner (graue Säulen) und externer (gestreifte Säulen) Prolinpool von 13032Δorf486 nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium.

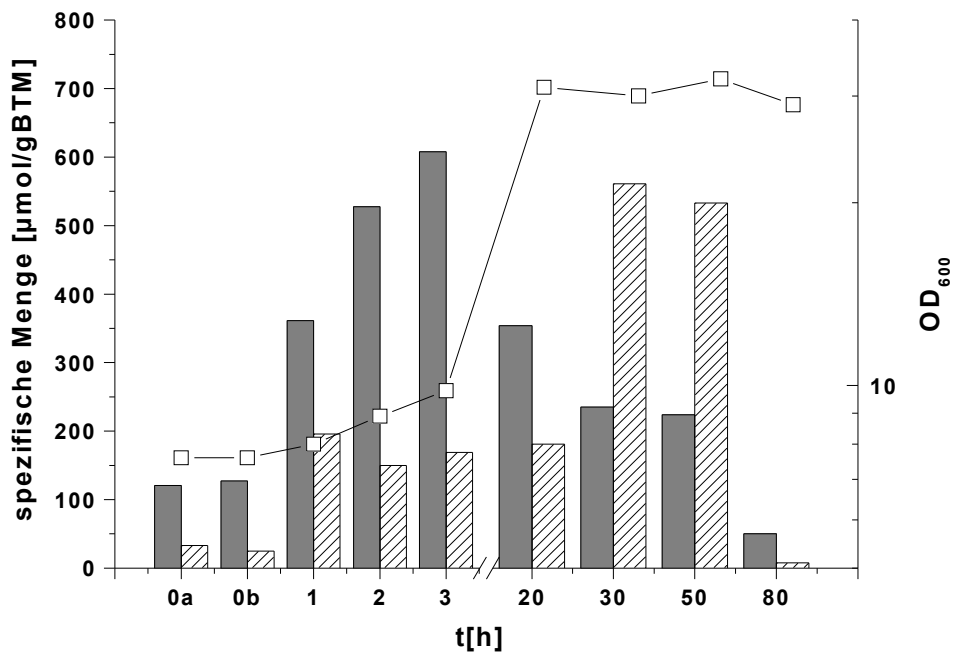


Abbildung 28: Interner (graue Säulen) und externer (gestreifte Säulen) Prolinpool im Wildtyp nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg in MMI-Medium.

### 3.7 Genregulation und Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Prolin- / Leucinpuls

Die Untersuchung von *orf486* und *putP* zeigte, dass die Transkription dieser Gene durch die Zugabe von Prolin ins Wachstumsmedium reguliert wird. Durch diese Beobachtung stellte sich die Frage, ob auch die Systeme der Osmoadaptation durch eine Akkumulation von Prolin beeinflusst werden, wenn keine Veränderung in der externen Osmolalität vorliegt. Beispielhaft für diese Untersuchung wurden die Gene *proP* und *betP* ausgewählt, die für verschiedene Transportsysteme kompatibler Solute kodieren. Neben der Transkription dieser Gene wurde die Akkumulation der internen Aminosäuren Glutamat, Glutamin und Prolin nach der Zugabe von Prolin ins Wachstumsmedium analysiert. Durchgeführt wurden diese Prolinpulsexperimente mit verschiedenen Stämmen. Die Basisexperimente waren jeweils ein Prolinpuls im Wildtyp bei 0,36 und 0,9 osm/kg. In den Stämmen 13032 $\Delta$ *proA*, 13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *proC* wurde die Auswirkung von vorherigem Prolinhunger bei einem Prolinpulsexperiment untersucht. Zu bemerken ist hier, dass die Stämme 13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *proC* prolinauxotroph sind und ohne die Zugabe von Prolin nicht wachsen können. Der Stamm 13032 $\Delta$ *proA* kann zwar auch nur geringe Prolinkonzentrationen synthetisieren, diese reichen für den Zellanabolismus aber aus. Um die erhaltenen Ergebnisse bewerten zu können, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Die eine Kontrollbedingung war ein Prolinpuls in 13032 $\Delta$ *mtrAB*. Diesem Stamm fehlt das Zwei-Komponenten-System MtrAB, das zum einen wichtig für die Ausbildung der korrekten Zellform und zum anderen wichtig für die Transkription verschiedener Gene nach einem hyperosmotischen Schock ist. Unter den betroffenen Genen, die in diesem Stamm nach einem hyperosmotischen Schock fehlreguliert werden, sind die Transporter *betP*, *proP*, *lcoP* und der mechanosensitive Kanal *mscL* zu finden (Möker *et al.*, 2004; Möker 2002). Da in dieser Arbeit die Regulation der Gene *betP* und *proP* untersucht werden sollte, war durch den Stamm 13032 $\Delta$ *mtrAB* eine gute negative Kontrolle (keine Regulation dieser Gene möglich) gegeben. Das zweite Kontrollexperiment war ein Leucinpuls in 13032 $\Delta$ *leuC*. In diesem leucinauxotrophen Stamm sollte ein Vergleichsexperiment für 13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *proC* durchgeführt werden. Es sollte die Regulation von *proP* und *betP* bei Wachstumsstop durch Aminosäurehunger analysiert werden.

### 3.7.1 Akkumulation interner Aminosäuren nach Prolin- / Leucinpuls

Die Akkumulation interner Aminosäuren nach einem Prolin bzw. Leucinpuls ist in Abbildung 29 A-G dargestellt. Die Abbildungen 29A und 29B zeigen die internen Aminosäuren im Wildtyp bei 0,36 und 0,9 osm/kg. In beiden Fällen war eine transiente Akkumulation von Prolin zu beobachten, obwohl die Osmolalität des Mediums nicht verändert wurde. Bei 0,36 osm/kg stieg der interne Gehalt von  $\sim 30$  auf  $\sim 70$   $\mu\text{mol/gBTM}$  und bei 0,9 osm/kg von  $\sim 200$  auf  $\sim 500$   $\mu\text{mol/gBTM}$  an. Drei Stunden nach der Zugabe von Prolin waren die Ausgangsmengen in beiden Fällen wieder erreicht. Der interne Gehalt von Glutamat war bei 0,9 osm/kg im Vergleich zu 0,36 osm/kg um den Faktor 1,5 erhöht. Die Abbildungen 25C, 25D und 25E zeigen die Akkumulation in *13032 $\Delta$ proA*, *13032 $\Delta$ proB* und *13032 $\Delta$ proC* bei 0,9 osm/kg. In diesen Stämmen war die Menge und der zeitliche Verlauf in der Akkumulation interner Aminosäuren ähnlich. Vor der Zugabe von Prolin hatten alle drei Stämme einen erhöhten Gehalt von Glutamin ( $\sim 90$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ) und nur sehr wenig internes Prolin ( $< 20$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ). Nach der Zugabe von Prolin ins Medium, stieg die interne Prolinmenge für *13032 $\Delta$ proB* und *13032 $\Delta$ proC* auf  $\sim 350$   $\mu\text{mol/gBTM}$  und für *13032 $\Delta$ proA* auf  $\sim 500$   $\mu\text{mol/gBTM}$  an. Die interne Menge von Glutamin sank währenddessen in allen drei Stämmen auf Konzentrationen von ca.  $40$   $\mu\text{mol/gBTM}$  ab. Die schon bei den Osmoschockexperimenten beobachtete gegenseitige Beeinflussung des internen Glutamin- und Prolinpools, konnte dadurch bestätigt werden. Wie erwartet setzte für die Stämme *13032 $\Delta$ proB* und *13032 $\Delta$ proC* fast direkt nach der Prolinzugabe das Wachstum wieder ein. Abbildung 25F zeigt das Kontrollexperiment mit *13032 $\Delta$ mtrAB* bei einer Osmolalität von 0,9 osm/kg. Dieser Stamm zeigte vor der Zugabe von Prolin einen erhöhten Gehalt von Glutamin ( $100$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ) und einen erniedrigten für Prolin ( $50$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ). Auch in der Aufnahme von Prolin zeigte dieser Stamm ein auffälliges Verhalten. Nach der Zugabe von Prolin stieg dessen interne Menge auf nur knapp  $100$   $\mu\text{mol/gBTM}$  an. Während dieser Zunahme sank die interne Menge an Glutamin auf  $50$   $\mu\text{mol/gBTM}$  und das interne Glutamat von  $340$  auf  $100$   $\mu\text{mol/gBTM}$  ab. Das zweite Kontrollexperiment mit *13032 $\Delta$ leuC* ist in Abbildung 25G zu sehen. Hier war analog wie bei den Experimenten mit *13032 $\Delta$ proB* und *13032 $\Delta$ proC* kein Wachstum ohne die Zugabe von Leucin möglich. Vor der Zugabe von Leucin waren in diesem Stamm die internen Konzentrationen von Glutamat ( $140$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ) und Prolin ( $50$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ) erniedrigt und die von Glutamin ( $110$   $\mu\text{mol/gBTM}$ ) erhöht. Erst eine Stunde nach der Zugabe normalisierten sich die internen Konzentrationen langsam. Die interne Konzentration von Glutamat lag nun bei  $\sim 200$   $\mu\text{mol/gBTM}$ , die von Prolin bei  $\sim 100$   $\mu\text{mol/gBTM}$  und die von Glutamin bei



~60  $\mu\text{mol/gBTM}$ . Der Leucinmangel hatte also einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der internen Aminosäuren. Analog wie die Stämme 13032 $\Delta\text{proC}$  und 13032 $\Delta\text{proB}$  fing auch 13032 $\Delta\text{leuC}$  direkt nach der Zugabe der benötigten Aminosäure wieder an zu wachsen.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die Aufnahme von Prolin nach einem Prolinpuls nur transient induziert wird. Der Pool des intern aufgenommenen Prolins wird kontrolliert und eine dauerhafte Überakkumulation wird verhindert. Analog zu den Osmoschockexperimenten zeigte sich auch die Wechselwirkung zwischen dem internen Glutamin- und Prolinpool.

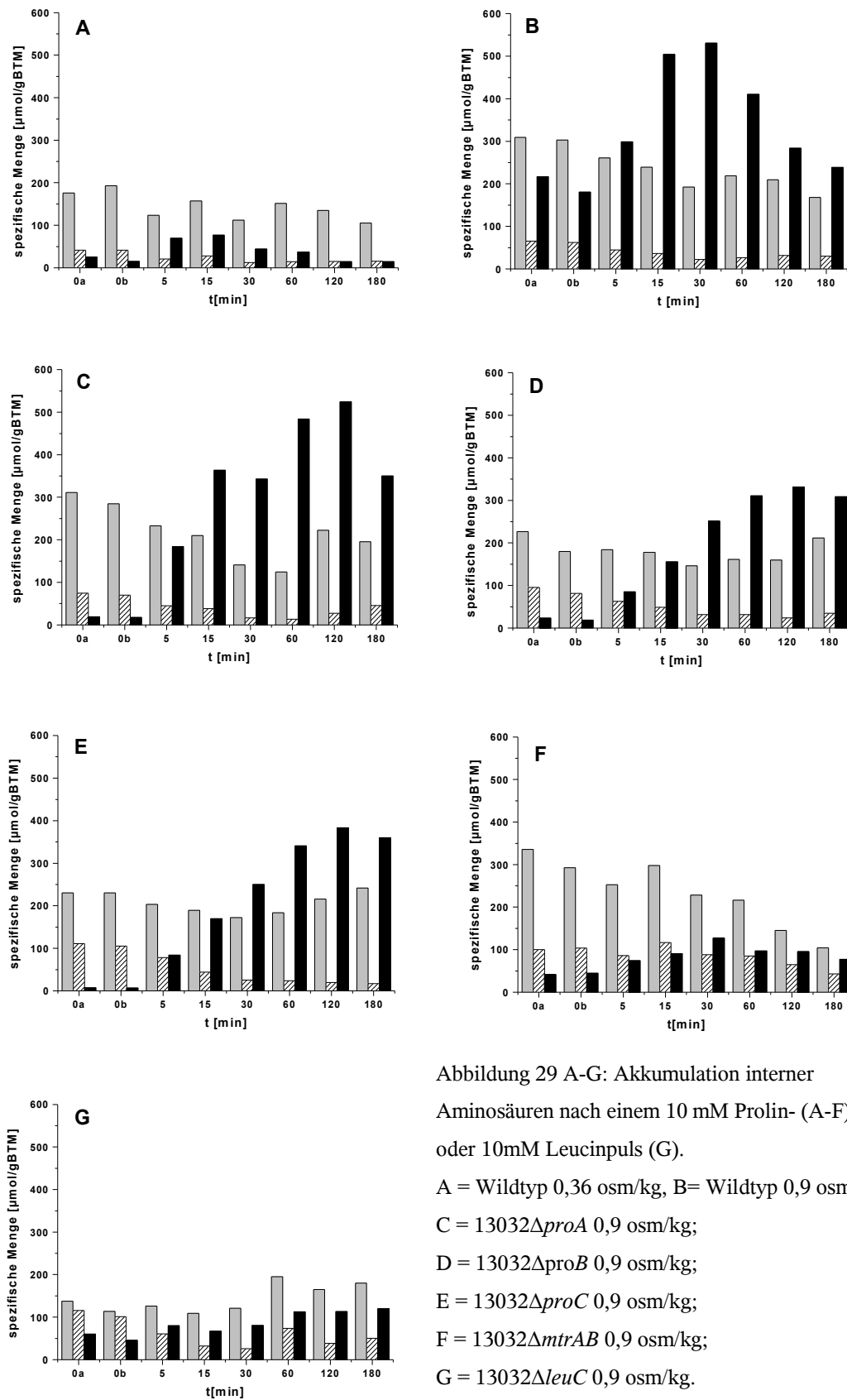


Abbildung 29 A-G: Akkumulation interner Aminosäuren nach einem 10 mM Prolin- (A-F) oder 10mM Leucinpuls (G).

A = Wildtyp 0,36 osm/kg, B= Wildtyp 0,9 osm/kg

C = 13032Δ*proA* 0,9 osm/kg;

D = 13032Δ*proB* 0,9 osm/kg;

E = 13032Δ*proC* 0,9 osm/kg;

F = 13032Δ*mtrAB* 0,9 osm/kg;

G = 13032Δ*leuC* 0,9 osm/kg.

graue Balken = Glutamat, schwarze Balken =

Prolin, gestreifte Balken = Glutamin

### 3.7.2 Regulation von *proP*

Das Gen *proP* kodiert für die H<sup>+</sup> abhängige Prolin/Ectoin-Permease von *C. glutamicum*. Die Aufnahme von Prolin in die Zelle wird von diesem Transporter in Abhängigkeit von der externen Osmolalität reguliert (Peter *et al.*, 1998). Zusätzlich findet eine Aktivierung auch auf der Ebene der Transkription statt (Möker, 2002; Weinand, 2004). Dieser Transporter hat also einen direkten Einfluss auf die Aufnahme von Prolin in die Zellen. Die Regulation von *proP* nach Zugabe des Substrats Prolin wurde hier untersucht. Abbildung 30 zeigt die Transkription des Gens nach einem Prolinpuls.

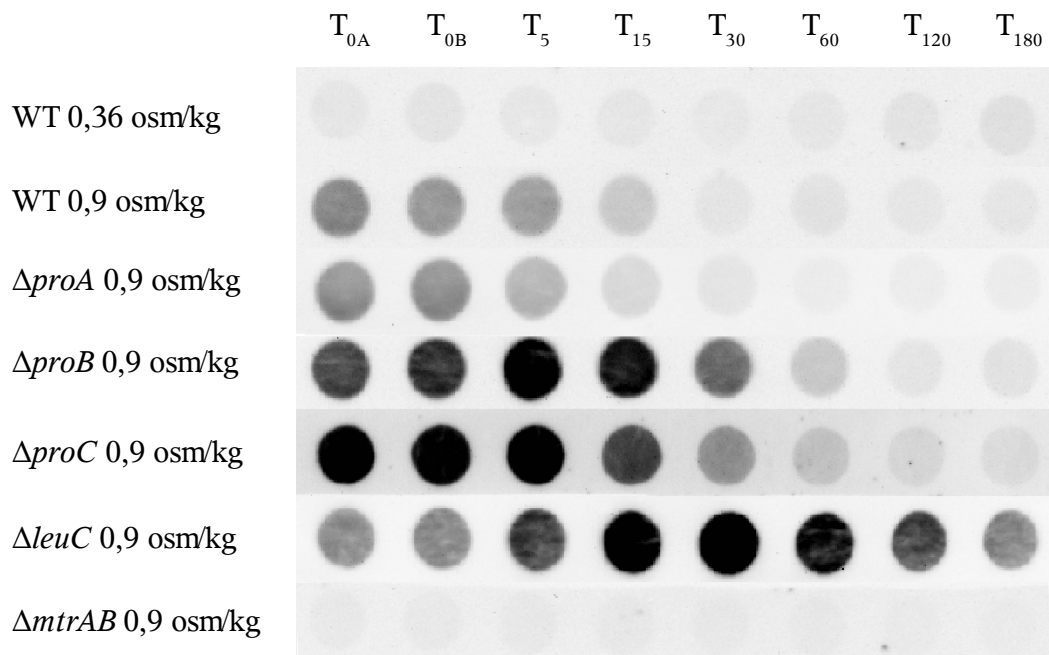


Abbildung 30: Regulation von *proP* nach einem Prolinpuls (10 mM) im Wildtyp, 13032Δ*proA*, 13032Δ*proB*, 13032Δ*proC*, 13032Δ*mtrAB* und 13032Δ*leuC* (Leucinpuls). Die Zugabe der Aminosäure erfolgte nach T<sub>0B</sub>.

Die Basisexpression dieses Gens war im Wildtyp bei einer geringen Osmolalität von 0,36 osm/kg nicht zu detektieren. Ein vergleichbares Bild zeigte das Kontrollexperiment in 13032Δ*mtrAB*: keine Transkription von *proP*. Lag die Osmolalität hingegen bei 0,9 osm/kg, so zeigte sich im Wildtyp, in 13032Δ*proA*, 13032Δ*proB* und 13032Δ*proC* eine deutliche Transkription des Gens. Die Zugabe von Prolin führte dann zu einer starken Repression der Transkription in diesen Stämmen, wobei der Effekt in den prolinauxotrophen Stämmen 13032Δ*proB* und 13032Δ*proC* am deutlichsten hervortrat. Im Stamm 13032Δ*leuC* war ein anderes Transkriptionsmuster zu beobachten. Der Stamm zeigte nach der Zugabe von Leucin eine kurzzeitige Aktivierung der Transkription von *proP*, die nach drei Stunden wieder den Basallevel erreichte. Dieser Unterschied in der Regulation von *proP* zwischen 13032Δ*leuC* und den Stämmen 13032Δ*proB* und 13032Δ*proC* ist sehr interessant, da in allen drei Fällen

das Wachstumsverhalten gleich war. Vor der Zugabe der benötigten Aminosäure war jeweils kein Wachstum möglich. Allein die Zugabe von Prolin ins Medium führte dann aber zu einer Regulation von *proP*.

### 3.7.3 Regulation von *betP*

Das Gen *betP* kodiert für den sekundären Na<sup>+</sup> Symporter BetP, der hochspezifisch für die Aufnahme von Betain ist. Die Aufnahmerate von Betain ist dabei direkt abhängig von der externen Osmolalität (Rübenhagen *et al.*, 2002, Peter *et al.*, 1996). Die Aminosäure Prolin gehört nicht zum Substratspektrum dieses Transporters. Ob die Transkription des Gens trotzdem in Abhängigkeit von der externen/internen Prolinkonzentration reguliert wird, wurde hier untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 zu sehen.

