

**Biochemische,
biotechnologische und molekularbiologische
Analyse eines Signaltransduktionsweges in
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Maïke Silberbach

aus Münster

Köln, September 2004

Berichterstatter:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Thomas Langer

Tag der Disputation: 07.12.2004

**Biochemical, biotechnological und molecular biological
analysis of a signal transduction pathway in
*Corynebacterium glutamicum***

Corynebacterium glutamicum is a gram-positive soil bacterium with an outstanding industrial importance. Because of its capability to produce large amounts of amino acids, e. g. L-glutamate and L-lysine, this microorganism was used for several fermentation processes. Since the cellular metabolism and especially the biosynthesis of amino acids is strictly dependent on the availability of nitrogen sources, the understanding of the corresponding regulatory mechanisms is of special interest. All processes which are involved to organize nitrogen uptake and assimilation at different nitrogen availabilities are termed nitrogen control. In *C. glutamicum*, the AmtR-regulon has been elucidated, it is a global regulatory network which differs significantly from models postulated for other microorganisms. Former projects were concentrated on the identification and characterization of individual components of the nitrogen control. In this study, the main focus was the global analysis of all genes and proteins whose expression and/or synthesis varies in dependence of the nitrogen availability. The response of *C. glutamicum* to abrupt nitrogen starvation in shaking flasks on the one hand and to nitrogen limitation in a continuous fermentation process on the other hand was investigated with regard to complex changes in the transcription and protein profile. For this purpose, the global analysis techniques of DNA microarrays and 2-D- gel electrophoresis were combined. Two major adaptation strategies turned out to be the core response components in both deficiency situations, the rearrangement of the cellular transport capacity and the reorganization of metabolic pathways concerning nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis. By continuous fermentation the possibility to obtain cell material from a well-defined and highly reproducible growth state is given. This resulted in a more determined response to nitrogen limitation, which also included a regulation on expression level to increase energy generation and protein stability. Additionally, the sensitivity of the global analysis techniques, in particular the proteome analysis, was improved. In this study, for the first time significant differences in proteome profiles of unlimited and nitrogen limited cells were detected with standard coomassie staining. These findings both validated and complemented the obtained transcriptome data.

Biochemische, biotechnologische und molekularbiologische Analyse eines Signaltransduktionsweges in *Corynebacterium glutamicum*