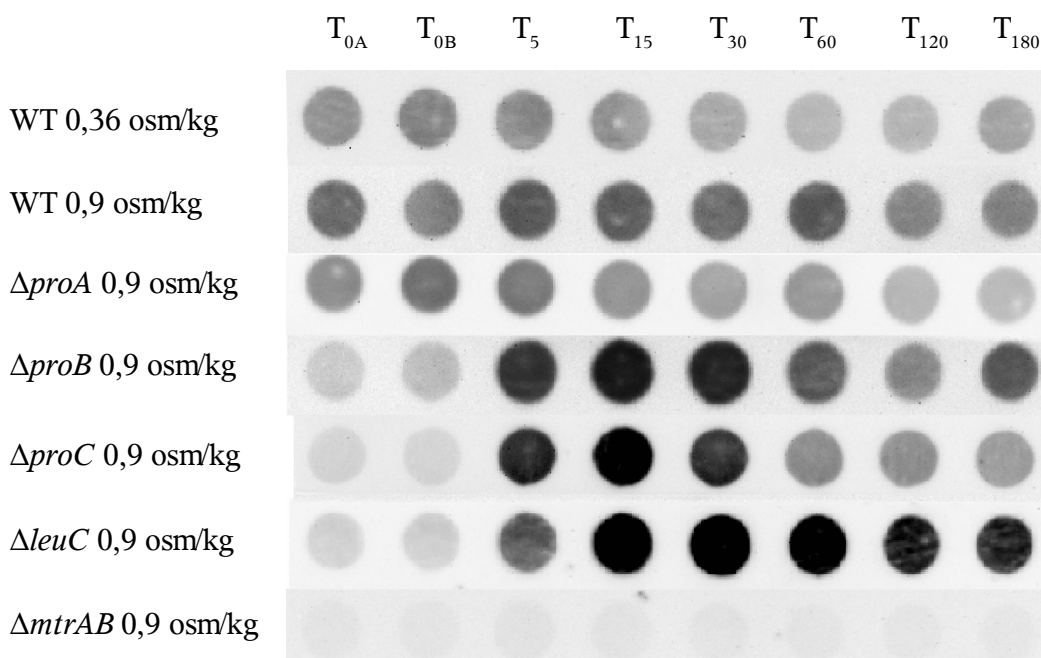


Abbildung 31: Regulation von *betP* nach einem Prolinpuls (10 mM) im Wildtyp, 13032 $\Delta proA$ , 13032 $\Delta proB$ , 13032 $\Delta proC$ , 13032 $\Delta mtrAB$  und 13032 $\Delta leuC$  (Leucinpuls). Die Zugabe der Aminosäure erfolgte nach T<sub>0B</sub>.

Der Wildtyp und 13032 $\Delta proA$  zeigten eine basale und unveränderte Transkription von *betP* vor und nach der Zugabe von Prolin. Im Stamm 13032 $\Delta mtrAB$  war, wie erwartet, keine Transkription von *betP* zu detektieren. Die Stämme 13032 $\Delta proB$ , 13032 $\Delta proC$  und 13032 $\Delta leuC$  zeigten ein auffälliges Transkriptionsmuster. In allen drei Fällen wurde *betP* vor der Zugabe von Prolin bzw. Leucin nur schwach transkribiert. Direkt nach dem Aminosäurepuls (T<sub>5</sub>) fand dann aber eine starke Aktivierung von *betP* statt. Diese Erhöhung der Transkription blieb für  $\Delta leuC$  über den gemessenen Zeitraum von drei Stunden und für

13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *proC* für 60 Minuten bestehen. Da aber weder Prolin noch Leucin zum Substraspektrum von BetP gehören, kann man davon ausgehen, dass die erhöhte Expression von *betP* mit dem Wachstum korreliert ist. Vergleicht man in den Stämmen 13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *proC* die Transkription von *betP* mit der von *proP* nach einem Prolinpuls, so fällt auf, dass beide Gene genau gegenläufig reguliert werden. Während *betP* induziert wird, findet eine Repression von *proP* statt. Dies ist ungewöhnlich, da gezeigt werden konnte, dass sowohl *betP* als auch *proP* von MtrAB auf der Ebene der Transkription generell induziert werden (Möker, *et al.* 2004). Es muss also noch die Möglichkeit geben, die Transkription von *betP* oder *proP* einzeln zu modifizieren. Diese Modifikation ist aber nach wie vor abhängig von der Anwesenheit von MtrAB, da ohne MtrAB keine Transkription beider Gene stattfinden kann.

### **3.8 Veränderungen im Transkriptom von *C. glutamicum* bei hyperosmotischem Stress**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Real-time-PCR und Northernblot-Analysen erlaubten jeweils nur die Betrachtung einer kleinen Auswahl vom mRNA-Transkripten. Im Gegensatz dazu ist es über eine DNA-Microarray-Analyse möglich, Veränderungen im gesamten Transkriptom von *C. glutamicum* sichtbar zu machen. Hier wurde untersucht, wie sich das globale Expressionsmuster in *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg ändert. Drei verschiedene Zeitpunkte in der Anpassung an die hohe Salzkonzentration wurden in diesem Experiment untersucht. Es wurden Zell-Proben kurz nach einem Salzschock (10 Minuten), in der Anpassungsphase (nach 60 Minuten) und in adaptierten Zellen (nach 240 Minuten) genommen. Die drei entsprechenden Referenz-Proben wurden vor der Salzzugabe aus der Kultur entnommen. Aus allen Zell-Proben wurde anschließend DNA-freie RNA präpariert und über Northernblot (Integrität und Transkriptionsmuster) und PCR-Analyse (DNA-frei) kontrolliert. Von dieser RNA wurden jeweils 5,8  $\mu$ g zur cDNA Synthese eingesetzt. Hierbei wurden aminoallyl modifizierte (aa-dUTP) Nukleotide in die DNA eingebaut. Diese Modifizierung machte die Kopplung mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen möglich. Die Referenzproben wurden mit Cy3 und die „Salzproben“ mit Cy5 markiert. Die so markierte cDNA wurde dann zur Hybridisierung mit dem Microarray eingesetzt. Jeder DNA-Microarray enthielt 3568 *orf*-spezifische DNA-Fragmente (93,4 % CDS-Abdeckung), die jeweils vierfach aufgetragen waren. Zur Minimierung von Fehlern wurden für jeden Zeitpunkt zwei biologische Replikate vermessen,

was eine Gesamtsumme von 8 *Spots* pro *orf* für die statistische Auswertung ergab. Nach der Signaldetektion mit dem *ScanArray 4000* Microarray Scanner wurden die erhaltenen Bilder mit dem Programm *ImaGene* bearbeitet. In diesem Programm erfolgte die Signal-Hintergrund-Zuordnung, Spotdetektion und Quantifizierung. Im Anschluss daran wurden die erzeugten Dateien mit dem Programm *EMMA* Microarray Datenanalyse-Software normalisiert und es wurde ein t-Test durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden folgendermaßen vorsortiert: Es wurden alle Gene als nicht verändert angesehen, deren Regulationsfaktor im Bereich zwischen 1,75 und -1,75 lag. Diese Grenze wurde gewählt, um einen Abstand zum Bereich der technischen Fehlergrenze zu haben, die für dieses System mit 1,52 und -1,52 bestimmt wurde (Hüser *et al.*, 2003). Weiter wurden alle Gene aussortiert, deren p-Wert größer als 0,05 war und alle, für die weniger als 7 der 8 möglichen Spots gefunden worden waren. Für den Zeitpunkt  $T_{10}$  konnten so 92 *orfs* als induziert und 40 *orfs* als reprimiert bestimmt werden. Nach 60 Minuten stieg die Zahl der verändert transkribierten Gene auf 138 induzierte und 84 reprimierte an und fiel dann im Zeitpunkt  $T_{240}$  auf 81 induzierte und 56 reprimierte Gene ab. Die stärkste Veränderung im Transkriptom wurde beim Zeitpunkt  $T_{60}$  beobachtet und lag bei Faktoren von 6,47 und -5,57. Da insgesamt eine große Anzahl von Genen verändert transkribiert wurde, wurden die einzelnen Gene nach ihrer COG-Klasse (Roman *et al.*, 1997) und nach ihrer Induktion bzw. Repression sortiert (Eine genaue Auflistung aller veränderter Gene ist im Anhang in den Tabellen 15-17 dargestellt).

Tabelle 12: Nomenklatur der COG-Klassen nach Roman *et al.*, 1997

<b><i>COG</i></b> <b><i>Klasse</i></b>	<b><i>Funktion</i></b>
R+S	General function prediction only + Function unknown
T	Signal transduction mechanisms
P	Inorganic ion transport and metabolism
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
M	Cell wall/membrane biogenesis
L	Replication, recombination and repair
K	Transcription
J	Translation
I	Lipid transport and metabolism
H	Coenzyme transport and metabolism

<b><i>COG Klasse</i></b>	<b><i>Funktion</i></b>
G	Carbohydrate transport and metabolism
F	Nucleotide transport and metabolism
E	Amino acid transport and metabolism
D	Cell cycle control, mitosis and meiosis
C	Energy production and conversion

Diese Sortierung ermöglichte einen Überblick über die funktionellen Regulationsschwerpunkte im Transkriptom von *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock. Die graphische Auswertung dieser Sortierung ist in den Abbildungen 32, 33 und 34 für die verschiedenen Zeitpunkte zu sehen. In allen Zeitpunkten kodierten ca. 30 % der verändert transkribierten Gene für hypothetische Proteine oder für Proteine, die sich in keine COG-Klasse einordnen ließen (R+S). Betrachtet man die klassifizierten Gene in den drei Zeitpunkten, so sieht man, dass unter anderem die Klassen anorganischer Ionentransport / Metabolismus (P), Protein *turnover* / Modifikation und Chaperone (O) und die Klasse Zellwand- und Membranbiogenese (M) induziert sind. Die Klasse Proteintranslation (J) ist im Zeitpunkt T<sub>10</sub> induziert und wird dann in den Zeitpunkten T<sub>60</sub> und T<sub>240</sub> stark reprimiert. In Antwort auf den Salzschock werden also Funktionsgruppen angeschaltet, die für die Modifikation und Reparatur des vorhandenen Proteinpools benötigt werden und die für die Neusynthese und den Umbau der Zellwand und Zellmembran notwendig sind. Außerdem wird die COG-Klasse induziert, in der Gene für den Transport anorganischer Ionen liegen. Die Transkription von ribosomalen Proteinen hingegen wurde während der Anpassung an die hohe Osmolalität reduziert.

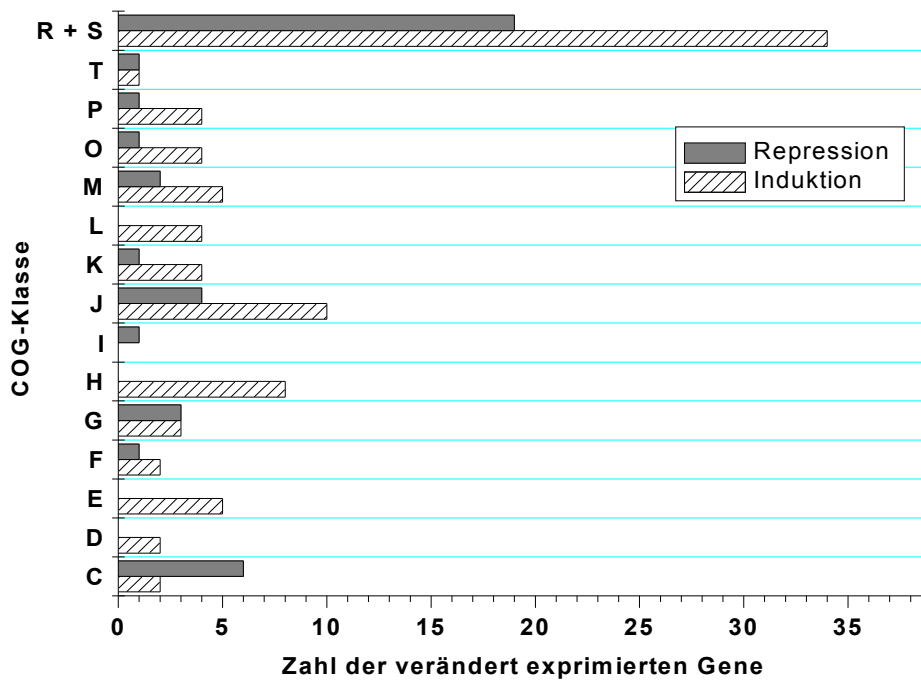


Abbildung 32: Verändert transkribierte Gen in den einzelnen COG-Klassen im Genom von *C. glutamicum* 10 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

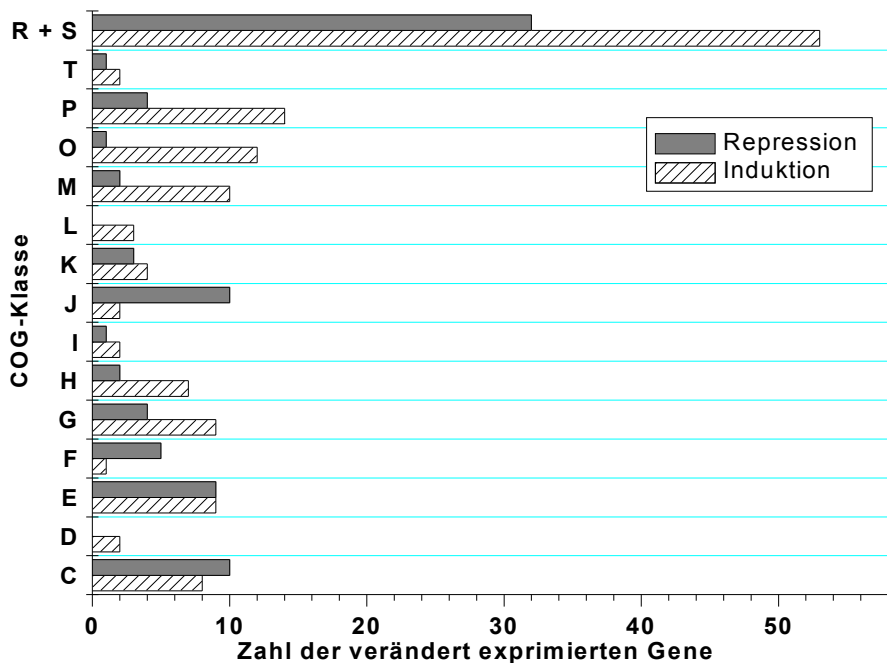


Abbildung 33: Verändert transkribierte Gen in den einzelnen COG-Klassen im Genom von *C. glutamicum* 60 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg



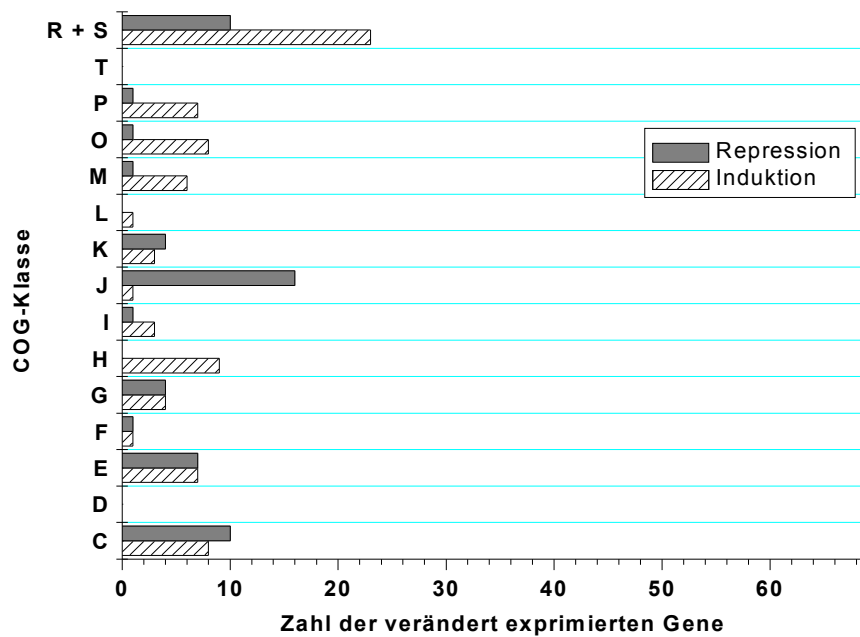


Abbildung 34: Verändert transkribierte Gen in den einzelnen COG-Klassen im Genom von *C. glutamicum* 240 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg

Für eine genauere Betrachtung einzelner Gene wurde der Schwerpunkt auf bekannte Gene der Osmoregulation (Tabelle 13) und der generellen Stressantwort (Tabelle 14) gelegt. Direkt nach dem Schock ( $T_{10}$ ) waren die Gene *proC* (Prolinsynthese), *proP* (Prolinaufnahme) und NCgl1096 (TrkA Homolog) induziert. Auf der Ebene der generellen Stressantwort wurden die Gene für die Chaperone *grpE*, *groEL* und *dnaK* und das Gen für das Stressprotein *dps* als induziert vorgefunden. Eine Stunde nach dem Salzschock war die Veränderung im Transkriptom deutlicher ausgeprägt. Hier zeigten sich im Bezug zur Osmoregulation die Gene *proA*, *proB*, *proC* (Prolinsynthese), *otsB*, *treS* *treX* (Trehalosemetabolismus), *kup*, NCgl1096 (Kaliumaufnahme), *proP* (Prolinaufnahme), *mrpCGF* ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter) und *mtrB* (Sensor-Histidinkinase) als induziert. Im Bereich der generellen Stressantwort wurden die Gene *grpE*, *dnaK*, *dnaJ* (Chaperone), *hspR* (Transkriptionsfaktor) *clpC*, *clpP2*, Ncgl0567 (Proteasen), *trxB*, *trxC* (Chaperon-ähnliche Funktion), *sod*, *kataA* (Superoxide Dismutase, Katalase) und das Gen für das Stressprotein *dps* als induziert vorgefunden. Im Zeitpunkt  $T_{240}$  nahm die Zahl der veränderten Gene mit direktem Einfluss auf die Osmoregulation wieder ab. Hier wurden *proC* (Prolinsynthese), Ncgl1096 (Kaliumaufnahme) und *mrpG* ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter) als induziert erkannt. Im Bereich der generellen Stressantwort blieben die Gene *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*

(Chaperone), *clpB*, *clpP2* und Ncgl0567 (Proteasen) induziert. Als in allen Zeitpunkten nicht verändert transkribiert wurden die Gene *ectP*, *betP*, *lcoP* (Transport kompatibler Solute), *otsA*, *treY* und *treZ* (Trehalosesynthese) gefunden. Dies ist überraschend, da schon gezeigt wurde, dass diese Gene osmotisch induzierbar sind (Wolf *et al.*, 2003; Weinand, 2004). Die einzige Erklärung für diese Ergebnis ist, dass die relativ hohe Ausgangs-osmolalität von 0,9 osm/kg in diesem Experiment nur noch zu einer schwachen Induktion dieser Gene führt. Weiter wurde bei der Arrayanalyse auch die veränderte Transkription einiger putativer Transkriptionsfaktoren beobachtet. Am interessantesten trat hier ein Regulator der TetR-Familie (NCgl1483) hervor, der in allen drei Zeitpunkten vergleichbar induziert war. Ein Sequenzvergleich zu anderen Proteinen über BLAST konnte aber keinen Hinweis auf die Funktion dieses putativen Regulators geben.

Insgesamt zeigte die Transkriptomanalyse das erwartete Ergebnis: Die Gene für Synthese und Aufnahme von Prolin, dem wichtigsten kompatiblen Solut unter diesen Wachstumsbedingungen, waren stark induziert und auch weitere Gene der Osmoregulation und generellen Stressantwort wurden gefunden. Dass gleichartig regulierte Gencluster (z.B. NCgl2699-NCgl2702) und funktionelle Gengruppen (z.B. *proABC*) gefunden wurden, spricht für die Qualität des Arrays.

Tabelle 13: Gene mit wichtigem Bezug zur Osmoregulation in *C. glutamicum*. In der einzelnen Zeitpunkten ist jeweilige Veränderung der Transkription angegeben. Der p-Wert für jeden Faktor war kleiner als 0,05.