Das gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* hat seit seiner Entdeckung in den 1950er Jahren eine herausragende industrielle Bedeutung erlangt. Auf Grund seiner Fähigkeit zur Produktion großer Mengen an Aminosäuren wie z. B. L-Glutamat und L-Lysin wird dieser Mikroorganismus für verschiedene Fermentationsprozesse eingesetzt. Da der zelluläre Stoffwechsel und insbesondere die Aminosäurebiosynthese von der Verfügbarkeit der Stickstoffquellen abhängt, ist die detaillierte Kenntnis der involvierten Regulationsmechanismen von Interesse. Alle Prozesse, welche in die Organisation der Stickstoffaufnahme und -assimilation bei unterschiedlichen Stickstoffverfügbarkeiten involviert sind, fasst man unter dem Begriff Stickstoffkontrolle zusammen. Bisherige Projekte fokussierten die Identifizierung und Charakterisierung einzelner Komponenten der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*. Im Gegensatz dazu war der Schwerpunkt dieser Arbeit die globale Analyse aller Gene und Proteine, deren Expression und/oder Synthese sich in Abhängigkeit der Stickstoffversorgung ändert. Einerseits wurde die Antwort von *C. glutamicum* auf abrupten Stickstoffhunger im Schüttelkolben und andererseits auf Stickstofflimitierung in einer kontinuierlichen Fermentation mit Fokus auf komplexe Änderungen im Transkriptions- und Proteomprofil der Zellen untersucht. Dazu kamen zwei globale Analysetechniken zum Einsatz, die DNA-Microarray-Analyse und die 2-D-Gelelektrophorese. Zwei bedeutende Adaptationsmechanismen stellten sich als die Kernkomponenten der Antwort auf beide Mangelsituationen heraus: die umfangreiche Anpassung der Transportkapazität und die Neuorganisation metabolischer Stoffwechselwege. Insbesondere Stoffwechselwege des Stickstoffmetabolismus und der Aminosäurebiosynthese waren betroffen. Die Etablierung der kontinuierlichen Fermentation erlaubte die Gewinnung von Zellmaterial aus einem definierten und gut reproduzierbaren Wachstumsstadium. Dies resultierte in einer wesentlich gerichteteren Antwort auf Stickstoffmangel, die auch eine Expressionsregulation zur Erhöhung der Proteinstabilität und zur Deckung des gesteigerten Energiebedarfs umfasste. Zusätzlich konnte die Sensitivität der globalen Analysetechniken, insbesondere der Proteomanalyse, entscheidend verbessert werden. In dieser Arbeit konnten erstmals signifikante Unterschiede zwischen den Proteommustern unlimitierter und stickstofflimitierter Zellen mit einer einfachen Coomassie-Färbung detektiert werden, welche die Daten des Transkriptomansatzes sowohl verifizierten als auch ergänzten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	10
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	10
2.2 Kulturmedien	11
2.3 Kultivierungsbedingungen	12
2.3.1 Kultivierung im Schüttelkolben.....	12
2.3.2 Kultivierung im <i>Respiration Activity Monitoring System</i> (RAMOS)	13
2.3.3 Kultivierung im Fermenter.....	15
2.3.4 Herstellung kompetenter Zellen	17
2.3.5 Transformation kompetenter Zellen.....	17
2.4 DNA-Techniken	18
2.4.1 Plasmidpräparation.....	18
2.4.2 Präparation chromosomaler DNA.....	18
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	18
2.4.4 Restriktion und Ligation von DNA.....	19
2.4.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	19
2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.4.7 DNA-Sequenzierung.....	19
2.5 RNA-Techniken	20
2.5.1 Verwendete Puffer	20
2.5.2 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i>	20
2.5.3 RNA-Hybridisierungen (<i>Dot Blots</i>)	21
2.5.4 DNA- <i>Microarrays</i>	21
2.5.4.1 cDNA-Synthese und Fluoreszenzmarkierung.....	22
2.5.4.2 DNA- <i>Microarray</i> -Hybridisierung.....	22
2.5.4.3 Signaldetektion und Auswertung	23
2.6 Protein-Techniken	23
2.6.1 Verwendete Puffer	23
2.6.2 Proteinpräparation aus <i>C. glutamicum</i>	24
2.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	24
2.6.4 Eindimensionale Gelelektrophorese (1-D-PAGE).....	25
2.6.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE)	25
2.6.6 Coomassie-Färbung	26
2.6.7 Silberfärbung	26

2.6.8	Western Blot-Analysen	26
2.6.9	Computergestützte Spotanalyse und Proteinquantifizierung	27
2.6.10	Protein-Identifizierung	27
2.6.10.1	In gel-Verdau	28
2.6.10.2	Konzentrierung und Entsalzung von Peptiden hydrophober Proteine ..	28
2.6.10.3	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	28
2.6.10.4	Datenbanksuche	29
2.6.11	Protein-Protein-Interaktionsstudien	29
2.6.11.1	Tandem Affinity Purification- (TAP-) Methode	29
2.6.11.2	Pull Down-Methode	31
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Optimierung der 2-D-PAGE von Membranproteinen	33
3.2	Globale Analyse von Stickstoffhunger	39
3.2.1	OTR- und CTR-Profile in Minimalmedium	39
3.2.2	Transkriptomanalyse	44
3.2.3	Proteomanalyse	51
3.3	Globale Analyse einer Stickstofflimitierung	54
3.3.1	Transkriptomanalyse	54
3.3.1.1	Expressionsprofile unlimitierter und stickstofflimitierter Zellen	55
3.3.1.2	Vergleich der Expressionsprofile stickstofflimitierter Zellen	62
3.3.2	Proteomanalyse	66
3.4	Protein-Protein-Interaktionsstudien	77
3.4.1	Tandem Affinity Purification- (TAP-) Methode	77
3.4.2	Pull Down-Methode	79
4.	Diskussion	82
4.1.	Optimierung der 2-D-PAGE von Membranproteinen	82
4.2	Globale Analyse von Stickstoffhunger	84
4.3	Globale Analyse einer Stickstofflimitierung	87
4.4	Protein-Protein-Interaktionsstudien	93
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Anhang	103
7.1	Plasmidkonstruktionen	103
7.2	Stammkonstruktionen	104
7.3	Transkriptomanalysen	105