<b>Gen- Name</b>	<b>NCgl-Nr.</b>	<b><math>T_{10}</math></b>	<b><math>T_{60}</math></b>	<b><math>T_{240}</math></b>	<b>Annotation</b>
<i>proA</i>	NCgl2272	-	<b>1,88</b>	-	Gamme-glutamyl phosphate reductase
<i>proB</i>	NCgl2274	-	<b>1,89</b>	-	Glutamate 5-kinase protein
<i>proC</i>	NCgl0398	<b>2,3</b>	<b>3,56</b>	<b>3,97</b>	Pyrroline-5-carboxylate reductase
<i>proP</i>	NCgl2961	<b>2,15</b>	<b>3,24</b>	-	Proline/Ectoine carrier
<i>otsB</i>	NCgl2528	-	<b>2,16</b>	-	Trehalose phosphatase
<i>treS</i>	NCgl2221	-	<b>2,45</b>	-	Trehalose synthase (Maltose alpha-D-glucosyltransferase)
<i>treX</i>	NCgl2222	-	<b>1,86</b>	-	Probable involved in trehalose metabolism
<i>kup</i>	NCgl0682	-	<b>1,85</b>	-	K <sup>+</sup> potassium transporter
-	NCgl1096	<b>2,25</b>	<b>5,59</b>	<b>1,9</b>	TrkA Homolog

<b>Gen- Name</b>	<b>NCgl-Nr.</b>	<b><math>T_{10}</math></b>	<b><math>T_{60}</math></b>	<b><math>T_{240}</math></b>	<b>Annotation</b>
<i>mrpC</i>	NCgl2634	-	<b>1,79</b>	-	Multisubunit Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter involved in pH regulation
<i>mrpG</i>	NCgl2638	-	<b>2,03</b>	<b>1,81</b>	Multisubunit Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter, G subunit
<i>mrpF</i>	NCgl2637	-	<b>2,36</b>	-	Multisubunit Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter, F subunit
<i>mtrB</i>	NCgl0722		2,77		Signal transduction histidine kinase

Tabelle 14: Gene mit wichtigem Bezug zur Generelle Stressantwort in *C. glutamicum*. In der einzelnen Zeitpunkten ist jeweilige Veränderung der Transkription angegeben. Der p-Wert für jeden Faktor war kleiner als 0,05.

<b>Gen- Name</b>	<b>NCgl-Nr.</b>	<b><math>T_{10}</math></b>	<b><math>T_{60}</math></b>	<b><math>T_{240}</math></b>	<b>Annotation</b>
<i>groEL</i>	NCgl2621	<b>2,21</b>	-	-	Chaperonin cpn60 (60Kd subunit)
<i>hspR</i>	NCgl2699	-	<b>2,89</b>	-	Transcriptional regulator merr family
<i>dnaJ</i>	NCgl2700	-	<b>3,23</b>	<b>1,77</b>	Chaperone with DnaK, heat shock protein (DnaJ protein)
<i>grpE</i>	NCgl2701	<b>2,05</b>	<b>2,79</b>	<b>1,79</b>	Molecular chaperone GrpE (heat shock protein)
<i>dnaK</i>	NCgl2702	<b>2,56</b>	<b>3,43</b>	<b>2,71</b>	Heat shock protein hsp70
<i>clpC</i>	NCgl2585	-	<b>3,07</b>	-	Probable ATP-dependent protease (heat shock protein)
<i>clpB</i>	NCgl2682	-	-	<b>1,78</b>	Probable ATP-dependent protease (heat shock protein)
<i>clpP2</i>	NCgl2327	-	<b>3,57</b>	<b>1,92</b>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit CLPP2
-	NCgl0567	-	<b>2,03</b>	<b>1,86</b>	homolog of metal-dependent proteases, putative molecular chaperone
<i>trxB</i>	NCgl2984	-	<b>2,15</b>	-	Thioredoxin reductase
<i>trxC</i>	NCgl2985	-	<b>1,86</b>	-	Thioredoxin
<i>sod</i>	NCgl2826	-	<b>2,32</b>	-	Manganese superoxide dismutase

Ergebnisse

<i>Gen- Name</i>	<i>NCgl-Nr.</i>	<i>T<sub>10</sub></i>	<i>T<sub>60</sub></i>	<i>T<sub>240</sub></i>	<i>Annotation</i>
<i>katA</i>	NCgl10251	-	<b>2,47</b>	-	Catalase
<i>dps</i>	NCgl12897	<b>3,9</b>	<b>3,24</b>	-	Starvation-induced DNA protecting protein

## IV. Diskussion

### 4.1 Bedeutung der Prolinakkumulation in *C. glutamicum* bei hyperosmotischem Stress

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des kompatiblen Solut Prolin für die Osmoadaptation von *C. glutamicum* untersucht. Prolin stellt im Wildtyp die wichtigste Schutzsubstanz bei Stickstoffüberschuss dar, welche bei hyperosmotischem Stress akkumuliert wird (Wolf *et al.*, 2003; Ley, 2001; Rönsch, 2000; Frings *et al.*, 1993; Guillouet *et al.* 1995). Die Synthese von Prolin als kompatiblen Solut erfolgt dabei über die gleichen drei Enzyme (ProA, ProB und ProC), die auch Prolin für den Zellanabolismus bereitstellen (Ley, 2001). Die Gene dieser Enzyme wurden von Serebrijski *et al.* (1995) und Ankri *et al.* (1996) charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *proB* oder *proC* jeweils einen prolinauxotrophen Phänotyp hervorruft, während die Deletion von *proA* über den *asd-bypass* umgangen werden kann. In dieser Arbeit wurde nun untersucht, wie die Deletionsstämme 13032 $\Delta$ *proA* und 13032 $\Delta$ *proC* (exemplarisch für 13032 $\Delta$ *proC* und 13032 $\Delta$ *proB*) auf hyperosmotischen Stress reagieren, wenn extern kein Prolin vorliegt. Durch die Anzucht dieser Stämme und die Analyse der internen Aminosäuren Glutamat, Glutamin und Prolin konnte gezeigt werden, dass eine interne Akkumulation von Prolin zwar wichtig aber nicht essentiell für die Osmoadaptation von *C. glutamicum* ist. So zeigte 13032 $\Delta$ *proA* auch unter hyperosmotischen Bedingungen Wachstum, obwohl der Stamm Prolin nicht als Osmoschutzsubstanz akkumulieren konnte. Die Analyse der internen Aminosäuren zeigte, dass in 13032 $\Delta$ *proA* Prolin durch Glutamin ersetzt wurde. Die internen Glutaminmengen, die dieser Stamm akkumulierte, waren deutlich höher als die Mengen, die der Wildtyp normalerweise transient akkumuliert. Die Anzucht von 13032 $\Delta$ *proC* unter hyperosmotischen Bedingungen zeigte eine ähnlich hohe Akkumulation von Glutamin. Aufgrund der Prolinauxotrophie war diesem Stamm aber kein Wachstum möglich. Der Stamm 13032 $\Delta$ *proA* hingegen konnte wachsen, zeigte aber eine deutliche Verlangsamung im Vergleich zum Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass die hohe Akkumulation von Glutamin entweder störend auf den Zellstoffwechsel wirkt oder keine optimale Einstellung des Zellturgors im Bezug zur externen Osmolalität erlaubt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die schnelle Akkumulation von Glutamin im Wildtyp nur transient ist und normalerweise durch eine langfristige Akkumulation von Prolin ersetzt wird. Beobachtet man den zeitlichen Verlauf von Prolin und Glutaminakkumulation im Wildtyp, so fällt auf, dass die interne Menge an

Glutamin sich erst dann verringert, wenn der interne Prolinpool ansteigt. Eine Erklärung für den Austausch der beiden Aminosäuren im Wildtyp wäre die, dass die Synthese von Prolin den internen Pool von Glutamat verringert und dieses dann über die Glutamatsynthase von Glutamin aus nachgeliefert wird. So könnte die transiente Akkumulation von Glutamin im Wildtyp eine Vorbereitung für die langfristige Akkumulation von Prolin sein. Die schnelle Akkumulation von Glutamin würde so einen kleinen Pool an Stickstoff für die spätere Synthese von Prolin bereitstellen. Gegen diese Hypothese spricht aber die Beobachtung, dass die Glutamatsynthase bei Wachstumsbedingungen ohne Osmostress keinen signifikanten Einfluss auf den internen Glutamatpool hat (Beckers *et al.*, 2001). Die Deletionsmutanten scheinen Glutamin also wirklich zur Adaptation an die hohe Osmolalität zu akkumulieren und nicht, um eigentlich Prolin zu synthetisieren. Dass die Akkumulation von Glutamin der von Glutamat vorgezogen wird, liegt vermutlich daran, dass Glutamin bei physiologischen pH-Werten zwar polar, aber ungeladen ist. Die Akkumulation von Glutamin macht somit die gleichzeitige Akkumulation eines Gegenions überflüssig. *C. glutamicum* kann seinen internen Pool an Solute also sehr variabel gestalten, um sich an hyperosmotische Bedingungen anzupassen. Vergleichbar konnte von Wolf *et al.* (2003) gezeigt werden, dass *C. glutamicum* bei Stickstoffhunger und Osmostress Trehalose statt Prolin synthetisiert. Das Verhältnis von Prolin zu Trehalose ist außerdem stark von der angebotenen C-Quelle abhängig. So werden bei Maltose als C-Quelle vergleichbare Prolin- und Trehalosemengen synthetisiert (Wolf *et al.*, 2003). Die Untersuchung der internen Trehalosemengen steht für die Deletionsmutanten 13032 $\Delta$ *proA* und 13032 $\Delta$ *proC* noch aus und könnte die Differenz in der Summe der internen Solute (Glutamat + Glutamin + Prolin) zwischen dem Wildtyp (~1000  $\mu$ mol/gBTM) und den Mutanten (~600  $\mu$ mol/gBTM) erklären. Andererseits wurde schon gezeigt, dass Trehalose bei den hier verwendeten Wachstumsbedingungen kaum eine Bedeutung für die Osmoresistenz von *C. glutamicum* hat und der Zucker nur ca. 10 % Anteil am Pool der Solute hat (Wolf *et al.*, 2003). Dies relativiert die Vermutung, dass in den Deletionsmutanten wirklich große Mengen von Trehalose akkumuliert werden.

## 4.2 Charakterisierung der Transkription von *proA*, *proB* und *proC*

Die Induktion der Transkription von Systemen der Osmoregulation spielt eine wichtige Rolle in der Anpassung von Organismen an hyperosmotischen Stress. So konnte für *B. subtilis* gezeigt werden, dass das Transportsystem OpuE, welches Prolin für den Osmoschutz in die Zelle transportiert, nur auf der Ebene der Expression reguliert wird. Während die Aktivität des Proteins unverändert bleibt, wird die Menge des Proteins genau im Bezug zur externen Osmolalität eingestellt und sorgt so für eine Aufnahme von Prolin in die Zelle (Spiegelhalter *et al.*, 1998). Eine solche Regulation der Transkription in Abhängigkeit von der externen Osmolalität konnte aber nicht nur für Transportsysteme, sondern auch für Synthesewege kompatibler Solute gezeigt werden. So werden der *otsAB*-Weg (Trehalosesynthese) in *E. coli* und der *ggpS*-Weg (Glucosylglycerolsynthese) in *Synechocystis* sp. PCC6803 und der *proHJ*-Weg (Prolinsynthese) in *B. subtilis* durch eine Erhöhung der externen Osmolalität induziert (Giaever *et al.*, 1988; Marin *et al.*, 2002; Steil *et al.*, 2003; Petersohn *et al.*, 2001). In *C. glutamicum* war bekannt, dass die Expression der Gene *proA*, *proB* und *proC* nach einem hyperosmotischen Schock induziert wird (Ley, 2001). Unbekannt war, welche Bedeutung die Induktion dieser Gene für den Aufbau des internen Prolinpools von *C. glutamicum* hat. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass eine graduelle Transkriptionsantwort in Abhängigkeit von der externen Osmolalität möglich ist. Während ein moderater osmotischer Schock (0,36 auf 0,9 osm/kg) nur zu einer leichten Induktion der drei Gene führte, wurde durch stärkeren osmotischen Stress (0,36 auf 1,7 osm/kg oder 0,9 auf 2,2 osm/kg) auch eine deutlich stärkere Induktion der Gene *proA*, *proB* und *proC* erreicht. Waren die Zellen hingegen schon an eine hohe Osmolalität adaptiert (1,7 osm/kg), so führte eine weitere Zugabe von NaCl (0,5 M) nicht mehr zu einer signifikanten Induktion der Gene. Dies zeigt, dass bei einer hohen Ausgangs-osmolalität der Proteinpool von *C. glutamicum* kaum noch verändert werden muss, um die Anpassung an eine höhere Osmolalität zu bewerkstelligen. Interessanterweise ließ sich nicht nur eine Induktion der Gene durch hyperosmotischen Stress zeigen, sondern auch eine starke Repression durch hypoosmotische Stressbedingungen. Die Repression der Transkription von *proA*, *proB* und *proC* unter solchen Bedingungen scheint sinnvoll, da *C. glutamicum* bevorzugt Prolin aus der Zelle schleust, um den Zellturgor neu zu justieren (Ruffert *et al.*, 1999). Durch die veränderte Transkription der Gene des Prolinbiosyntheseweges kann dann gleichzeitig eine dauerhafte Überproduktion von Prolin verhindert werden. Diese Beobachtung liefert einen ersten Hinweis dafür, dass der Syntheseweg von Prolin hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert wird. Weitere Experimente konnten die Vermutung bestätigen, dass die Expressionssteigerung von *proA*,

*proB* und *proC* essentiell für eine hohe interne Akkumulation von Prolin ist. Wurde die Proteintranslation in *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock (0,3 auf 2,2 osm/kg) durch die Zugabe von Chloramphenicol unterbunden, so stieg der interne Prolinpool von 40 µmol/gBTM auf nur knapp 200 µmol/gBTM statt ~650 µmol/gBTM Prolin an. Die Synthese von Prolin wird in *C. glutamicum* also hauptsächlich über eine Steigerung der Expression erreicht. Eine Aktivierung der Enzyme findet nur in geringem Ausmaß statt. Eine vergleichbare Beobachtung wurde für den osmoregulierten Prolinsyntheseweg (*proHJ*) von *B. subtilis* gemacht. Für diesen konnte gezeigt werden, dass er nur auf der Ebene der Expression und nicht auf der Ebene der Enzymaktivität reguliert wird (Bremer, persönliche Mitteilung).

Die Quantifizierung der Transkriptionssteigerung von *proA*, *proB* und *proC* mittels *real-time*-PCR konnte erste Hinweise darauf geben, dass die Induktion von *proC* eine Schlüsselrolle bei der langfristigen Einstellung des internen Prolinpools hat. Während direkt nach einem hyperosmotischen Schock sowohl *proA* (Faktor: 3,1-4,9) als auch *proC* (Faktor: 2,5-4,6) induziert waren, wurde in salzadaptierten Zellen nur *proC* (Faktor: 2,8) als signifikant induziert entdeckt. Eine vergleichbare Beobachtung konnte in der Microarray-Analyse gemacht werden. In diesen Experimenten war die Induktion der Transkription von *proC* (Faktor: 2,3-3,9) stärker als die von *proA* (Faktor: 1,9) und *proB* (Faktor: 1,9) und war außerdem im Gegensatz zu *proA* und *proB* in allen Zeitpunkten zu detektieren. Dass in den *real-time*-PCR-Analysen *proB* nicht als signifikant induziert gefunden wurde, wird vermutlich an einem experimentellen Fehler liegen, da *proB* übereinstimmend sowohl auf den Dot-Blot-Analysen als auch auf dem Microarray als induziert vorgefunden wurde. Dass die Stärke der Induktion von *proA*, *proB* und *proC* nur bei einem Faktor um 3 liegt, ist überraschend, da in anderen Organismen die Hauptsynthesewege für kompatible Solute meist stärker induziert werden. So konnten für den osmoregulierten Prolinsyntheseweg (*proHJ*) von *B. subtilis* Induktionsfaktoren von 16-22 bei Wachstum in hochosmolarem Medium (1,2 M NaCl) und Faktoren um 5 bei einer Salzugabe von ~0,6 M beobachtet werden. Eine Erklärung für diesen Unterschied in der Induktionsstärke ist, dass die Basisosmolalität in diesen Experimenten nur bei 0,4 osm/kg im Gegensatz zu den hier verwendeten 0,9 osm/kg lag. Der relative osmotische Stress war in den von Steil *et al.* und Petersohn *et al.* durchgeführten Experimenten also deutlich stärker (Steil *et al.*, 2003; Petersohn *et al.*, 2001). Betrachtet man die Steigerung des internen Prolinpools von *C. glutamicum* bei einem Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg, so sieht man, dass dieser auch nur um einen Faktor von 3-4 ansteigt (von ~180 auf ~650 µmol/gBTM), was in Übereinstimmung mit dem Induktionsfaktor der Transkription



liegt. Eine weitere Bestätigung für den Induktionsfaktor von 3 und die Schlüsselfunktion von *proC* bei der Osmoadaptation lässt sich über einen Vergleich mit dem nah verwandten *Brevibacterium lactofermentum* erhalten. Für dieses konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität der Pyrrolincarboxylat-Reduktase (*proC*) unter Osmostress dreifach erhöht ist und die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamat-Kinase (*proB*) unter den gleichen Bedingungen unverändert bleibt (Kawahara *et al.*, 1989).

### 4.3 Wie wird die Transkriptionsregulation von *proA*, *proB* und *proC* erreicht?

Während eine Aktivierung der Transkription von *proA*, *proB* und *proC* in Abhängigkeit von der externen Osmolalität deutlich gezeigt werden konnte, war es nicht möglich, den Mechanismus dieser Regulation aufzuklären. Durch verschiedene methodische Ansätze ließen sich aber mehrere Möglichkeiten ausschließen, sodass der Regulationsmechanismus eingegrenzt werden konnte. So zeigten Mutanten, in denen jeweils das Gen eines alternativen  $\sigma$ -Faktors deletiert war, weder einen Wachstumsphänotyp bei hyperosmotischem Stress noch einen Regulationsverlust der Gene *proA*, *proB* und *proC*. Der Promoter dieser drei Gene wird also von  $\sigma^A$  (*housekeeping*-Faktor) erkannt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Transkriptionsstartpunkte der drei Gene durch hyperosmotischen Stress nicht verändert werden (Ley, 2001). Für *C. glutamicum* scheinen die alternativen Sigmafaktoren bei den hier untersuchten Bedingungen generell keine wichtige Funktion zu erfüllen. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die in *E. coli* und *B. subtilis* gemacht wurden. In *E. coli* stehen wichtige Komponenten der Osmoregulation unter der Kontrolle des alternativen Sigmafaktors RpoS ( $\sigma^S$ ). RpoS ist der Sigmafaktor der generellen Stressantwort in *E. coli*. Er reguliert unter anderem die Transkription von *proP* (Aufnahme kompatibler Solute) und die des *otsAB*-Operons (Trehalosesynthese) (Mellies *et al.*, 1995; Hengge-Aronis *et al.*, 1991). Die Deletion von *rpoS* führt in *E. coli* zu einem osmosensitiven Stamm. Dies liegt daran, dass ohne  $\sigma^S$  keine gesteigerte Synthese von Trehalose mehr möglich ist (Hengge-Aronis *et al.*, 1991). In *B. subtilis* ist die Deletion des Sigmafaktors der generellen Stressantwort ( $\sigma^B$ ) nur dann mit einem osmosensitiven Phänotyp verbunden, wenn die Stressbedingungen kein Wachstum mehr erlauben (Völker *et al.*, 1999). Dies liegt daran, dass der Großteil der osmorelevanten Gene in *B. subtilis* nicht unter der Kontrolle von  $\sigma^B$  stehen, sondern auf andere Weise induziert werden können (Steil *et al.* 2003; Petersohn *et al.*, 2001). Ausnahmen sind die Transportsysteme OpuD und OpuE, deren Transkription teilweise von  $\sigma^B$  abhängig ist

(Spiegelhalter *et al.*, 1998; von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter & Bremer, unveröffentlicht). So besitzt *opuE* sowohl einen Promotor für  $\sigma^B$  als auch für  $\sigma^A$ . Beide Promotoren haben eine unterschiedliche Bedeutung für die Expression des Gens. Während die Transkription von  $\sigma^B$  eine starke transiente Induktion nach einem hyperosmotischen Schock erlaubt, wird über die Transkription von  $\sigma^A$  langfristig die Expression von *opuE* reguliert und auf die externe Osmolalität eingestellt (Spiegelhalter *et al.*, 1998; von Blohn *et al.*, 1997). Dass die Regulation der Gene *proA*, *proB* und *proC* in *C. glutamicum* über zwei Promotoren erfolgt, kann aber aufgrund der unveränderlichen Transkriptionsstartpunkte ausgeschlossen werden. Neben der Regulation über Sigmafaktoren bilden zwei-Komponenten-Systeme eine weit verbreitete Möglichkeit, die Transkription von Genen in der Abhängigkeit von externen Reizen zu regulieren. Ein Untersuchung der Beteiligung von zwei-Komponenten-Systemen an der Osmoadaptaion von *C. glutamicum* wurde auch schon durchgeführt. Es wurde der Einfluss von zwölf der dreizehn bekannten zwei-Komponenten-Systeme auf die Transkription von *proB* untersucht (Möker, 2002). Hierbei zeigte sich, dass keines der zwei-Komponenten-Systeme für die Induktion von *proB* bei hyperosmotischem Stress verantwortlich ist. Das einzige zwei-Komponenten-Systeme, dass überhaupt einen Bezug zu osmoregulierten Genen (*proP*, *betP*, *lcoP*) aufwies, war MtrAB (Möker *et al.*, 2004). Weder alternative Sigmafaktoren noch zwei-Komponenten-Systeme sind also für die Transkriptionsaktivierung von *proA*, *proB* und *proC* verantwortlich. Eine weitere generelle Möglichkeit, den internen Pool von Aminosäuren zu beeinflussen, ist die stringente Kontrolle. Über diesen Regulationsmechanismus wird der Zellmetabolismus auf die Verfügbarkeit bzw. den Mangel an einer Aminosäure eingestellt. Dass auch dieser Mechanismus keinen Einfluss auf die Expression der Gene *proA*, *proB* und *proC* hat, konnte durch die Anzucht einer *relA*-Mutante gezeigt werden.