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

1-D	Eindimensional
2-D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyxyloxy {1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphat
CTR	Kohlendioxidtransferrate [mol/(l·h)]
D	Durchflussrate [l/(l·h)]
DIG	Digoxigenin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>et al.</i>	'et alii' (und andere)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOGAT	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight</i>
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
N	Stickstoff
NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäure
n _{O₂}	Stoffmenge an Sauerstoff [mol]
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	Offener Leserahmen
OTR	Sauerstofftransferrate [mol/(l·h)]
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck [bar]
R	Gaskonstante (8,3144 J/(mol·K))
RAMOS	<i>Respiration Activity Monitoring System</i>
RQ	respiratorischer Quotient
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur [K]
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Units
V _L	Flüssigkeitsvolumen im Kolben [l]
V _G	Gasvolumen im Kolben [l]
vvm	Gasvolumen pro Flüssigkeitsvolumen pro Minute (Einheit der Begasungsrate)

1 Einleitung

Das gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* wurde in den 1950er Jahren in einem großangelegten *Screening*-Projekt zur Isolierung L-Glutaminsäureproduzierender Mikroorganismen in Bodenproben aus dem Ueno Zoo in Tokyo entdeckt (Kinoshita *et al.*, 1957) und nimmt bis heute eine spezielle Stellung unter den Aminosäureproduzierenden Mikroorganismen ein. *C. glutamicum* gehört phylogenetisch zur Familie der *Corynebacteriaceae*, die auf Grund ihres hohen G+C-Gehaltes und ihrer komplexen mycolsäurehaltigen Zellwand zu den mycolsäurehaltigen Actinomyceten gezählt wird. Im Gegensatz zu eng verwandten Humanpathogenen wie z. B. *C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* wird *C. glutamicum* als apathogener, sicher zu handhabender Organismus eingestuft. Auf Grund seines gut untersuchten Zentralmetabolismus und dem großen Repertoire an etablierten molekularbiologischen Methoden eignet er sich als Modellorganismus sowohl für gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt, als auch speziell für mycolsäurehaltige Actinomyceten. Morphologisch kennzeichnet dieses Bakterium seine namensgebende Keulenform (*coryne*, griechisch Keule). Es bildet unregelmäßige, nicht sporulierende, aerob wachsende Stäbchen der Größe 0,7-1,0 μm x 1,0-3,0 μm aus (Abbildung 1.1). Der für *C. glutamicum* typische Schnappmechanismus bei der Zellteilung führt zur charakteristischen Ausbildung einer V-Form.