Da die Untersuchung von bekannten regulatorischen Mechanismen nicht zur Identifizierung eines Regulators führte, wurde in dieser Arbeit eine direkte Suche nach individuellen Transkriptionsfaktoren über die matrixgekoppelten Promotorbereiche von *proA*, *proB* und *proC* durchgeführt. Die dabei verwendete Methode wurde in *C. glutamicum* auch schon erfolgreich angewandt und führte zur Identifizierung der Transkriptionsfaktoren RamB und McbR (Gerstmeir *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2003). Auf dieser Methode basierend wurden 400bp große DNA-Fragmente erstellt, bei denen jeweils der Transkriptionsstartpunkt des untersuchten Gens in der Mitte des DNA-Fragmentes lag. Durch Optimierung der Reinigungsbedingungen konnten mit diesen DNA-Fragmenten zwei putative Transkriptionsfaktoren für die Gene *proA*, *proB* und *proC* gefunden werden. Die weitere

Analyse dieser Kandidaten (*orf1175* und *orf2014*) zeigte aber, dass sie keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene haben. Dass die beiden Proteine trotzdem an die DNA-Fragmente gebunden hatten, kann ein Hinweis dafür sein, dass sie in relativ großer Zahl in der Zelle vorliegen. Dies könnte sowohl auf ein LexA-Homolog (*orf2014*) wie auch für eine putative Exonuclease (*orf1175*) zutreffen. Hinweise, dass *orf2014* wirklich für das LexA-Homolog von *C. glutamicum* kodiert, sind neben der Identität von 54 % (Ähnlichkeit von 71 %) zu LexA aus *Mycobacterium tuberculosis* (Movahedzadeh *et al.*, 1997) die Beobachtung, dass der Leserahmen nicht deletiert werden kann. Dass kein Transkriptionsfaktor für *proA*, *proB* und *proC* über die Methode der DNA-Affinitätsreinigung gefunden wurde, kann mehrere Gründe haben. Obwohl verschiedene Pufferbedingungen getestet wurden, ist es z.B. nicht auszuschließen, dass die gewählten Ionenkonzentrationen während der Anbindung der Proteine an die DNA-Fragmente für den gesuchten Faktor ungünstig waren. Weiter besteht die Möglichkeit, dass die DNA-Fragmente zu kurz gewählt wurden und so ein Sequenzmotiv, das für die Bindung eines putativen Faktors notwendig gewesen wäre, nicht vorhanden war. Diese Möglichkeit ist aber unwahrscheinlich, da die meisten aktivierenden Transkriptionsfaktoren im Bereich zwischen -35 und -91 (bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt) an der DNA binden (Barnard *et al.*, 2004). Um diese bevorzugten Bindestellen sicher abzudecken, wurde für die benutzten DNA-Fragmente ein Bereich von -200 bis +200 ausgewählt. Geht man also davon aus, dass sowohl die Promotorregion der einzelnen Gene als auch die Anbindungsbedingungen korrekt gewählt wurde, so bleibt als wahrscheinlichste Erklärung übrig, dass kein zusätzlicher Proteinfaktor direkt an die Promotorregion der Gene binden muss, um diese zu regulieren. Für diese Vermutung spricht auch, dass eine Erhöhung der Promotorkopienzahl in *C. glutamicum* nicht zu einem Regulationsverlust der Gene *proA*, *proB* und *proC* führte. Natürlich kann diese Beobachtung auch dadurch erklärt werden, dass der putative Transkriptionsfaktor in großer Menge vorhanden ist, oder dass seine Menge reguliert wird. In beiden Fällen wäre so kein Einfluss auf die Transkription der Gene zu beobachten. Eine proteinunabhängige Regulation der drei Gene wäre z.B. über kleine RNAs möglich, die direkt an die mRNA binden und so einen regulatorischen Effekt hervorrufen. Für *E. coli* konnte schon 1987 von Aiba *et al.* eine osmoabhängige Regulation von OpmF durch die MicF sRNA beschrieben werden. OpmF wie auch OmpC sind Porine der äußeren Zellmembran von *E. coli* und werden unter anderem durch das zwei-Komponenten-System OmpR (Antwortregulator) / EnvZ (Sensor kinase) reguliert (Pratt *et al.*, 1996). Neben der Transkriptionsregulation über OmpR wird die Translation der *ompF* und *ompC* mRNAs durch die sRNA's MicF und MicC reguliert. In

beiden Fällen wird durch eine Basenpaarung der sRNA mit der mRNA in der Nähe der Ribosomenbindestelle die Translation der mRNA unterdrückt (Chen *et al.*, 2004; Ramani *et al.*, 1994). Die Menge der vorhandenen MicF- und MicC-sRNA's wird ihrerseits durch verschiedene Wachstums- und Stressbedingungen eingestellt, wobei der Mechanismus bis jetzt noch unbekannt ist (Chen *et al.*, 2004). In der Literatur wird außerdem diskutiert, dass kleine RNA's die Stabilität von mRNA-Transkripten direkt beeinflussen können (Massé *et al.*, 2003; Bartel 2004). Dass die Stabilität der *proA*, *proB* und *proC* mRNA's in *C. glutamicum* bei hoher externer Osmolalität spezifisch gesteigert wird, konnte aber durch einen Vergleich des mRNA *turn-over* verschiedener Transkripte ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Transkriptmengen bei niedriger und hoher Osmolalität nach Inhibition der mRNA-Synthese zeigte, dass die hohe Osmolalität zu einer generellen Verlangsamung des mRNA-Abbaus führt. Diese Experimente wurden jeweils mit adaptierten Zellen durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Faktoren vorhanden waren, die die mRNA-Stabilität beeinflussen könnten. Da aber kein spezifischer Effekt auftrat, kann man davon ausgehen, dass die erhöhte Menge an *proA*, *proB* und *proC* mRNA's bei hyperosmotischem Stress durch *de-novo*-Synthese bereitgestellt wird. Wie wird nun diese Aktivierung der mRNA-Synthese bewerkstelligt? Schließt man Sigmafaktoren, zwei-Komponenten-Systeme, individuelle Transkriptionsfaktoren und eine Veränderung der mRNA-Stabilität aus, so bleibt als attraktive Möglichkeit eine veränderte Aktivität der RNA-Polymerase bei hyperosmotischem Stress als Regulationspunkt übrig. Dass eine solche Regulation in Abhängigkeit vom Promotor möglich ist, konnte 2004 von Lee *et al.* in *E. coli* demonstriert werden. In *in-vitro*-Experimenten mit einer  $\sigma^S$ -RNA-Polymerase konnte gezeigt werden, dass die Transkription des Gens *osmY* durch steigende  $K^+$ /Glutamat-Konzentrationen induziert wird. Dieser Effekt war aber nicht bei jedem  $\sigma^S$ -Promotor zu beobachten, sondern hing von der Sequenz des Promotors ab. Von den Autoren wurde diskutiert, dass die Region stromaufwärts des Promotors eine DNA-Struktur aufweisen soll, die mit der RNA-Polymerase interagieren kann und so die Transkription bei geringen  $K^+$ /Glutamat-Konzentrationen behindert. Ein Anstieg der  $K^+$ /Glutamat-Konzentration *in-vitro* (der *in-vivo* bei osmotischem Stress zu beobachten ist) soll die DNA-Struktur dann verändern und so die Transkription erleichtern (Lee *et al.*, 2004). Dass die Veränderung der DNA-Struktur (negatives *supercoiling*) eine wichtige Rolle bei der generellen Induktion osmoregulierter Gene hat, konnte in *E. coli* auch schon gezeigt werden. Durch die Applikation des Antibiotikums *novobiocin* (Vergiftung der Gyrase) während eines hyperosmotischen Schocks wurde die Induktion vieler osmorelevanter Gene (z.B. *otsAB*) unterdrückt (Cheung *et al.*, 2003). Ob ein hyperosmotischer Schock auch in *C. glutamicum* zu

einer Veränderung der DNA-Struktur führt, die dann ihrerseits vielleicht die Transkription der osmoregulierten Gene induziert, stellt eine interessante Frage dar, die untersucht werden sollte. Ein Hinweis, der in diese Richtung deutet, ist, dass auch in *C. glutamicum* die interne Kaliumkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock ansteigt (Botzenhardt, 2004; Burger, 2002). Eine Zunahme der internen Glutamatkonzentrationen, die im *in-vitro*-System von Lee et al. (2004) essentiell war, ist andererseits nicht immer zu beobachten und hängt vermutlich von der Wachstumsphase ab (Wolf et al., 2003; Rönsch et al., 2003; Ley, 2001; Burger, 2002). Dass die interne Kaliumkonzentration alleine ein wichtiges Signal in der Osmoregulation von *C. glutamicum* darstellt, konnte an dem Transportsystem BetP demonstriert werden. BetP kann unabhängig von anderen Faktoren eine Veränderung der internen Kaliumionenkonzentration wahrnehmen und dadurch aktiviert werden (Rübenhagen et al., 2001). Falls die Induktion der Transkription von *proA*, *proB* und *proC* auch durch eine Veränderung der internen Kaliumionenkonzentration hervorgerufen würde, müsste diese Transkription über den  $\sigma^A$  Promotor laufen. Dies stellt natürlich einen Unterschied zu *E. coli* dar, da dort eine  $\sigma^S$ -Polymerase für die Aktivierung verantwortlich ist. Eindeutig klären lässt sich diese Hypothese nur in einem vergleichbaren *in-vitro*-System mit einer gereinigten  $\sigma^A$ -Polymerase und den Promotorregionen von *proA*, *proB* und *proC*.

#### 4.4 Abbau und Kontrolle des internen Prolin pools in *C. glutamicum*

*C. glutamicum* akkumuliert bei hyperosmotischem Stress Prolin über die Enzyme ProA, ProB und ProC. Während die Aktivität dieser Enzyme bei osmotischem Stress nur leicht erhöht wird, findet eine deutliche Induktion auf der Ebene der Expression statt. Wie reguliert *C. glutamicum* nun die massive Akkumulation von Prolin und stellt die interne Konzentration auf die externe Osmolalität ein? Möglichkeiten, den internen Pool zu regulieren, wären z.B.: eine Verringerung der Enzymmenge ab einer gewissen Größe des Prolin pools; ein gleichzeitiger Abbau von Prolin, sobald der osmotische Stress überwunden ist; unveränderte Synthese von Prolin mit gleichzeitigem Export von „überproduzierten“ Soluten.

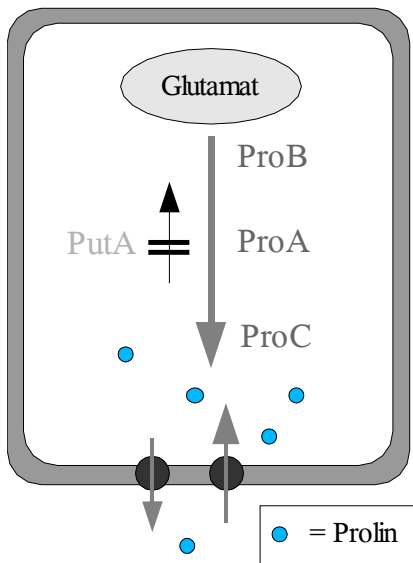
Dass der Abbau von Prolin keine Rolle bei der Kontrolle des internen Prolin pools spielt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Deletion des einzigen Leserahmens mit einer Ähnlichkeit zu *putA* aus Enterobakterien führte nicht zu einer signifikanten Veränderung im internen oder externen Prolin pool. Das langsame Absinken der internen Prolinmenge bei Erreichen der stationären Wachstumsphase war sowohl im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante ( $\Delta orf486$ ) zu beobachten. Gleichzeitig stieg die externe Konzentration von

Prolin an. Dies legt die Vermutung nahe, dass in *C. glutamicum* überhaupt kein Abbau von Prolin möglich ist. Dass ein Abbau von Prolin generell nicht notwendig für die Einstellung des internen Pools ist, konnte auch schon in *S. typhimurium* beobachtet werden. Mutanten, in denen *putA* ausgeschaltet war, zeigten einen unveränderten internen Pool an Prolin (Csonak, 1988). In *C. glutamicum* scheint der interne Prolinpool einfach durch die Exkretion von „überproduziertem“ Prolin eingestellt zu werden. Die Unterschiede in der externen Prolinkonzentration zwischen einzelnen Experimenten und die hohe Exkretion an sich deuten weiter darauf hin, dass der externe Prolinpool nicht reguliert wird und es keine „Rückkopplung“ auf die Biosynthese von Prolin gibt. Überraschend ist die frühe Akkumulation von externem Prolin nach einem hyperosmotischen Schock. Obwohl *C. glutamicum* effiziente Transportsysteme für Prolin besitzt (EctP, ProP und PutP), findet schon während der exponentiellen Wachstumsphase eine externe Akkumulation von Prolin statt. Dies ist erstaunlich, da sowohl EctP als auch ProP durch hyperosmotischen Stress aktiviert werden (Peter *et al.*, 1998;). Möglicherweise werden die Transporter bei Erreichen eines bestimmten internen Prolinpools in ihrer Aktivität gedrosselt. Dass sich die Exkretion in der stationären Phase dann noch verstärkt, ist andererseits nicht ungewöhnlich, da gezeigt werden konnte, dass sich dann das Zellvolumen von *C. glutamicum* deutlich verringert (Rönsch *et al.*, 2003). Eine vergleichbare Regulation des internen Pools für kompatible Solute findet in *S. cerevisiae* statt. *S. cerevisiae* akkumuliert Glycerol als kompatibles Solut zum Schutz vor hyperosmotischem Stress. Die interne Menge an Glycerol wird dabei über die Synthese (Aktivierung durch HOG-*Pathway*) und den Export von Glycerol über Fps1 bestimmt. Exportiertes Glycerol kann von *S. cerevisiae* (im Gegensatz zu anderen Hefen) dann aber nicht mehr in die Zelle aufgenommen werden und ist für den Organismus verloren (Tamas *et al.*, 1999). Für *C. glutamicum* lässt sich die Verschwendung von Stickstoff und Energie bei der Exkretion von Prolin am besten durch den großen Überschuss von N- (Amonium und Harnstoff) und C-Quelle (Saccharose) erklären, der bei den Experimenten vorhanden war. Da ein solcher Überschuss im natürlichen Habitat von *C. glutamicum* aber nie vorkommen wird, ist davon auszugehen, dass dort auch keine starke Überproduktion von Prolin erfolgen wird. Um diese Vermutung zu bestätigen, sollte die Auswirkung der Limitierung von C- und N-Quelle bei hyperosmotischem Stress auf die Exkretion von Prolin untersucht werden. Diese Experimente müssten aber im Fermenter durchgeführt werden, da nur dort eine kontinuierliche Einstellung der Wachstumsbedingungen möglich wäre. Dass ein generelle Exkretion intern akkumulierter kompatibler Solute nicht ungewöhnlich ist, konnte schon in vielen Microorganismen gezeigt werden. So transportiert *B. subtilis* Prolin, *E. coli*

Trehalose und *Halomonas elongata* Ectoin ins umgebende Medium. In allen drei Organismen werden die „verlorenen“ Substanzen aber wieder effektiv in die Zelle aufgenommen und nur nach Deletion der Transportsysteme (OpuE, TreA/PTS<sup>Glc</sup> und TeaABC) sind bedeutende Mengen im Medium zu finden (von Blohn *et al.*, 1997; Boos *et al.*, 1996; Grammann *et al.*, 2002).

Der einzige Leserahmen (*orf486*) im Genom von *C. glutamicum*, der eine akzeptable Ähnlichkeit zu PutA aus Enterobakterien aufweist und außerdem durch Prolin induziert wird, ist also nicht für den Abbau von Prolin zuständig. Eine denkbare Möglichkeit ist die, dass *orf486* nur noch für den „Überrest“ eines ehemals funktionellen PutA-Proteins kodiert, das in *C. glutamicum* seine Funktion verloren hat. Einen weiteren Hinweis dafür, dass der Abbau und die Aufnahme von Prolin in *C. glutamicum* keine Bedeutung mehr für den N- und C-Stoffwechsel haben, liefert die Beobachtung, dass die Prolinpermease PutP auf der Ebene der Transkription durch Prolin reprimiert wird. Genau gegenteilige Beobachtungen wurden in *E. coli* und *S. typhimurium* gemacht. Für beide Organismen wurde eine Induktion der Aufnahmesysteme für Prolin nach der Zugabe von Prolin ins Medium beschrieben (Hahn *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1979). Eine solche Aufnahme von Prolin in Abwesenheit von osmotischem Stress scheint für *C. glutamicum* aber nicht wünschenswert zu sein. Diese Vermutung wird auch durch die Prolinpulseexperimente im Wildtyp bei einer Osmolalität von 0,36 osm/kg bestätigt. Obwohl extern jeweils eine große Menge an Prolin vorgelegt wurde, war intern nur eine kleine und zeitlich begrenzte Akkumulation zu verzeichnen. Sieht man von den geringen Mengen ab, die für den Zellanabolismus gebraucht werden, so scheint Prolin in *C. glutamicum* also ausschließlich für den Osmoschutz akkumuliert zu werden. Ein Modell für die Kontrolle des internen Prolinpools ist in Abbildung 35 dargestellt.

## Niedrige Osmolalität



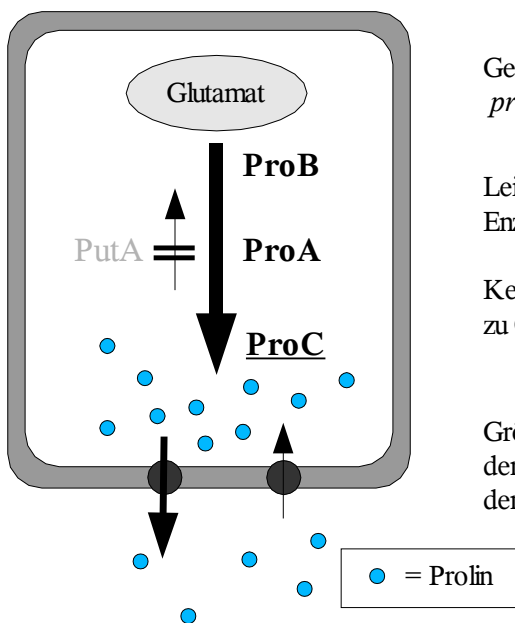
Basale Expression von *proA*, *proB* und *proC*

Kein Prolinabbau zu Glutamat

Keine Aufnahme von Prolin als C- oder N-Quelle

Prolinpuls reprimiert die Expression von Transportsystemen für Prolin

## Osmotischer Stress



Gesteigerte Expression von *proA*, *proB* und *proC*

Leichte Erhöhung der Enzymaktivität

Kein Prolinabbau zu Glutamat

Kein Einfluss von:

- Sigmafaktoren
- Stringenter Kontrolle
- mRNA-Stabilität
- (Transkriptionsfaktoren)

Schlüsselfunktion von ProC bei der Synthese von Prolin

Größe des erreichten Prolinpools ist abhängig von der Stickstoffversorgung, der Kohlenstoffquelle und dem Vorhandensein anderer kompatibler Solute.

Transport großer Prolinmengen ins Medium.  
Turgor-gesteuerter Efflux?

Abbildung 35: Modell: Regulation des internen Prolinpools von *C. glutamicum*. Oben: Basale Synthese von Prolin bei niedriger Osmolalität. Unten: Akkumulation von Prolin bei hyperosmotischem Stress.