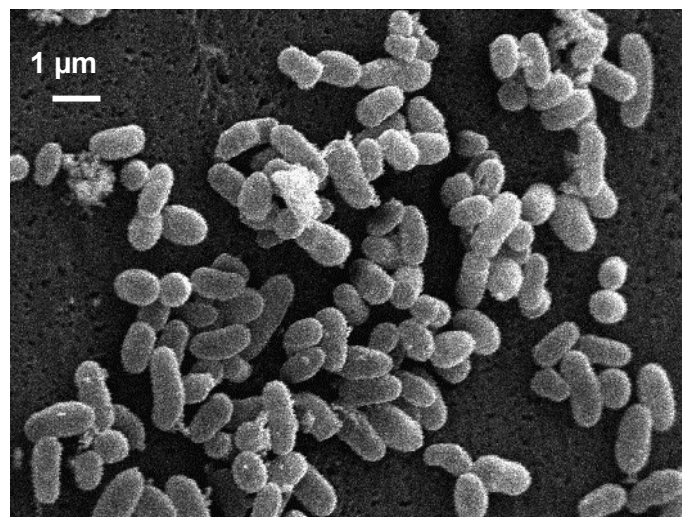


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum*. Die namensgebende keulenförmige Morphologie und die Ausbildung der V-Form in Folge des Schnappmechanismus der Zellteilung sind erkennbar (Quelle: Nina Möker, Institut für Biochemie der Universität zu Köln).

Die Mitglieder der Familie der *Corynebacteriaceae* werden industriell häufig eingesetzt, da sie in der Lage sind, zahlreiche Biotransformationen auszuführen. Hauptsächlich *C. glutamicum* hat durch seine Fähigkeit zur Produktion von diversen Aminosäuren, Nucleotiden und Vitaminen eine herausragende wirtschaftliche Bedeutung erlangt und ist heute der wichtigste, biotechnologisch genutzte Vertreter dieser Gruppe. Eine kontinuierlich betriebene Stamm- und Prozessentwicklung macht derzeit eine Jahresproduktion von ca. 1,5 Millionen Tonnen L-Glutamat und ca. 550.000 Tonnen L-Lysin mit einem jährlichem Marktwachstum von 6 - 7% möglich (Hermann, 2003). L-Glutamat findet in Form seines Natriumsalzes als Geschmacksverstärker in Lebensmitteln Verwendung. L-Lysin kommt vorwiegend als Futtermittelzusatz in der Viehhaltung, aber auch als Grundstoff in der Kosmetikindustrie zum Einsatz. Weitere mit Hilfe von *C. glutamicum* produzierte Aminosäuren sind L-Alanin, L-Isoleucin und L-Glutamin. Daneben gewinnt die Herstellung verschiedener Nucleotide an Bedeutung. L-Threonin und L-Phenylalanin, zwei ebenfalls wirtschaftlich interessante Aminosäuren, werden überwiegend mit *Escherichia coli* hergestellt (Leuchtenberger, 1996; Hermann, 2003). Abhängig von der industriellen Relevanz des Produktes kommen Bioreaktoren einer Größenordnung von 50 bis 500 m³ bei der Produktion zum Einsatz.

Die wachsende wirtschaftliche Bedeutung von *C. glutamicum* führte in den letzten Jahrzehnten zur intensiven Analyse des Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismus. Viele der beteiligten Enzyme konnten bereits biochemisch charakterisiert werden. Erste weiterführende Arbeiten zum „genetischen Design“ von Stoffwechselwegen begannen trotz der frühen Entdeckung erst Anfang der 1980er Jahre (Wohlleben *et al.*, 1993). Seit dem trägt die intensiv betriebene Erforschung der Metabolitenflüsse (Fluxom) zu einem immer genaueren Verständnis interagierender Stoffwechselwege bei (z. B. Dominguez *et al.*, 1998; Tesch *et al.*, 1999; Wendisch *et al.*, 2000; Kiefer *et al.*, 2004; Krömer *et al.*, 2004). In mehreren unabhängigen, industriell finanzierten Sequenzierungsprojekten gelang zudem die vollständige Aufklärung der Genomsequenz von *C. glutamicum*. Mit ihrer Veröffentlichung (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.gib.genes.nig.ac.jp) ist die Anwendung systematischer, global angelegter Techniken zur Analyse von Transkriptom, Proteom und Metabolom möglich.