#### 4.5 Regulation von *proP* und *betP* durch externes Prolin

Die Gene *betP* und *proP* kodieren für sekundäre Transportsysteme kompatibler Solute in *C. glutamicum*. Unter hyperosmotischen Bedingungen ist die Transkription dieser Gene induziert (Weinand, 2004) und es konnte gezeigt werden, dass das zwei-Komponenten-System MtrAB essentiell für die Expression dieser Gene ist (Möker et al., 2004). Die Aktivität von MtrAB wird seinerseits durch veränderte Ionenkonzentrationen beeinflusst (Möker, unveröffentlichte Daten). Hier in dieser Arbeit wurde nun die Regulation von *proP* (Prolin- und Ectoinaufnahme) und *betP* (Betainaufnahme) in Abhängigkeit von extern zugegebenem Prolin untersucht. Diese Experimente sollten klären, ob es neben hyperosmotischem Stress noch andere Faktoren gibt, die die Transkription von *betP* und *proP* beeinflussen. Die Untersuchung der Transkription dieser zwei Gene nach einem Prolinpuls führte dann auch zu neuen Informationen über die Regulation von *betP* und *proP*. Es konnte gezeigt werden, dass eine gegenläufige Regulation beider Gene möglich ist. Dies steht im Gegensatz zu den bisher gemachten Beobachtungen. Von Möker *et al.* (2004) konnte gezeigt werden, dass osmotischer Stress zu einer Induktion beider Gene führt, die in Abwesenheit von MtrAB verschwindet. In dieser Arbeit wurde nun beobachtet, dass in den prolinauxotrophen Stämmen 13032 $\Delta$ *proB* und 13032 $\Delta$ *proC* *proP* unter Prolinhunger stark induziert ist, während gleichzeitig die Transkription von *betP* reprimiert wurde. Die Zugabe von Prolin ins Medium kehrte die Regulation dann um, *proP* wurde nun reprimiert während *betP* induziert wurde. Durch ein Kontrollexperiment, einen Leucinpuls im leucinauxotrophen Stamm 13032 $\Delta$ *leuC* konnte weiter gezeigt werden, dass die Induktion von *betP* nicht durch die Zugabe von Prolin, sondern durch das Wiedereinsetzen des Wachstums erfolgt. Diese Expression von *betP* in Abhängigkeit vom Wachstum stellt vermutlich sicher, dass eine bestimmte Menge von BetP in der Membran vorliegt. Die ausbleibende Repression von *proP* in diesem Kontrollexperiment lässt den Schluss zu, dass die Transkription von *proP* spezifisch durch die Zugabe von Prolin reprimiert wurde. Es existiert in diesem Fall also eine Korrelation zwischen der Substratspezifität des Transporters und der Expression des Gens. Die generelle Expression der Gene *betP* und *proP* blieb aber weiterhin abhängig von dem zwei-Komponenten-System MtrAB. Dies konnte durch eine Wiederholung der Experimente in der Mutante 13032 $\Delta$ *mtrAB* gezeigt werden. Dass MtrAB einen Sensor für den internen Prolinpool darstellt, ist aber unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass die Transkription der Gene *proA*, *proB* und *proC* unabhängig von diesem zwei-Komponenten-System ist (Möker, 2002). Für die unterschiedliche Regulation von *proP* und *betP* sind wahrscheinlich Faktoren verantwortlich, die in der Regulationshierarchie MtrAB

untergeordnet sind. Diese Faktoren sollten die zusätzlichen Signale integrieren und anschließend die Transkription beeinflussen können.

Der Vergleich des Effekts von Prolin auf die Transkription der Prolinaufnahmesysteme *proP* und *putP* zeigte eine interessante Übereinstimmung. Während beide Gene in Minimalmedium ohne Prolin transkribiert werden, erfolgte 30 bis 60 Minuten nach der Zugabe von Prolin eine starke Repression der Transkription. In diesem Zeitrahmen erreichte die interne Konzentration von Prolin ihr Maximum, bevor sie wieder auf das Grundlevel abfiel. Für die Transkription von *putP* und *proP* scheint also eine Rückkopplung über den internen Prolinpool zu existieren. Wird Prolin aufgenommen, ohne dass hyperosmotischer Stress vorliegt, so wird die Expression dieser Gene unterdrückt. Erste Experimente mit *proA*, *proB* und *proC* zeigten, dass deren Transkription durch die Zugabe von Prolin nicht signifikant reguliert wird (nicht dargestellt). Interessant wäre es, zu untersuchen, ob die Transkription von *ectP* auch durch Prolin beeinflusst wird, da Prolin zum Substratspektrum dieses Transporters gehört.

Eine interessante Beobachtung, die bei den Prolinpulsexperimenten außerdem gemacht wurde, war, dass 13032 $\Delta$ *mtrAB* intern einen deutlich kleineren Prolinpool als der Wildtyp aufbaut. Diese Beobachtung ließ sich durch eine Anzucht des Stammes bei hyperosmotischem Stress bestätigen (Daten nicht gezeigt). Obwohl eine Induktion der Prolinsynthese möglich war, erreichte der maximale interne Prolinpool nur ca. 50 % der Menge, die unter solchen Bedingungen im Wildtyp akkumuliert werden. Erstaunlicherweise war aber kein Wachstumsphänotyp zu erkennen, 13032 $\Delta$ *mtrAB* wuchs bei hoher Osmolalität mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Geschwindigkeit. Da die internen Mengen an Glutamat und Glutamin unverändert waren, muss ein anderes kompatibles Solut akkumuliert worden sein. Der wahrscheinlichste Kandidat, der hier untersucht werden sollte, ist Trehalose. Da weiter ausgeschlossen werden konnte, dass der geringe interne Prolinpool durch einen Verlust von Prolin ins Medium entsteht (Daten nicht gezeigt), ist zu vermuten, dass die Biosynthese von Prolin in 13032 $\Delta$ *mtrAB* fehlreguliert wird. Die Expression der Gene *proA*, *proB* und *proC* erfolgt aber unverändert im Vergleich zum Wildtyp (Möker, 2001). Eine Erklärung für den kleinen internen Prolinpool wäre, dass 13032 $\Delta$ *mtrAB* ein Problem bei der Wahrnehmung der externen Osmolalität hat und deswegen den internen Prolinpool zu klein einstellt.

## 4.6 Globale Veränderungen im Transkriptom von *C. glutamicum* nach hyperosmotischem Stress

Die globalen Veränderungen im Transkriptom von *C. glutamicum* bei hyperosmotischem Stress konnten durch die Verwendung der DNA-Microarray-Analyse aufgeklärt werden. Die erhaltenen Ergebnisse stehen dabei in gutem Einklang zu vorher durchgeführten Experimenten. Auf dem Microarray wurden die Gene als induziert vorgefunden, die für die Synthese der kompatiblen Solute Prolin (*proABC*) und Trehalose (*otsB*, *treS*) wichtig sind und deren Induktion durch hyperosmotischen Stress schon bekannt war (Ley, 2001; Wolf *et al.*, 2003). Weiter wurden ein bekanntes Transportsystem für Prolin (*proP*) und putative Transportsysteme für  $\text{Na}^+$  (*mrpCGF*) und  $\text{K}^+$  (*kup*, NCg11096) als induziert vorgefunden. Die drei bekannten osmoregulierten Gene *ectP*, *betP* und *lcoP* konnten andererseits auf dem Array nicht als induziert vorgefunden werden. Dies wird daran liegen, dass die Induktion dieser Gene bei einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg nur sehr schwach ausfällt. Für diese Erklärung spricht, dass schon gezeigt werden konnte, dass die Gene *ectP*, *betP* und *lcoP* deutlich schwächer (Faktor 2-5 geringer) als *proP* induziert werden (Weinand, 2004). Die Expression von putativen Transportsystemen für  $\text{K}^+$  passt gut zu der beobachteten Akkumulation von Kalium, die in *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock stattfindet (Burger, 2002; Botzenhardt, 2004). Dafür, dass die Einstellung der internen Kaliumionenkonzentration eine wichtige Rolle bei der Osmoadaptation von *C. glutamicum* spielen könnte, spricht, dass NCg11096 (TrkA Homolog) in allen drei Zeitpunkten ( $T_{10}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{240}$ ) stark induziert wurde. Die zusätzlich stattfindende Expression eines putativen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters legt die Vermutung nahe, dass der große Überschuss an externem  $\text{Na}^+$  zu einem  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle führt. Ein solcher Fluss von  $\text{Na}^+$  über die Zellmembran von *C. glutamicum* konnte 1995 auch schon von Guillouet *et al.* beobachtet werden. Der Einstrom von  $\text{Na}^+$  war transient und fand direkt (~3 Minuten) nach der Salzzugabe statt. Dass der Export von  $\text{Na}^+$  essentiell für die Anpassung von Mikroorganismen an hyperosmotischen Stress ist, wurde 1998 von Padan *et al.* in *E. coli* demonstriert. Stämme, in denen der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter NhaA deletiert war, zeigten einen osmosensitiven Phänotyp. Ein weiterer Effekt, der durch die Zugabe von NaCl ins Medium ausgelöst werden kann und bedacht werden muss, ist die Limitierung der Eisenverfügbarkeit. Dieser Effekt wurde schon in *B. subtilis* untersucht und es konnte gezeigt werden, dass knapp 20 % der Gene, die durch hyperosmotischen Stress verändert werden, eigentlich durch Eisenmangel induziert wurden (Steil *et al.*, 2003). Diese Beobachtung in *B. subtilis* könnte erklären, warum in

*C. glutamicum* die COG-Klasse P (anorganischer Ionentransport und Metabolismus), in die z. B. Gene für Siderophor-Transportsysteme fallen, deutlich induziert wurde. Eine weitere große Gruppe von Genen, die nach 60 Minuten stark induziert war, betraf Proteine der generellen Stressantwort. Die Gene in dieser Gruppe kodierten unter anderem für Chaperone, Proteasen und Katalasen. Die Expression dieser Gene vermittelt der Zelle einen allgemeinen Schutz vor Bedingungen, die Proteine denaturieren. Dass solche Reaktionen nicht spezifisch für hyperosmotischen Stress sind und auch bei anderen ungünstigen Bedingungen (z.B. Hitzestress, oxidativer Stress) auftreten, konnte schon in verschiedenen Organismen gezeigt werden (Petersohn *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001). Eine starke Repression der Transkription fand für Gene ribosomaler Proteine statt. Diese Verkleinerung der Translationsmaschinerie wird vermutlich durch die Verlangsamung des Wachstums bei hyperosmotischem Stress hervorgerufen. Eine vergleichbare Beobachtung wurde bei einer Wachstumsverlangsamung durch Stickstoffhunger gemacht, auch in diesem Fall wurde die Expression ribosomaler Proteine reprimiert (Silberbach, persönliche Mitteilung). Eine weitere interessante Klasse von Proteinen betrifft die Transkriptionsfaktoren. Hier konnte neben der Sensorikine MtrB (nur bei T<sub>60</sub> induziert) ein putativer Transkriptionsfaktor (NCgl1483) gefunden werden, der in allen drei Zeitpunkten signifikant induziert war. Da über Sequenzvergleiche keine weiteren Informationen über diesen putativen Faktor gewonnen werden konnten, bleibt seine Rolle bei der Osmoadaptation ungeklärt. Aufgrund der starken Induktion stellt der entsprechende Leseramen aber auf jeden Fall eine interessantes Ziel für zukünftige Untersuchungen dar. In der großen Summe der restlichen Gene wurden viele unbekannte und hypothetische Proteine (~30 %) gefunden. Da die Funktion dieser Proteine noch unbekannt ist, müssen weitere Untersuchungen klären, ob ihre Expression eine wichtige Bedeutung für die Osmoadaptation von *C. glutamicum* hat.

Der Bereich der Genregulation insgesamt lag auf dem Array bei Faktoren zwischen 6,47 und -5,57 und ist somit vergleichbar mit den Regulationsfaktoren, die nach einem hyperosmotischen Schock in *E. coli* bestimmt wurden (Weber *et al.*, 2002). Eine weitere Bestätigung der Faktoren liefert der Vergleich der Arraydaten mit den *real-time*-PCR-Ergebnissen. In beiden Methoden wurden unabhängig voneinander vergleichbare Faktoren für die Induktion von *proA*, *proB* und *proC* bestimmt. Betrachtet man die Veränderung im Transkriptom über die drei untersuchten Zeitpunkte, so wird deutlich, dass die Systeme der Osmoadaptation in *C. glutamicum* verzögert induziert werden. Erst eine Stunde nach der Salzzugabe wurde der Großteil der Gene mit einem bekanntem Bezug zur Osmoregulation verstärkt transkribiert. Das Zusammentreffen der Geninduktion mit dem Ende der *lag*-Phase

im Wachstum liefert einen Hinweis für die Bedeutung der transkriptionellen Regulation bei der Anpassung an den hyperosmotischen Stress. Vier Stunden nach der Salzzugabe waren die Veränderungen im Transkriptom dann deutlich schwächer ausgeprägt. In den verhältnismäßig salzadaptierten und wachsenden Zellen blieb von den bekannten osmoregulierten Genen nur *proC* stark induziert. Im Gegensatz dazu wurde die generelle Stressantwort nicht vollständig abgeschaltet. Es blieben sowohl Chaperone als auch Proteasen induziert. Dies spricht dafür, dass bei Zellen, die in hochosmolarem Medium wachsen, eine andauernde Reparatur und Kontrolle des Proteinpools erfolgt. Auch die generelle Repression ribosomaler Proteine blieb im Vergleich zur niedrigen Osmolalität bestehen.

## V. Zusammenfassung

*Corynebacterium glutamicum* akkumuliert zum Schutz vor hyperosmotischem Stress kompatible Solute. Die bevorzugte osmoprotektive Substanz, die durch *de-novo*-Synthese akkumuliert wird, ist Prolin. Wird die Synthese von Prolin durch die Deletion von Genen des Prolinbiosyntheseweges verhindert, so synthetisiert *C. glutamicum* stattdessen Glutamin. Der Ersatz von Prolin durch Glutamin erlaubt dem Bakterium zwar auch eine Akklimation an hohe Osmolalitäten, die Wachstumsgeschwindigkeit, die bei Akkumulation von Prolin als kompatibelem Solut gemessen werden kann, wird aber nicht erreicht.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Expressionskontrolle der Gene *proA*, *proB* und *proC* für den Aufbau eines hohen internen Prolinpools essentiell ist. Eine biochemische Aktivierung der kodierten Enzyme scheint nur in geringem Maße stattzufinden. Die Steigerung der Expression wird in Abhängigkeit von der externen Osmolalität reguliert und basiert auf einer *de-novo*-Synthese der mRNA. Durch unabhängig voneinander durchgeführte *real-time*-PCR und DNA-Microarray-Analysen konnten vergleichbare Faktoren für die Expressionssteigerung der Gene *proA*, *proB* und *proC* bestimmt werden. Mittels dieser Experimente konnte außerdem die Induktion von *proC* als Hauptregulationspunkt für die Einstellung der Prolinsyntheseleistung identifiziert werden. Bei der Untersuchung der Transkriptionskontrolle der drei Gene konnte die Beteiligung von alternativen Sigmafaktoren, zwei-Komponenten Systemen, veränderter mRNA-Stabilität und die stringente Kontrolle ausgeschlossen werden. Auch individuelle Transkriptionsfaktoren, die in der Promotorregion der Gene binden, konnten nicht identifiziert werden. Als möglicher Regulationsmechanismus sollte eine veränderte Aktivität der RNA-Polymerase in Betracht gezogen werden.

Der interne Prolinpool wird in *C. glutamicum* durch die Synthese und den Export von Prolin eingestellt, da ein Abbau von Prolin nicht möglich ist. Durch einen Prolinpuls bei einer konstanten Osmolalität konnte außerdem gezeigt werden, dass die Transkription von Transportsystemen (ProP und PutP), die Prolin aufnehmen, reprimiert wird. Übereinstimmend war auch nur eine transiente Aufnahme von Prolin zu beobachten. Transportsysteme für andere kompatible Solute wie BetP unterlagen dieser Regulation nicht. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass *C. glutamicum* Prolin nicht als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle verwenden kann, und die Akkumulation in der Zelle nur der Osmoprotektion dient.

## VI. Literaturverzeichnis

- **Abe S., K. I. Takayama und S. Kinoshita** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 279-301
- **Abrahamson JL, Baker LG, Stephenson JT, Wood JM.** 1983 Proline dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. Properties of the membrane-associated enzyme. *Eur J Biochem.* 1983 Jul 15;134(1):77-82
- **Aiba H, Matsuyama S, Mizuno T, Mizushima S.** 1987. Function of *micF* as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1987 Jul;169(7):3007-12.
- **Ankri S., Serebrijski I., Reyes O. und Leblon G.** 1996. Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the *proA* step. *J. Bacteriol* 1996 Aug;178(15):4412-9
- **Arakawa T., und S. N. Timasheff.** 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47:411-417.
- **Arst H. H., S. A. Jones und C. R. Bailey** 1981. A method for the selection of deletion mutations in the L-proline catabolism gen cluster of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. (Cambridge)* 38:171-195.
- **Baich A.** 1969 Proline synthesis in *Escherichia coli*. A proline-inhibitible glutamic acid kinase. *Biochim Biophys Acta* 1969 Dec 30;192(3):462-7.
- **Barnard A, Wolfe A, Busby S.** 2004. Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr Opin Microbiol.* 2004 Apr;7(2):102-8. Review.
- **Bartel DP.** 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. Review.
- **Belitsky Boris R., Brill Jeanette, Bremer Erhard und Sonenshein AbrahamL.** 2001. Multiple Genes for the Last Step of Proline Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* 2001 July; 183(14):4389-92.
- **Berrier C., Coulombe A., Szabo I., Zoratti M. und Ghazi, A.** 1992. Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* 206:559-565.
- **Berrier C., Besnard M., Ajouz B., Coulombe A. und Ghazi, A.** 1996. Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* 151:175-187.

- **Belitsky BR, Brill J, Bremer E, Sonenshein AL.** 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* Jul;183(14):4389-92.
- **Botzenhardt, J.** 2004. Regulation des Betaintransporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress. Dissertation. Universität zu Köln.
- **Booth I. R., und P. Louis.** 1999. Managing hypoosmotic stress: aqaporins and mechanosensitiv channels in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:166-169.
- **Bremer E. und R. Krämer** 2000. Coping with Osmotic Challenges: Osmoregulation through Accumulation and Release of Compatible Solutes in Bacteria. In: Storz, G. und R. Hengge-Aronis (Editoren) *Bacterial Stress Responses*. ASM Press Washington D.C. pp.79-97
- **Brown, E., and Wood, J. M.** 1992. Redesigned purification yields a fully functional PutA protein dimer from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1992 Jun 25;267(18):13086-92.
- **Brown, E., and Wood, J. M.** 1993. Conformational change and membrane association of the PutA protein are coincident with reduction of its FAD cofactor by proline. *J Biol Chem.* 1993 Apr 25;268(12):8972-9.
- **Burger, U.** 2002. Struktur- und Funktionsanalysen am osmotisch regulierten Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Universität zu Köln.
- **Campanile C., Forlani G., Basso AL, Marasco R., Ricca E., Sacco M., Ferrara L. und De Felice M.** 1993. Identification and characterization of the *proBA* operon of *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Feb;59(2):519-22.
- **Chen S, Zhang A, Blyn LB, Storz G.** 2004. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004 Oct;186(20):6689-97.
- **Cheung KJ, Badarinarayana V, Selinger DW, Janse D, Church GM.** 2003. A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*. *Genome Res.* 2003 Feb;13(2):206-15.
- **Csonak LN und Epstein W.** 1996. Osmoregulation. In: Neidhard FC et al. (eds) *Escherichia coli Salmonella. Cellular and molecular biology*. ASM Press. Washington,DC pp 1210-1223.
- **da Costa M. S., H. Santos und E. A. Galinski.** 1998. An overview of the and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61:117-153.
- **Dendinger, S., and Brill, W. J .** 1970 Regulation of proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1970 Jul;103(1):144-52.