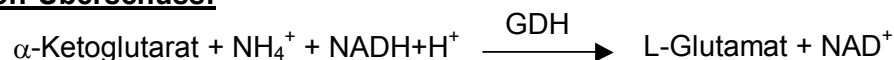
Die detaillierte Kenntnis des Stickstoffmetabolismus hat eine essentielle Bedeutung für die gezielte Stammentwicklung und Prozessoptimierung. Die Aufnahme und Assimilation von Stickstoffquellen wird meist über strikte Regulationsmechanismen der aktuellen Verfügbarkeit des Substrates angepasst. Alle Prozesse, welche in diese Regulation involviert sind, fasst man unter dem Begriff Stickstoffkontrolle zusammen. Studien von Fisher (1999) deuten auf mehrere unterschiedliche Kontrollmechanismen stickstoffabhängiger Prozesse bei Bakterien hin. Insbesondere Arbeiten mit *E. coli* führten zu einem detaillierten Modell der Stickstoffkontrolle von Enterobakterien (Überblick, siehe Merrick und Edwards, 1995). Im Vergleich dazu zeigt *Bacillus subtilis*, der klassische Modellorganismus für gram-positive

Bakterien mit geringem G+C-Gehalt, einen grundsätzlich anderen Regulationsmechanismus, welcher noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (Überblick, siehe Fisher, 1999). Bisherige Untersuchungen zur Stickstoffkontrolle bei *C. glutamicum* lassen auf ein stark von den Mechanismen in *E. coli* und *B. subtilis* abweichendes Prinzip schließen (Überblick, siehe Burkovski, 2003a, 2003b, 2004).

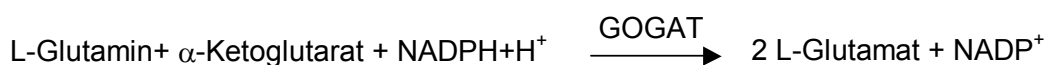
C. glutamicum ist in der Lage, verschiedene Stickstoffquellen zu nutzen. Das bevorzugte Substrat ist Ammonium, aber auch Harnstoff, L-Glutamin, L-Glutamat, Creatinin, L-Arginin, Allantoin und Ornithin können verstoffwechselt werden. Das Substrat Ammonium liegt bei hoher Konzentration im Gleichgewicht mit Ammoniak vor. Dieser ist ungeladen und kann die Zellmembran per Diffusion passieren. Über oxidative Aminierung erfolgt im Cytoplasma der Zelle die Übertragung des Ammoniums auf α -Ketoglutarat unter Bildung von L-Glutamat. Diese Enzymreaktion ist $\text{NADH}+\text{H}^+$ -abhängig und wird durch die niedrig-affinine Glutamatdehydrogenase (GDH, K_m -Wert ~ 1 mM) katalysiert. Alternativ steht der Zelle ein zweiter anabolischer Weg zur Ammoniumassimilation über die Glutaminsynthetase (GS) zur Verfügung. Dieser unterliegt jedoch bei guter Substratversorgung einer Aktivitätsregulation durch posttranslationale Adenylylierung und übernimmt nur 28% der Ammoniumassimilation (Tesch *et al.*, 1999).

Tritt eine Mangelsituation bezüglich der Stickstoffquelle ein, dienen intrazelluläre Konzentrationen von bis zu 200 mM L-Glutamat (Krämer und Lambert, 1990) und 50 mM L-Glutamin (Tesch *et al.*, 1999) zur direkten Abpufferung des Engpasses. Zusätzlich erfolgt eine vollständige Deadenylylierung der GS durch eine Adenylyltransferase (ATase). Die GS besitzt eine hohe Substrataffinität (K_m -Wert ~ 200 μM) und überträgt Ammonium unter ATP-Verbrauch auf L-Glutamat. Das entstehende L-Glutamin kann von der Glutamatsynthase (GOGAT) mit α -Ketoglutarat in einer $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -abhängigen Reaktion zu L-Glutamat umgesetzt werden. Im Folgenden sind die Nettogleichungen beider Wege zur Ammoniumassimilation in *C. glutamicum* dargestellt.