- **Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R, Bakker EP.** 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. Arch Microbiol. 1988;150(4):348-57.
- **Dondrup M, Goesmann A, Bartels D, Kalinowski J, Krause L, Linke B, Rupp O, Sczyrba A, Puhler A, Meyer F.** 2003. EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. J Biotechnol. 2003 Dec 19;106(2-3):135-46.
- **Epstein W, Whitelaw V, Hesse J.** 1978. A K<sup>+</sup> transport ATPase in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1978 Oct 10;253(19):6666-8.
- **Farwick M., Siewe R. M., und Krämer R.,** 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 177:4690-4695.
- **Frank L., and Rybicki, P.** 1961. Studies of proline metabolism in *Escherichia coli*. I. The degradation of proline during growth of a proline-requiring auxotroph. Arch Biochem Biophys. 1961 Dec;95:441-9.
- **Frings E., J. Kunte und E. Galinski** 1993. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. FEMS Microbiol. Lett. 109:25-32
- **Galinski EA. und Trüper HG.** 1994 Microbial behaviour in saltstressed ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. 39:73-78.
- **Gerstmeir R, Cramer A, Dangel P, Schaffer S, Eikmanns BJ.** 2004. RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. 2004 May;186(9):2798-809.
- **Giaever HM, Styrvold OB, Kaasen I, Strom AR.** 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1988 Jun;170(6):2841-9.
- **Gowrishankar J.** 1986. *proP*-mediated proline transport also plays a role in *Escherichia coli* osmoregulation. J Bacteriol. 1986 Apr;166(1):331-3.
- **Gu D, Zhou Y, Kallhoff V, Baban B, Tanner JJ, Becker DF.** 2004. Identification and characterization of the DNA-binding domain of the multifunctional PutA flavoenzyme. J Biol Chem. 2004 Jul 23;279(30):31171-6. Epub 2004 May 20.
- **Guillouet S., und Engasser J. M.** 1995 Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 315-320.

- **Guillouet S., und Engasser J. M.** 1995. Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:496-500.
- **Hahn DR, Maloy SR.** 1986. Regulation of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*: characterization of promoter and operator mutations. *Genetics.* 1986 Nov;114(3):687-703.
- **Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M, Boos W.** 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1991 Dec;173(24):7918-24.
- **Hohmann S.** 2002. Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol.* 2002;215:149-87. Review.
- **Horlacher R, Uhland K, Klein W, Ehrmann M, Boos W.** 1996. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996 Nov;178(21):6250-7.
- **Huser AT, Becker A, Brune I, Dondrup M, Kalinowski J, Plassmeier J, Puhler A, Wiegrabe 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.* 2003 Dec 19;106(2-3):269-86.
- **Inoue H., H. Nojima und H. Okayama** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- **Jakoby, M., C-E. Ngouoto-Nkili, and A. Burkovski.** 1999. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol. Tech.* 13:437-441
- **Kawahara Y., T. Oshumi, Y. Yoshihara, und S. Ikeda** 1989. Proline in the Osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 53:2475-2479
- **Keilhauer C., L. Eggeling und H. Sahn** 1993. Isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 175:5595-5603
- **Kempf B, Bremer E.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol.* 1998 Oct;170(5):319-30. Review.
- **Kiss, R. D., und G. Stephanopoulos** 1992. Metabolic Characterization of a L-Lysine-Producing Strain by Continuous Culture. *Biotechnol. Bioeng.* 39:565-574
- **Kosuge T., Tabata K. und Hoshino T.** 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the *proBA* operon from an extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Oct 15;123(1-2):55-61.

- **Lee J. H., Park N. Y., Lee M. H., and Choi S. H.** 2003. Characterization of the *Vibrio vulnificus putAP* Operon, Encoding Proline Dehydrogenase and Proline Permease, and Its Differential Expression in Response to Osmotic Stress. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, July 2003, p. 3842–3852
- **Lee YH, Nadaraia S, Gu D, Becker DF, Tanner JJ.** 2003. Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. *Nat Struct Biol.* 2003 Feb;10(2):109-14.
- **Leuchtenberger, W.** 1996. Amino acids – technical production and use. In: Rehm, H. und G. Reed (Editoren). *Products of primary metabolism. Biotechnology (vol.6).* VCH Weinheim, pp.455-502
- **Lewin, B.** 1998. *Molekularbiologie der Gene.* Heidelberg; Berlin : Spektrum, Akad. Verl.,1998. pp. 244-245.
- **Ley.** 2001. Bedeutung der Prolin-Biosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit. Universität zu Köln.
- **Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W. und Schleifer KH.** 1991. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by *rRNA* gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol* Apr;41(2):255-60
- **Liebl, W., A. Bayerl, W. Ludwig, und K. H. Schleifer** 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 65:299-304
- **Limauro D., Falciatore A., Basso AL, Forlani G. und De Felice M.** 1996. Proline biosynthesis in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the *proBA* operon and its products. *Microbiology.* 1996 Nov;142 ( Pt 11):3275-82.
- **Ling, M., Allen, S. W., and Wood, J. M.** 1994. Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and D1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. *J. Mol. Biol.* 243, 950-6.
- **Maloy, M. A., Smith, L. T., and Smith, G. M.** 1987. The proline utilization operon. In: Neidhardt, F.C, Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1513-19
- **Masse E, Escorcía FE, Gottesman S.** 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 2003 Oct 1;17(19):2374-83. Epub 2003 Sep 15.

- **Marin K, Huckauf J, Fulda S, Hagemann M.** 2002. Salt-dependent expression of glucosylglycerol-phosphate synthase, involved in osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 2002 Jun;184(11):2870-7.
- **Martin D. D., R. A. Ciulla und M. F. Roberts.** 1999. Osmoadaptation in archea. *Appl Environ. Microbiol.* 65:1815-1825.
- **Mellies J, Wise A, Villarejo M.** 1995. Two different *Escherichia coli* proP promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J Bacteriol.* 1995 Jan;177(1):144-51.
- **Miller KJ und Wood JM** 1996. Osmoadaptation by rhizospere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:101-136.
- **Möker N, Brocker M, Schaffer S, Kramer R, Morbach S, Bott M.** 2004. Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol.* 2004 Oct;54(2):420-38.
- **Möker.** 2002. Einfluss von Zwei-Komponenten-Systemen auf die Osmoregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit. Universität zu Köln.
- **Movahedzadeh F, Colston MJ, Davis EO.** 1997. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (Bacillus-type SOS) box. *Microbiology.* 1997 Mar;143 ( Pt 3):929-36.
- **Muro-Pastor AM, Ostrovsky P, Maloy S.** 1997. Regulation of gene expression by repressor localization: biochemical evidence that membrane and DNA binding by the PutA protein are mutually exclusive. *J Bacteriol.* 1997 Apr;179(8):2788-91.
- **Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51(Pt1):263-273
- **Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 1988 Jun;9 (6):255-62.
- **Nottebrock D, Meyer U, Kramer R, Morbach S.** 2003. Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Jan 28;218(2):305-9.
- **Omori K, Suzuki S, Imai Y und Komatsubara S.** 1991 Analysis of the *Serratia marcescens* proBA operon and feedback control of proline biosynthesis. *J Gen Microbiol.* 1991 Mar;137 ( Pt 3):509-17.

- **Ostrovsky De Spicer, P., and Maloy, S.** 1993 PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 May 1;90(9):4295-8.
- **Ostrovsky De Spicer, P., O'Brian, K., and Maloy, S.** 1991 Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: a membrane-associated dehydrogenase binds DNA in vitro. J Bacteriol. 1991 Jan;173(1):211-9.
- **Padan, E., N. Maisler, D. Taglicht, R. Karpel, and S. Schuldiner.** 1989. Deletion of *ant* in *E. coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system(s). J. Biol. Chem. **264**:20297-20302
- **Peng Z., Lu Q., Verma D. P. S.** 1996. Reciprocal regulation of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. Mol Gen Genet (1996) 253: 334-341
- **Peter, H., B. Weil, A. Burkovski, R. Krämer, und S. Morbach** 1998. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. J. Bacteriol. 180:6005-6012
- **Peter H, Bader A, Burkovski A, Lambert C, Kramer R.** 1997. Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. Arch Microbiol. 1997 Aug;168(2):143-51.
- **Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy.** 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 20:911-917.
- **Ramani N, Hedeshian M, Freundlich M.** 1994. *micF* antisense RNA has a major role in osmoregulation of OmpF in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1994 Aug;176(16):5005-10.
- **Rey DA, Puhler A, Kalinowski J.** 2003. The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol. 2003 Jun 12;103(1):51-65.
- **Rönsch, H., Krämer R. und Morbach, S.** 2003. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. J. Biotechnol. 104, 87-97.
- **Rübenhagen R, Ronsch H, Jung H, Kramer R, Morbach S.** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. J Biol Chem. 2000 Jan 14;275(2):735-41.

- **Rübenhagen R, Morbach S, Kramer R.** 2001. The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K<sup>+</sup>. EMBO J. 2001 Oct 1;20(19):5412-20.
- **Ruffert, S., C. Berrier, R. Krämer, und A. Ghazi** 1999. Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 181:1673-1676
- **Ruffert, S.** 1998. Funktion und Regulation mechanosensitiver Efflux-Systeme für kompatible Solute in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich.
- **Saier, M. H. Jr., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., Nusinew, D. P., Omar, A. M., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Quan, J. A., Sliwinski, M., Tseng, T. T., Wachi, S. und Young, G. B.** 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. Biochem. Biophys. Acta 1422, 1-56.
- **Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2 nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, USA
- **Schäfer, A., A. Schwarzer, J. Kalinowski, und A. Pühler** 1994. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress- sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176:7309-7319
- **Schlosser A, Meldorf M, Stumpe S, Bakker EP, Epstein W.** 1995. TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1995 Apr;177(7):1908-10.
- **Schuster, R.** 1988. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. J. Chrom. 431(2): 271-284
- **Serebrijski I, Wojcik F., Reyes O. und Leblon G.** 1995. Multicopy suppression by *asd* gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous *proA* in *proA* mutants. J. Bacteriol 1995 Dec;177(24):7255-60
- **Spiegelhalter F. und Bremer E.** 1998. Osmosregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. Mol. Microbiol. 1998, 29:285-296.

- **Steger R, Weinand M, Kramer R, Morbach S.** 2004. LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. FEBS Lett. 2004 Aug 27;573(1-3):155-60.
- **Strecker, H. J., and Mela, P.** 1955 The interconversion of glutamic acid and proline. Biochim Biophys Acta. 1955 Aug;17(4):580-1.
- **Sukharev S. I., Blount P., und Kung C.,** 1997. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. Ann. Rev. Physiol. 59:633-657.
- **Tamas MJ, Luyten K, Sutherland FC, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior BA, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, Hohmann S.** 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. Mol Microbiol. 1999 Feb;31(4):1087-104.
- **Timothy L. Bailey and Michael Gribskov,**1998. "Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches", Bioinformatics, 14(48-54), 1998.
- **Trchounian A, Kobayashi H.** 1999. Kup is the major K<sup>+</sup> uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH. FEBS Lett. 1999 Mar 26;447(2-3):144-8.
- **Ventosa A., Nieto JJ und Oren A.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Bio Rev 62:504-544
- **Volker U, Maul B, Hecker M.** 1999. Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1999 Jul;181(13):3942-8.
- **von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, Bremer E.** 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. Mol Microbiol. Jul;25(1):175-87.
- **Wagner R.** 2000. Transcription Regulation in Prokaryotes. Oxford University Press, 2000. pp 16-22, 203.
- **Weinand M.** 2004. Expressionsregulation von Transportern kompatibler Solute in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Universität zu Köln.
- **Whatmore AM und Reed RH** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role of K<sup>+</sup> in turgor regulation. J Gen Microbiol 136:2521-2526
- **Wolf A, Kramer R, Morbach S.** 2003. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. Mol Microbiol. 2003 Aug;49(4):1119-34.
- **Wood, J. M.** 1981. Genetics of L-proline utilization in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 146, 895-901

- **Wood JM, and Zadworny D.** 1979. Characterization of an inducible porter required for L-proline catabolism by *Escherichia coli* K12. *Can J Biochem.* 1979 Oct;57(10):1191-9.
- **Wood, J. M., and Zadworny, D.** 1980. Amplification of the *put* genes and identification of the *put* gene products in *Escherichia coli* K12. *Can. J. Biochem.* 58, 787-96.
- **Yoshinaga F., Takeda Y. und Okumura S.**1967. Glutamate kinase activity in *Brevibacterium flavum*: relationship between L-proline and L-glutamine biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967 Apr 20;27(2):143-9
- **Zhu W, Becker DF .** 2003. Flavin redox state triggers conformational changes in the PutAprotein from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2003 May 13;42(18):5469-77.



## VII. Anhang:

Die Tabellen 15-17 enthalten alle *orfs* aus dem Genom von *C. glutamicum*, die nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg signifikant verändert transkribiert wurden. Die Ausschlussgrenze für eine signifikante Regulation wurde auf einen minimalen Faktor von  $\pm 1,75$  und einen p-Wert kleiner als 0,05 gelegt.

Tabelle 15: Verändert transkribierte Gene 10 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. Die p-Werte der bestimmten Faktoren waren kleiner gleich 0,05.

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1418	18,48	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCgl1417	5,30	P	SULFATE PERMEASE OR RELATED TRANSPORTER (MFS SUPERFAMILY)
<i>dps</i>	NCgl2897	3,93	P	STARVATION-INDUCED DNA PROTECTING PROTEIN
	NCgl2841	3,56	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2632	3,52	-	ACETYL-COA ACETYLTRANSFERASE
<i>mraW</i>	NCgl2086	2,99	M	S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE INVOLVED IN CELL ENVELOPE BIOGENESIS
	NCgl0046	2,78	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl1483	2,70	K	(AAK45786) TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, TETR FAMILY
	NCgl2218	2,67	-	PUTATIVE BETA (1-->2) GLUCAN EXPORT COMPOSITE TRANSMEMBRANE/ATP-BINDING PROTEIN
<i>cwlM</i>	NCgl2986	2,58	M	N-ACETYLMURAMYL-L-ALANINE AMIDASE
<i>dnaK</i>	NCgl2702	2,56	O	HEAT SHOCK PROTEIN HSP70
	NCgl2899	2,56	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>rplF</i>	NCgl0516	2,49	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L6
	NCgl0959	2,45	M	PROBABLE PHOSPHINOTHRICIN ACETYLTRANSFERASE PROTEIN
<i>folP1</i>	NCgl2601	2,44	H	DIHYDROPTEROATE SYNTHASE
<i>purC</i>	NCgl2508	2,41	F	PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE-SUCCINOCARBOXAMIDE SYNTHASE
<i>phnB1</i>	NCgl2722	2,39	S	UNCHARACTERIZED PROTEIN, HOMOLOG OF PHNB E,COLI
	NCgl1420	2,38	S	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCgl1484	2,37	F	GLUTAMINE AMIDOTRANSFERASE DOMAIN
<i>rplM</i>	NCgl0556	2,36	J	RIBOSOMAL PROTEIN L13
	NCgl0397	2,35	-	HYPOTHETICAL MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2876	2,33	-	PERMEASE OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>proC</i>	NCgl0398	2,30	E	PYRROLINE-5-CARBOXYLATE REDUCTASE
	NCgl2060	2,27	R	ATPASE COMPONENT OF ABC TRANSPORTERS WITH DUPLICATED ATPASE DOMAINS
	NCgl2943	2,27	MG	PREDICTED NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE-SUGAR EPIMERASE
	NCgl1096	2,25	P	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3
<i>secG</i>	NCgl1522	2,22	U	PREPROTEIN TRANSLOCASE SECG SUBUNIT
<i>groEL</i>	NCgl2621	2,21	O	CHAPERONIN CPN60 (60KD SUBUNIT)
<i>rpf1</i>	NCgl0785	2,19	-	RPF PROTEIN PRECURSOR
<i>prpB1</i>	NCgl0665	2,19	G	PROBABLE METHYLISOCITRIC ACID LYASE
	NCgl1885	2,17	P	PREDICTED PERMEASE (COBALT PERMEASE SUBFAMILY)
	NCgl2900	2,15	S	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>proP</i>	NCgl2961	2,15	-	PROLINE/ECTOINE CARRIER
	NCgl0675	2,12	D	NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN
<i>hemD</i>	NCgl0414	2,12	H	UROPORPHYRINOGEN III SYNTHASE/METHYLTRANSFERASE

## Anhang

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1039	2,11	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1368	2,10	J	ACETYLTRANSFERASE
<i>ilvB</i>	NCgl1222	2,10	EH	ACETOLACTATE SYNTHASE
	NCgl0045	2,09	T	SECRETED PROTEIN
<i>gyrA</i>	NCgl0012	2,08	L	DNA TOPOISOMERASE (ATP-HYDROLYSING)
	NCgl0201	2,08	-	MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1090	2,08	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>atpA</i>	NCgl1163	2,07	C	PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN
	NCgl2877	2,06	K	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR PADR-LIKE FAMILY
	-	2,05	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>grpE</i>	NCgl2701	2,05	O	MOLECULAR CHAPERONE GRPE (HEAT SHOCK PROTEIN)
<i>mrp</i>	NCgl1078	2,02	D	ATPASES INVOLVED IN CHROMOSOME PARTITIONING
	NCgl1465	2,01	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2060	2,01	R	ATPASE COMPONENT OF ABC TRANSPORTERS WITH DUPLICATED ATPASE DOMAINS
<i>sufD</i>	NCgl1502	1,99	O	COMPONENTS OF AN UNCHARACTERIZED IRON-REGULATED ABC-TYPE TRANSPORTER
<i>recB</i>	NCgl1443	1,98	L	RECB FAMILY EXONUCLEASE
	NCgl2912	1,97	-	PUTATIVE SECRETED MEMBRANE PROTEIN
<i>pimT</i>	NCgl1441	1,97	J	SAM-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE INVOLVED IN TRNA-MET MATURATION
<i>secE</i>	NCgl0457	1,95	U	SECE SUBUNIT OF PROTEIN TRANSLOCATION COMPLEX
	NCgl1697	1,94	LR	NUDIX HYDROLASE
	NCgl1569	1,92	L	PREDICTED ENDONUCLEASE INVOLVED IN RECOMBINATION
<i>gnd</i>	NCgl1396	1,91	G	6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE
<i>rpsH</i>	NCgl0515	1,91	J	RIBOSOMAL PROTEIN S8
	NCgl0100	1,91	H	P-AMINOBENZOYL-GLUTAMATE TRANSPORTER
<i>glpX</i>	NCgl0976	1,90	G	GLPX-LIKE PROTEIN
	NCgl2598	1,90	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0746	1,90	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl1421	1,89	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0448	1,87	E	PUTATIVE PEPTIDASE E
<i>fixB</i>	NCgl1183	1,87	C	PUTATIVE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN, ALPHA SUBUNIT
<i>glyS</i>	NCgl2198	1,87	J	GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE--TRNA LIGASE)
	NCgl1022	1,86	E	CYSTEINE SULFINATE DESULFINASE/CYSTEINE DESULFURASE OR RELATED ENZYME
	NCgl0104	1,86	-	ATP/GTP-BINDING PROTEIN
	NCgl0849	1,85	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1234	1,85	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>folK</i>	NCgl2599	1,85	H	7, 8-DIHYDRO-6-HYDROXYMETHYLPTERIN-PYROPHOSPHOKINASE
<i>nadC</i>	NCgl1023	1,85	H	PUTATIVE NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHORYLASE (
	NCgl0165	1,84	-	HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>tuf</i>	NCgl0480	1,84	J	ELONGATION FACTOR TU
<i>folX</i>	NCgl2600	1,83	H	DIHYDRONEOPTERIN ALDOLASE
	NCgl1042	1,83	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>rpsP</i>	NCgl1976	1,83	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S16
	NCgl2935	1,83	-	ABC-TYPE MULTIDRUG TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
	NCgl1543	1,83	K	DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE SUBUNIT K/OMEGA
	NCgl2639	1,82	-	PREDICTED HYDROLASE OR ACYLTRANSFERASE (ALPHA/BETA HYDROLASE SUPERFAMILY)

## Anhang

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1065	1,81	R	LYSINE DECARBOXYLASE FAMILY PROTEIN
	NCgl1067	1,81	M	GLYCOSYLTRANSFERASE INVOLVED IN CELL WALL BIOGENESIS
<i>rpsI</i>	NCgl0557	1,81	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S9
<i>folP2</i>	NCgl1066	1,79	H	DIHYDROPTEROATE SYNTHASE
<i>secA</i>	NCgl0726	1,79	U	PREPROTEIN TRANSLOCASE SUBUNIT SECA
<i>moeA2</i>	NCgl0847	1,78	H	MOLYBDENUM COFACTOR BIOSYNTHESIS PROTEIN
	NCgl1089	1,78	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl2921	1,78	K	BACTERIAL REGULATORY PROTEINS, ICLR FAMILY
	NCgl0848	1,78	J	ACETYLTTRANSFERASE
<i>psp3</i>	NCgl1766	1,77	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>ureB</i>	NCgl0084	1,77	E	UREASE BETA SUBUNIT
	NCgl1038	1,76	S	UNCHARACTERIZED PROTEIN, LMBE HOMOLOG]
	NCgl0135	1,76	R	PUTATIVE TRANSPORT PROTEIN
	NCgl2350	1,75	R	ATPASE COMPONENT OF ABC-TYPE TRANSPORT SYSTEM, CONTAINS DUPLICATED ATPASE DOMAINS

### +1,75 > nicht regulierte Gene > -1,75

	NCgl1825	-1,76	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>mdh</i>	NCgl2297	-1,78	C	MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN
	NCgl0601	-1,80	K	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, MARR FAMILY
	NCgl1210	-1,80	R	PUTATIVE NA <sup>+</sup> -DEPENDENT TRANSPORTER
	NCgl0602	-1,80	M	SECRETED LIPOPROTEIN
<i>rplA</i>	NCgl0460	-1,80	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L1
	NCgl0971	-1,80	R	NADPH-DEPENDENT FMN REDUCTASE
	NCgl0440	-1,80	-	PUTATIVE SERINE PROTEASE (CLPP CLASS)
	NCgl1866	-1,82	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>rpsM</i>	NCgl0537	-1,82	J	(Q9RA65) RIBOSOMAL PROTEIN S13
	NCgl2088	-1,83	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>rplK</i>	NCgl0459	-1,84	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L11
	NCgl2373	-1,84	G	SUGAR PERMEASE
<i>cmt1</i>	NCgl0336	-1,85	R	TREHALOSE CORYNOMYCOLYL TRANSFERASE
<i>sdhCD</i>	NCgl0359	-1,85	-	SUCCINATE DEHYDROGENASE CD
<i>ctaC</i>	NCgl2115	-1,86	C	CYTOCHROME C OXIDASE CHAIN II
	NCgl2813	-1,88	R	NADPH-DEPENDENT FMN REDUCTASE
	NCgl2584	-1,89	R	UNCHARACTERIZED ENZYME INVOLVED IN BIOSYNTHESIS OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES
	NCgl2512	-1,89	FGR	HIT FAMILY HYDROLASE
	NCgl1941	-1,90	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>rpsK</i>	NCgl0538	-1,90	J	RIBOSOMAL PROTEIN S11
<i>gidB</i>	NCgl2990	-1,95	M	GLUCOSE-INHIBITED DIVISION PROTEIN, GIDB(S-ADENOSYLMETHIONINE- DEPENDENT METHYLTRANSFERASE)
	NCgl1351	-1,96	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl2374	-1,97	G	ABC-TYPE SUGAR TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
	NCgl0381	-1,97	-	CONSERVED SECRETED PROTEIN
<i>tesB2</i>	NCgl1600	-1,99	I	PROBABLE ACYL-COA THIOESTERASE II PROTEIN
	NCgl1601	-2,00	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0187	-2,02	C	L-GULONOLACTONE OXIDASE
<i>pgk</i>	NCgl1525	-2,10	G	PHOSPHOGLYCERATE KINASE
	NCgl0562	-2,11	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1289	-2,17	-	SECRETED PROTEIN
<i>ctaA</i>	NCgl1508	-2,18	O	CYTOCHROME OXIDASE ASSEMBLY PROTEIN
<i>qcrC</i>	NCgl2111	-2,27	C	CYTOCHROME C1
	NCgl2912	-2,28	-	PUTATIVE SECRETED MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2574	-2,33	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>uspA3</i>	NCgl2842	-2,35	T	UNIVERSAL STRESS PROTEIN FAMILY
<i>ctaE</i>	NCgl2112	-2,40	C	CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 3
<i>butA</i>	NCgl2582	-2,57	-	L-2,3-BUTANEDIOL DEHYDROGENASE/ACETOIN REDUCTASE
<i>ldh</i>	NCgl2810	-2,61	C	L-LACTATE DEHYDROGENASE
<i>cysQ</i>	NCgl0811	-3,15	P	3'-PHOSPHOADENOSINE 5'-PHOSPHOSULFATE (PAPS) 3'-PHOSPHATASE

Tabelle 16: Verändert transkribierte Gene 60 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. Die p-Werte der bestimmten Faktoren waren kleiner gleich 0,05.

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1417	6,47	P	SULFATE PERMEASE OR RELATED TRANSPORTER (MFS SUPERFAMILY)
	NCgl1418	5,63	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCgl1096	5,59	P	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3
<i>sufD</i>	NCgl1502	4,47	O	COMPONENTS OF AN UNCHARACTERIZED IRON-REGULATED ABC-TYPE TRANSPORTER
	NCgl1483	4,33	K	(AAK45786) TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, TETR FAMILY
	NCgl0961	4,13	E	ALLOPHANATE HYDROLASE SUBUNIT 1
	NCgl2052	3,77	P	PREDICTED CO/ZN/CD CATION TRANSPORTER
<i>clpP2</i>	NCgl2327	3,57	OU	ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT CLPP2
<i>proC</i>	NCgl0398	3,56	E	PYRROLINE-5-CARBOXYLATE REDUCTASE
<i>nifS2</i>	NCgl1500	3,55	E	CYSTEINE DESULFHYDRASE / SELENOCYSTEINE LYASE
<i>dnaK</i>	NCgl2702	3,43	O	HEAT SHOCK PROTEIN HSP70
	NCgl1484	3,38	F	GLUTAMINE AMIDOTRANSFERASE DOMAIN
	NCgl0101	3,37	R	HYDROLASE, AMA/HIPO/HYUC FAMILY
	NCgl1300	3,33	-	PERMEASE OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>sufC</i>	NCgl1501	3,27	O	IRON-REGULATED ABC TRANSPORTER ATPASE SUBUNIT
	NCgl2548	3,25	-	PERMEASE OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>dps</i>	NCgl2897	3,24	P	STARVATION-INDUCED DNA PROTECTING PROTEIN
<i>proP</i>	NCgl2961	3,24	-	PROLINE/ECTOINE CARRIER
<i>dnaJ</i>	NCgl2700	3,23	O	CHAPERONE WITH DNAK, HEAT SHOCK PROTEIN (DNAJ PROTEIN)
	NCgl1098	3,17	R	PREDICTED ESTERASE OF THE ALPHA-BETA HYDROLASE SUPERFAMILY
	NCgl1499	3,15	C	NIFU HOMOLOGS INVOLVED IN FE-S CLUSTER FORMATION
	NCgl2053	3,14	-	DEHYDROGENASE
<i>clpC</i>	NCgl2585	3,07	O	PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (HEAT SHOCK PROTEIN)
<i>grpE</i>	NCgl2701	2,97	O	MOLECULAR CHAPERONE GRPE (HEAT SHOCK PROTEIN)
	NCgl1498	2,95	R	PREDICTED METAL-SULFUR CLUSTER BIOSYNTHETIC ENZYME
<i>hspR</i>	NCgl2699	2,89	K	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR MERR FAMILY
	NCgl0103	2,83	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1089	2,82	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>ftsI</i>	NCgl2084	2,80	M	PENICILLIN-BINDING PROTEIN 2X
<i>mraW</i>	NCgl2086	2,77	M	S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE INVOLVED IN CELL ENVELOPE BIOGENESIS
<i>mtrB</i>	NCgl0722	2,77	T	SIGNAL TRANSDUCTION HISTIDINE KINASE

## Anhang

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1754	2,70	-	HYPOTHETICAL PROTEIN PREDICTED BY GLIMMER/CRITICA
<i>rpfI</i>	NCgl0785	2,69	-	RPF PROTEIN PRECURSOR
	NCgl1067	2,66	M	GLYCOSYLTRANSFERASE INVOLVED IN CELL WALL BIOGENESIS
	NCgl0100	2,66	H	P-AMINOBENZOYL-GLUTAMATE TRANSPORTER
	NCgl1761	2,65	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCgl0723	2,62	-	SECRETED LIPOPROTEIN
	NCgl1697	2,58	LR	NUDIX HYDROLASE
	NCgl0724	2,57	R	PURINE/PYRIMIDINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE
<i>cwlM</i>	NCgl2986	2,56	M	N-ACETYLMURAMYL-L-ALANINE AMIDASE
	NCgl2785	2,54	I	MEMBRANE-ASSOCIATED PHOSPHOLIPID PHOSPHATASE
	NCgl1065	2,53	R	LYSINE DECARBOXYLASE FAMILY PROTEIN
<i>kata</i>	NCgl0251	2,47	P	CATALASE
	NCgl0573	2,45	O	
	NCgl2841	2,45	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2876	2,45	-	PERMEASE OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>treS</i>	NCgl2221	2,45	G	TREHALOSE SYNTHASE (MALTOSE ALPHA-D-GLUCOSYLTRANSFERASE)
<i>folP2</i>	NCgl1066	2,45	H	DIHYDROPTEROATE SYNTHASE
	NCgl0104	2,42	-	ATP/GTP-BINDING PROTEIN
	NCgl2349	2,38	S	ALKYLHYDROPEROXIDASE AHPD FAMILY CORE DOMAIN
<i>mrpF</i>	NCgl2637	2,37	P	MULTISUBUNIT NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ANTIporter, F SUBUNIT
<i>nadC</i>	NCgl1023	2,36	H	PUTATIVE NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHORYLASE (
	NCgl0226	2,33	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>sod</i>	NCgl2826	2,32	P	MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE
	NCgl1099	2,32	R	PREDICTED HYDROLASE OR ACYLTRANSFERASE (ALPHA/BETA HYDROLASE SUPERFAMILY)
<i>secA</i>	NCgl0726	2,31	U	PREPROTEIN TRANSLOCASE SUBUNIT SECA
	NCgl0135	2,27	R	PUTATIVE TRANSPORT PROTEIN
<i>murE</i>	NCgl2083	2,25	M	PROBABLE UDP-N-ACETYLMURAMOYLALANYL-D-GLUTAMATE--2
	NCgl1475	2,25	O	SECRETED PROTEASE SUBUNIT, STOMATIN/PROHIBITIN HOMOLOG
<i>prpB1</i>	NCgl0665	2,22	G	PROBABLE METHYLISOCITRIC ACID LYASE
<i>lipT</i>	NCgl1088	2,22	I	TYPE B CARBOXYLESTERASE
	NCgl2784	2,21	-	PUTATIVE SECRETED OR MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0201	2,21	-	MEMBRANE PROTEIN
	-	2,19	M	GLYCOSYLTRANSFERASES, PROBABLY INVOLVED IN CELL WALL BIOGENESIS
	NCgl2597	2,18	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>otsB</i>	NCgl2537	2,16	G	TREHALOSE PHOSPHATASE
<i>trxB</i>	NCgl2984	2,15	O	THIOREDOXIN REDUCTASE
	NCgl0397	2,14	-	HYPOTHETICAL MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0963	2,12	P	NA <sup>+</sup> /PROLINE, NA <sup>+</sup> /PANTHOTHENATE SYMPORTER
	NCgl2449	2,12	CR	NADPH QUINONE REDUCTASE OR RELATED ZN-DEPENDENT OXIDOREDUCTASE
	NCgl2918	2,12	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0959	2,11	M	PROBABLE PHOSPHINOTHRICIN ACETYLTRANSFERASE PROTEI
	NCgl2900	2,09	S	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCgl2899	2,09	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0046	2,08	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0213	2,06	G	ABC TRANSPORTER ATP-BINDING PROTEIN
	NCgl0095	2,05	-	HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl1022	2,05	E	CYSTEINE SULFINATE DESULFINASE/CYSTEINE DESULFURASE OR RELATED ENZYME

## Anhang

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
<i>panC2</i>	NCgl2595	2,05	H	SIMILAR TO PANTOTHENATE SYNTHETASE
	NCgl0394	2,05	V	PUTATIVE ABC TRANSPORTER INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2596	2,04	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0746	2,03	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>mrpG</i>	NCgl2638	2,03	P	MULTISUBUNIT NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ANTIPTORTER, G SUBUNIT
<i>mrpD</i>	NCgl2635	2,03	CP	NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE/MULTISUBUNIT NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ANTIPTORTER, D SUBUNIT
	NCgl0567	2,03	O	HOMOLOG OF METAL-DEPENDENT PROTEASES, PUTATIVE MOLECULAR CHAPERONE
	NCgl1213	2,02	C	PUTATIVE OXIDOREDUCTASE (RELATED TO ARYL-ALCOHOL DEHYDROGENASES)
<i>mrpA</i>	NCgl2633	2,02	CP	NADH UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE SUBUNIT 5 (CHAIN L)/MULTISUBUNIT NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ANTIPTORTER, A SUBUNIT
	NCgl1039	2,02	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>recR</i>	NCgl0241	2,01	L	DNA REPAIR PROTEIN (RECF PATHWAY)
<i>lipA</i>	NCgl2128	2,01	H	LIPOIC ACID SYNTHASE
	NCgl0314	2,00	R	ZN-DEPENDENT HYDROLASE
	NCgl1218	1,99	S	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0747	1,98	R	METAL-DEPENDENT HYDROLASE
	NCgl1753	1,98	-	HYPOTHETICAL PROTEIN PREDICTED BY GLIMMER/CRITICA
	NCgl0995	1,97	M	GLYCOSYLTRANSFERASE, PROBABLY INVOLVED IN CELL WALL BIOGENESIS
	NCgl0883	1,97	R	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1085	1,95	V	ABC-TYPE MULTIDRUG/PROTEIN/LIPID TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
	NCgl2587	1,95	K	ARAC-TYPE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
<i>secY</i>	NCgl0532	1,94	U	PREPROTEIN TRANSLOCASE SUBUNIT SECY
	NCgl0994	1,93	-	SENSORY BOX/GGDEF FAMILY PROTEIN
<i>hpaG</i>	NCgl2919	1,93	Q	PUTATIVE BIFUNCTIONAL ENZYME 2-HYDROXYHEPTA-2,4-DIENE-1, 7-DIOATESOMERASE5-CARBOXYMETHYL-2-OXO-HEX-3
	NCgl0121	1,93	GEPR	PUTATIVE MEMBRANE TRANSPORT PROTEIN
	NCgl0934	1,93	M	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>lysE</i>	NCgl1214	1,93	R	LYSINE EFFLUX PERMEASE
	NCgl2639	1,91	-	PREDICTED HYDROLASE OR ACYLTRANSFERASE (ALPHA/BETA HYDROLASE SUPERFAMILY)
<i>mutM1</i>	NCgl1993	1,90	L	FORMAMIDOPYRIMIDINE-DNA GLYCOSYLASE
	NCgl1847	1,90	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl1016	1,89	R	ATPASE COMPONENT OF ABC TRANSPORTERS WITH DUPLICATED ATPASE DOMAINS
<i>proA</i>	NCgl2272	1,89	E	GAMMA-GLUTAMYL PHOSPHATE REDUCTASE
<i>codA</i>	NCgl0075	1,88	FR	CREATININE DEAMINASE
<i>glpX</i>	NCgl0976	1,88	G	GLPX-LIKE PROTEIN
<i>eno</i>	NCgl0935	1,88	G	ENOLASE
	NCgl1131	1,88	R	PUTATIVE SECRETED HYDROLASE
<i>proB</i>	NCgl2274	1,88	E	GLUTAMATE 5-KINASE PROTEIN
	NCgl1755	1,87	-	HYPOTHETICAL PROTEIN PREDICTED BY GLIMMER/CRITICA
	NCgl1090	1,87	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>ftsZ</i>	NCgl2075	1,86	D	CELL DIVISION GTPASE
<i>trxC</i>	NCgl2985	1,86	OC	THIOREDOXIN
	NCgl0045	1,86	T	SECRETED PROTEIN
<i>kup</i>	NCgl0682	1,86	P	K <sup>+</sup> POTASSIUM TRANSPORTER

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
<i>treX</i>	NCgl2222	1,85	G	PROBABLE TREHALOSE SYNTHASE
<i>rnc</i>	NCgl1994	1,84	K	RIBONUCLEASE III
	NCgl0316	1,84	-	PERMEASE, MAJOR FACILITATOR FAMILY
	NCgl1301	1,83	K	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
	NCgl0960	1,83	E	ALLOPHANATE HYDROLASE SUBUNIT 2
	NCgl0848	1,83	J	ACETYLTRANSFERASE
	<i>pstS</i>	NCgl2486	1,82	P
NCgl0816		1,82	P	CYANATE PERMEASE
NCgl0725		1,82	J	RIBOSOME-ASSOCIATED PROTEIN Y (PSRP-1)
<i>ilvB</i>	NCgl1222	1,81	EH	ACETOLACTATE SYNTHASE
<i>thiC</i>	NCgl1253	1,81	H	THIAMINE BIOSYNTHESIS PROTEIN
<i>sahH</i>	NCgl0719	1,81	H	ADENOSYLHOMOCYSTEINASE
	NCgl1885	1,81	P	PREDICTED PERMEASE (COBALT PERMEASE SUBFAMILY)
<i>mrcB</i>	NCgl2884	1,80	M	MEMBRANE CARBOXYPEPTIDASE, PENICILLIN-BINDING PROTEIN
	NCgl0662	1,80	R	COBALAMIN SYNTHESIS PROTEIN/P47K
<i>aceB</i>	NCgl2247	1,80	C	MALATE SYNTHASE
<i>cmr</i>	NCgl2680	1,80	-	MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN
<i>thiO</i>	NCgl1962	1,80	E	PUTATIVE D-AMINO ACID OXIDASE FLAVOPROTEIN OXIDOREDUCTASE
	NCgl2883	1,79	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2052	1,79	P	PREDICTED CO/ZN/CD CATION TRANSPORTER
	NCgl0099	1,79	C	PUTATIVE OXIDOREDUCTASE
<i>mrpC</i>	NCgl2634	1,79	P	MULTISUBUNIT NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ANTIporter INVOLVED IN PH REGULATION
<i>manA</i>	NCgl0716	1,78	G	MANNANOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE
	NCgl0613	1,77	S	MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0675	1,77	D	NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN
<i>odhA</i>	NCgl1084	1,76	C	2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE
	NCgl1011	1,76	R	STRONG SIMILARITY TO HYPOTHETICAL PROTEIN RV0959 - MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

**+1,75 > nicht regulierte Gene > -1,75**

<i>purL</i>	NCgl2499	-1,75	F	PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHASE
	NCgl0318	-1,76	-	CONSERVED HYPOTHETICAL MEMBRANE PROTEIN
<i>ctaE</i>	NCgl2112	-1,76	C	CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 3
	NCgl2912	-1,76	-	PUTATIVE SECRETED MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0778	-1,76	P	ABC-TYPE COBALAMIN/FE <sup>3+</sup> -SIDEROPHORES TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>pduO</i>	NCgl2471	-1,77	S	ADENOSYLCOBALAMIN-DEPENDENT DIOL DEHYDRATASE GAMMA
<i>ilvE</i>	NCgl2123	-1,77	EH	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID AMINOTRANSFERASE
<i>ppmC</i>	NCgl1423	-1,78	M	POLYPRENOL-PHOSPHATE-MANNANOSE SYNTHASE DOMAIN 1
	NCgl1866	-1,78	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0602	-1,78	M	SECRETED LIPOPROTEIN
	NCgl2890	-1,79	R	UNCHARACTERIZED ENZYME RELATED TO SULFURTRANSFERASES
	NCgl0819	-1,79	E	PUTATIVE CHORISMATE MUTASE
	NCgl2813	-1,79	R	NADPH-DEPENDENT FMN REDUCTASE
	NCgl0176	-1,80	K	PROBABLE LACI-FAMILY TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
	NCgl0779	-1,81	P	ABC-TYPE COBALAMIN/FE <sup>3+</sup> -SIDEROPHORES TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
	NCgl2924	-1,81	C	NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -DICARBOXYLATE SYMPORTER
<i>cgtR2</i>	NCgl0839	-1,81	TK	PUTATIVE TWO COMPONENT RESPONSE REGULATOR
<i>rpsK</i>	NCgl0538	-1,83	J	RIBOSOMAL PROTEIN S11

## Anhang

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
<i>rplC</i>	NCgl0487	-1,83	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L3
	NCgl0008	-1,83	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl2213	-1,84	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>qcrA1</i>	NCgl2110	-1,85	C	RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN
<i>leuA</i>	NCgl0245	-1,85	E	2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE
<i>upp</i>	NCgl0654	-1,85	F	PUTATIVE URACIL PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE
<i>tesB2</i>	NCgl1600	-1,86	I	PROBABLE ACYL-COA THIOESTERASE II PROTEIN
<i>lysA</i>	NCgl1133	-1,86	E	DIAMINOPIMELATE DECARBOXYLASE
	NCgl0777	-1,87	P	ABC-TYPE COBALAMIN/FE3+-SIDEROPHORES TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>ctaE</i>	NCgl2112	-1,87	C	CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 3
<i>thiD2</i>	NCgl2973	-1,88	H	PUTATIVE PHOSPHOMETHYLPYRIMIDINE KINASE
	NCgl1824	-1,88	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>pyrF</i>	NCgl1546	-1,88	F	OROTIDINE-5'-PHOSPHATE DECARBOXYLASE
	NCgl1941	-1,89	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>malQ</i>	NCgl2217	-1,89	G	4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE
	NCgl1929	-1,89	-	PUTATIVE SECRETED OR MEMBRANE PROTEIN
	NCgl2374	-1,89	G	ABC-TYPE SUGAR TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>tyrS</i>	NCgl1352	-1,90	J	TYROSYL-TRNA SYNTHETASE
<i>atpC</i>	NCgl1166	-1,90	C	PROBABLE ATP SYNTHASE EPSILON CHAIN PROTEIN
	NCgl1170	-1,91	E	GLYOXALASE/BLEOMYCIN RESISTANCE/DIOXYGENASE SUPERFAMILY PROTEIN
<i>rplP</i>	NCgl0494	-1,92	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L16
	NCgl2169	-1,92	R	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID ABC-TYPE TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>ptsS</i>	NCgl2553	-1,93	G	ENZYME II SUCROSE PROTEIN
	NCgl0287	-1,93	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCgl2114	-1,93	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0845	-1,95	H	5-FORMYLTETRAHYDROFOLATE CYCLO-LIGASE
<i>prpB2</i>	NCgl0629	-1,96	G	PROBABLE METHYLISOCITRIC ACID LYASE
<i>gatB</i>	NCgl1211	-1,97	J	PROBABLE GLU-TRNAGLN AMIDOTRANSFERASE SUBUNIT B PR
	NCgl1351	-1,98	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl2088	-2,00	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>mraZ</i>	NCgl2087	-2,02	S	MRAZ
<i>prpC2</i>	NCgl0630	-2,02	C	METHYLCITRATE SYNTHASE
	NCgl2168	-2,04	R	ABC TRANSPORTER ATP-BINDING PROTEIN
	NCgl2170	-2,04	R	SECRETED ABC TRANSPORTER SUBSTRATE-BINDING PROTEIN
<i>prpD2</i>	-	-2,05	R	PROPIONATE CATABOLISM PROTEIN PRPD
	NCgl0440	-2,05	-	PUTATIVE SERINE PROTEASE (CLPP CLASS)
	NCgl2584	-2,05	R	UNCHARACTERIZED ENZYME INVOLVED IN BIOSYNTHESIS OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES
	NCgl2512	-2,06	FGR	HIT FAMILY HYDROLASE
<i>gluA</i>	NCgl1875	-2,06	E	GLUTAMATE UPTAKE SYSTEM ATP-BINDING PROTEIN
<i>aroG</i>	NCgl2098	-2,06	E	PHOSPHO-2-DEHYDRO-3-DEOXYHEPTONATE ALDOLASE
<i>rplA</i>	NCgl0460	-2,06	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L1
	NCgl1288	-2,08	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>ndk</i>	NCgl2287	-2,09	F	NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE
<i>cspA</i>	NCgl0171	-2,13	K	COLD-SHOCK PROTEIN CSP A
<i>qcrB</i>	NCgl2109	-2,13	C	CYTOCHROME B, MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1389	-2,13	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN



Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl2574	-2,13	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>rplL</i>	NCgl0469	-2,16	J	PROBABLE 50S RIBOSOMAL SUBUNIT PROTEIN L7/L12
	NCgl2831	-2,17	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>carB</i>	NCgl1547	-2,18	EF	PUTATIVE CARBAMOYL-PHOSPHATE SYNTHASE SUBUNIT
	NCgl2524	-2,19	R	PERMEASE OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>mdh</i>	NCgl2297	-2,25	C	MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN
	NCgl0799	-2,25	R	NA+/PROLINE, NA+/PANTHOTHENATE SYMPORTER OR RELATED PERMEASE
<i>atpD</i>	NCgl1165	-2,26	C	ATP SYNTHASE ALPHA SUBUNIT
<i>cysQ</i>	NCgl0811	-2,27	P	3'-PHOSPHOADENOSINE 5'-PHOSPHOSULFATE (PAPS) 3'-PHOSPHATASE
<i>rplS</i>	NCgl1960	-2,30	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L19
	NCgl1210	-2,30	R	PUTATIVE NA+-DEPENDENT TRANSPORTER
	NCgl0971	-2,41	R	NADPH-DEPENDENT FMN REDUCTASE
<i>rplK</i>	NCgl0459	-2,41	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L11
<i>atpG</i>	NCgl1164	-2,46	C	ATP SYNTHASE GAMMA SUBUNIT
	NCgl2574	-2,69	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>ctaA</i>	NCgl1508	-2,70	O	CYTOCHROME OXIDASE ASSEMBLY PROTEIN
	NCgl0798	-2,72	S	PUTATIVE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
<i>infA</i>	NCgl0536	-3,02	J	TRANSLATION INITIATION FACTOR IF-1
<i>metE</i>	NCgl1094	-3,08	E	HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE
<i>cspA2</i>	NCgl0303	-3,40	K	COLD-SHOCK PROTEIN CSPA
<i>ldh</i>	NCgl2810	-5,57	C	L-LACTATE DEHYDROGENASE

Tabelle 17: Verändert transkribierte Gene 240 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,2 osm/kg. Die p-Werte der bestimmten Faktoren waren jeweils kleiner gleich 0,05.

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1033	4,43	S	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>proC</i>	NCgl0398	3,97	E	PYRROLINE-5-CARBOXYLATE REDUCTASE
<i>nadC</i>	NCgl1023	3,74	H	PUTATIVE NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHORYLASE (
<i>cysH</i>	NCgl2717	3,72	EH	PHOSPHOADENOSINE-PHOSPHOSULFATE REDUCTASE
<i>dnaK</i>	NCgl2702	3,71	O	HEAT SHOCK PROTEIN HSP70
	NCgl1418	3,59	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>thiC</i>	NCgl1253	3,25	H	THIAMINE BIOSYNTHESIS PROTEIN
<i>sufD</i>	NCgl1502	3,13	O	COMPONENTS OF AN UNCHARACTERIZED IRON-REGULATED ABC-TYPE TRANSPORTER
	NCgl0725	2,76	J	RIBOSOME-ASSOCIATED PROTEIN Y (PSRP-1)
<i>cysK</i>	NCgl2473	2,70	E	O-ACETYL SERINE (THIOL)-LYASE
	NCgl1022	2,67	E	CYSTEINE SULFINATE DESULFINASE/CYSTEINE DESULFURASE OR RELATED ENZYME
	NCgl0724	2,55	R	PURINE/PYRIMIDINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE
<i>cysJ</i>	NCgl2719	2,53	ER	PROBABLE SULFITE REDUCTASE (FLAVOPROTEIN)
<i>mraW</i>	NCgl2086	2,47	M	S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE INVOLVED IN CELL ENVELOPE BIOGENESIS
	NCgl1417	2,46	P	SULFATE PERMEASE OR RELATED TRANSPORTER (MFS SUPERFAMILY)
	NCgl1475	2,44	O	SECRETED PROTEASE SUBUNIT, STOMATIN/PROHIBITIN HOMOLOG
<i>glyA</i>	NCgl0954	2,41	E	SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE
	NCgl1034	2,40	P	ABC-TYPE COBALT TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
	NCgl1483	2,38	K	(AAK45786) TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, TETR FAMILY

## Anhang

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
<i>cwlM</i>	NCgl2986	2,38	M	N-ACETYLMURAMYL-L-ALANINE AMIDASE
	NCgl2942	2,37	C	PUTATIVE NADH-DEPENDENT FLAVIN OXIDOREDUCTASE
<i>irp1</i>	NCgl0639	2,37	P	DTXR/IRON REGULATED LIPOPROTEIN PRECURSOR, SECRETE
	NCgl1484	2,34	F	GLUTAMINE AMIDOTRANSFERASE DOMAIN
<i>fixB</i>	NCgl1183	2,32	C	PUTATIVE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN, ALPHA SUBUNIT
	NCgl1985	2,32	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>atpA</i>	NCgl1163	2,30	C	PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN
	NCgl1859	2,29	KG	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR OF SUGAR METABOLISM, DEOR FAMILY
	NCgl1761	2,29	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>glpX</i>	NCgl0976	2,28	G	GLPX-LIKE PROTEIN
	NCgl0104	2,23	-	ATP/GTP-BINDING PROTEIN
	NCgl1375	2,21	KT	PUTATIVE DNA GYRASE INHIBITOR
	NCgl0995	2,14	M	GLYCOSYLTRANSFERASE, PROBABLY INVOLVED IN CELL WALL BIOGENESIS
	NCgl0934	2,14	M	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl0100	2,13	H	P-AMINOBENZOYL-GLUTAMATE TRANSPORTER
	NCgl0636	2,13	PH	ABC-TYPE COBALAMIN/FE3+-SIDEROPHORES TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
	NCgl1089	2,13	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	NCgl2349	2,11	S	ALKYLHYDROPEROXIDASE AHPD FAMILY CORE DOMAIN
	<i>hemD</i>	NCgl0414	2,10	H
NCgl1090		2,10	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
NCgl2053		2,09	-	DEHYDROGENASE
NCgl1754		2,09	-	HYPOTHETICAL PROTEIN PREDICTED BY GLIMMER/CRITICA
NCgl0201		2,05	-	MEMBRANE PROTEIN
NCgl2349		2,04	S	ALKYLHYDROPEROXIDASE AHPD FAMILY CORE DOMAIN
NCgl1945		2,03	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>dtsR1</i>	NCgl0678	2,02	I	ACETYL/PROPIONYL-COA CARBOXYLASE BETA CHAIN
<i>lipA</i>	NCgl2128	2,01	H	LIPOIC ACID SYNTHASE
	NCgl0397	2,00	-	HYPOTHETICAL MEMBRANE PROTEIN
<i>pcaG</i>	NCgl2314	2,00	Q	PROTocatechuate dioxygenase alpha subunit
	NCgl1697	1,99	LR	NUDIX HYDROLASE
<i>nifS2</i>	NCgl1500	1,98	E	CYSTEINE DESULFHYDRASE / SELENOCYSTEINE LYASE
	NCgl2900	1,98	S	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
<i>lldA</i>	NCgl2817	1,95	C	PUTATIVE L-LACTATE DEHYDROGENASE
<i>secA</i>	NCgl0726	1,94	U	PREPROTEIN TRANSLOCASE SUBUNIT SECA
<i>clpP2</i>	NCgl2327	1,92	OU	ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT CLPP2
	NCgl1096	1,90	P	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3
<i>lipT</i>	NCgl1088	1,89	I	TYPE B CARBOXYLESTERASE
	NCgl2841	1,88	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1067	1,88	M	GLYCOSYLTRANSFERASE INVOLVED IN CELL WALL BIOGENESIS
	NCgl0243	1,86	M	HYPOTHETICAL TRIPEPTIDE SYNTHASE INVOLVED IN MUREIN FORMATION
<i>eno</i>	NCgl0935	1,86	G	ENOLASE
<i>gnd</i>	NCgl1396	1,85	G	6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE
	NCgl0642	1,84	S	MEMBRANE PROTEIN
<i>mrpG</i>	NCgl2638	1,82	P	MULTISUBUNIT NA+/H+ ANTIporter, G SUBUNIT
	NCgl1039	1,81	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
	NCgl1439	1,81	-	PUTATIVE PROTEASOME COMPONENT
	NCgl0802	1,81	I	
<i>atpH</i>	NCgl1162	1,81	C	H+-ATPASE DELTA SUBUNIT
	NCgl1985	1,80	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN

Gen	NCBI CDS	Faktor	COG	Annotation
	NCgl1042	1,80	-	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>vanK</i>	NCgl2302	1,79	-	VANILLATE TRANSPORTER VANK
	NCgl2942	1,79	C	PUTATIVE NADH-DEPENDENT FLAVIN OXIDOREDUCTASE
<i>grpE</i>	NCgl2701	1,79	O	MOLECULAR CHAPERONE GRPE (HEAT SHOCK PROTEIN)
	NCgl1085	1,79	V	ABC-TYPE MULTIDRUG/PROTEIN/LIPID TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
<i>folD</i>	NCgl0620	1,79	H	METHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE
<i>folP2</i>	NCgl1066	1,77	H	DIHYDROPTEROATE SYNTHASE
	NCgl2809	1,77	G	PYRUVATE KINASE-LIKE PROTEIN
<i>dnaJ</i>	NCgl2700	1,77	O	CHAPERONE WITH DNAK, HEAT SHOCK PROTEIN (DNAJ PROTEIN)
<i>panC2</i>	NCgl2595	1,76	H	SIMILAR TO PANTOTHENATE SYNTHETASE
<i>sufC</i>	NCgl1501	1,75	O	IRON-REGULATED ABC TRANSPORTER ATPASE SUBUNIT
<b>+1,75 &gt; nicht regulierte Gene &gt; -1,75</b>				
<i>qcrB</i>	NCgl2109	-1,75	C	CYTOCHROME B, MEMBRANE PROTEIN
	NCgl0562	-1,75	-	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
	-	-1,75	O	
	NCgl2374	-1,76	G	ABC-TYPE SUGAR TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>qcrA1</i>	NCgl2110	-1,77	C	RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN
<i>plsC</i>	NCgl2104	-1,77	I	1-ACYL-SN-GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACETYLTRANSFERASE
<i>rpsA</i>	NCgl1304	-1,77	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S1
<i>rpsD</i>	NCgl0539	-1,77	J	RIBOSOMAL PROTEIN S4
	NCgl1915	-1,78	E	ABC-TYPE PEPTIDE TRANSPORT SYSTEM, SECRETED COMPONENT
	NCgl0176	-1,80	K	PROBABLE LACI-FAMILY TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
<i>amyE</i>	NCgl2375	-1,80	G	MALTOSE-BINDING PROTEIN PRECURSOR
<i>rpsS</i>	NCgl0491	-1,80	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S19
	NCgl1351	-1,81	S	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>gluC</i>	NCgl1877	-1,82	E	GLUTAMATE PERMEASE
	NCgl0601	-1,83	K	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, MARR FAMILY
<i>rpsM</i>	NCgl0537	-1,83	J	(Q9RA65) RIBOSOMAL PROTEIN S13
<i>rpoA</i>	NCgl0540	-1,84	K	DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNIT
	NCgl0971	-1,84	R	NADPH-DEPENDENT FMN REDUCTASE
<i>rpmB</i>	NCgl0834	-1,84	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L28
	NCgl2169	-1,86	R	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID ABC-TYPE TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>hisG</i>	NCgl1447	-1,87	E	ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE
<i>ackA</i>	NCgl2656	-1,87	C	ACETATE KINASE
<i>tyrS</i>	NCgl1352	-1,90	J	TYROSYL-TRNA SYNTHETASE
<i>rplT</i>	NCgl1326	-1,90	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L20
	NCgl1915	-1,90	E	ABC-TYPE PEPTIDE TRANSPORT SYSTEM, SECRETED COMPONENT
<i>msiK1</i>	NCgl2377	-1,90	G	ABC-TYPE SUGAR TRANSPORT SYSTEM, ATPASE COMPONENT
<i>rpsR</i>	NCgl0831	-1,93	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S18
<i>qcrC</i>	NCgl2111	-1,95	C	CYTOCHROME C1
<i>rplS</i>	NCgl1960	-1,95	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L19
<i>pta</i>	NCgl2657	-1,96	C	PHOSPHATE ACETYLTRANSFERASE
<i>rpsB</i>	NCgl1950	-1,96	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S2
<i>infA</i>	NCgl0536	-1,98	J	TRANSLATION INITIATION FACTOR IF-1
<i>rpsN</i>	NCgl0832	-1,99	J	30S RIBOSOMAL PROTEIN S14
<i>ptsS</i>	NCgl2553	-2,00	G	ENZYME II SUCROSE PROTEIN
<i>leuD</i>	NCgl1263	-2,00	E	3-ISOPROPYLMALATE DEHYDRATASE (SMALL SUBUNIT)

## Anhang

---

<b>Gen</b>	<b>NCBI CDS</b>	<b>Faktor</b>	<b>COG</b>	<b>Annotation</b>
<i>sdhB</i>	NCg10361	-2,03	C	SUCCINATE DEHYDROGENASE B
<i>putP</i>	NCg11116	-2,03	ER	PROLINE TRANSPORT SYSTEM
<i>gluB</i>	NCg11876	-2,03	ET	GLUTAMATE SECRETED BINDING PROTEIN
<i>cspA</i>	NCg10171	-2,04	K	COLD-SHOCK PROTEIN CSPA
<i>ldh</i>	NCg12810	-2,05	C	L-LACTATE DEHYDROGENASE
<i>purL</i>	NCg12499	-2,06	F	PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHASE
<i>actA</i>	NCg12480	-2,06	C	BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE
<i>rpmD</i>	NCg10519	-2,07	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L30
	NCg12574	-2,10	-	PUTATIVE SECRETED PROTEIN
	NCg10602	-2,10	M	SECRETED LIPOPROTEIN
	NCg12170	-2,10	R	SECRETED ABC TRANSPORTER SUBSTRATE-BINDING PROTEIN
<i>rplK</i>	NCg10459	-2,12	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L11
<i>rpsK</i>	NCg10538	-2,15	J	RIBOSOMAL PROTEIN S11
	NCg11210	-2,19	R	PUTATIVE NA <sup>+</sup> -DEPENDENT TRANSPORTER
<i>cysQ</i>	NCg10811	-2,29	P	3'-PHOSPHOADENOSINE 5'-PHOSPHOSULFATE (PAPS) 3'-PHOSPHATASE
<i>rplA</i>	NCg10460	-2,37	J	50S RIBOSOMAL PROTEIN L1
	NCg10798	-2,55	S	PUTATIVE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN
<i>sdhCD</i>	NCg10359	-2,62	-	SUCCINATE DEHYDROGENASE CD
	NCg10799	-2,87	R	NA <sup>+</sup> /PROLINE, NA <sup>+</sup> /PANTHOTHENATE SYMPORTER OR RELATED PERMEASE



Ich danke

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas und seine fachliche Unterstützung,

Frau Prof. Dr. Karin Schnetz für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Frau Dr. Susanne Morbach für Ihre kontinuierlich gute Betreuung und das Korrekturlesen der Arbeit,

Herrn Dr. H. Jörg Kunte und Katrin Grammann von der Universität Bonn für die Möglichkeit, *real-time*-PCR Experimente durchzuführen,

Herrn Dr. Jörn Kalinowski und Andrea Hüser von der Universität Bielefeld für die Bereitstellung der *Coryne*-Microarrays und die Unterstützung bei der Durchführung der damit verbundenen Experimente,

meinen direkten Laborkolleginnen Eva, Henrike, Nina und Ute für ein super Arbeitsklima, erholsame Kaffeepausen, stetiges Füttern des CD-Players mit unterschiedlichsten Musiktiteln und helfenden Händen bei der Durchführung von vielen Experimenten,

all meinen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Krämer für die schöne gemeinschaftliche Zeit,

meinen Eltern für Ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jede, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Keine Teilpublikationen

Datum:

Unterschrift:





Oliver Alexander Ley

Blumenthalstr. 1

50670 Köln

## **Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Geburtsdatum: 25.04.1975

Geburtsort: Bergisch-Gladbach

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

1981 – 1985: Städt. Kath. Grundschule Balthasarstraße

1985 – 1989: Städt. Gymnasium Blücherstraße

1989 – 1995 : Gesamtschule Köln-Rodenkirchen mit Abschluss  
Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst**

1995 – 1996: Zivildienst im Lehrer- und Sozialarbeiterzentrum Köln e.V.

### **Hochschulbildung**

1996 – 2002: Studium der Biologie an der Universität zu Köln  
Abschluss: Diplom

2002 – 2005: Promotion in Biochemie (biologische Ausrichtung)

Köln, den