A: Stickstoff-Überschuss:



B: Stickstoff-Mangel:



Der GS/GOGAT-Weg ist durch den Verbrauch von je 1 mol ATP und Reduktionsäquivalent pro mol assimiliertem Ammonium energieaufwendiger und unterliegt sowohl auf Aktivitäts-,

als auch auf Expressionsebene einer strikten Regulation, um ihn bei Stickstoff-Überschuss zu Gunsten des GDH-Weges zu unterdrücken. Auf diese Weise vermeidet die Zelle unnötigen Energieverbrauch.

Zusätzlich zur erläuterten Regulation von assimilatorischen Enzymen auf Aktivitätsebene konnte in *C. glutamicum* ein globales Netzwerk zur Regulation auf Transkriptionsebene entschlüsselt werden, das AmtR-Regulon (Beckers, 2004). AmtR ist das globale Repressorprotein der Stickstoffkontrolle. Unter Stickstoffüberschussbedingungen reprimiert es die Transkription von insgesamt 37 Genen, in dem es an ein konserviertes Bindemotiv in ihrem Promotorbereich bindet. Funktionell sind die Genprodukte der meisten Komponenten des AmtR-Regulons Transportproteine und Enzyme. 17 dieser Gene kodieren für Transportproteine alternativer Stickstoffquellen: die Expression der Gene der Ammoniumtransporter (*amtA* und *amtB*; Jakoby *et al.*, 2000), des Glutamattransporters (*gluABCD*, Kronemeyer *et al.*, 1995), des Harnstofftransporters (*urtABCDE*, Beckers *et al.*, 2004), der Creatininpermease (*crnT*, Bendt *et al.*, 2004), eines putativen Oligopeptidaufnahmesystems (NCgl1915-1918) und eines putativen Vanillatransporters (*vanK* = NCgl2302) wird reguliert. Der alleinige Transport dieser Substanzen reicht bei einer Unterversorgung nicht aus, um die Stickstoffversorgung zu gewährleisten. Eine gleichzeitige Regulation der korrespondierenden Gene assimilatorischer Enzyme und der Signaltransduktionskaskade ist ebenfalls erforderlich. Daher stehen weitere 13 Gene dieser Gruppe ebenfalls unter AmtR-Kontrolle. Dazu zählen die Gene der GS und der GOGAT zur Glutamat- und Ammoniumassimilation (*glnA* bzw. *gltBD*, Nolden *et al.*, 2001a; Beckers *et al.*, 2001), der Urease zur Verwertung von Harnstoff (*ureABCEFGD*, Nolden *et al.*, 2000), der Creatinindeaminase zur Spaltung von Creatinin zu Methylhydantoin und Ammonium (*codA*, Bendt *et al.*, 2004) und der beiden Proteine der Signalweiterleitung GlnD und GlnK (*glnD* bzw. *glnK*, Nolden *et al.*, 2001b; Strösser *et al.*, 2004). Fünf weitere Gene, namentlich NCgl1099 (putative Hydrolase), NCgl1100 (nicht-ribosomales Peptidsynthetase-Modul), NCgl1362 (*pyrG*, CTP-Synthase), NCgl2300 (*vanA*, putative Oxygenaseuntereinheit der Vanillat-o-demethylase) und NCgl2301 (*vanB*, putative Vanillat-o-demethylase), konnten der Stickstoffkontrolle zugeordnet werden. Viele der AmtR-regulierten Gene sind im Genom in *clustern* angeordnet. Dass diese Gencluster in einem Operon organisiert sind, konnte für *amtB-glnK-glnD*, *amt-ocd-soxA* (Nolden, 2001), *urtABCDE*, *ureABCEFGD*, *gluABCD*, NCgl1915-1918 und *vanA-vanB-vanK* nachgewiesen werden (Beckers, 2004).

Eine schematische Übersicht des erst kürzlich aufgeklärten AmtR-Regulons von *C. glutamicum* ist aus Abbildung 1.2 ersichtlich. Die Darstellung der bisher identifizierten AmtR-kontrollierten Gene ist durch ein Modell zur Funktion der Stickstoffkontrolle ergänzt, in dem auf mehreren Ebenen eine Signalweiterleitung über Protein-Protein-Interaktionen angenommen wird.

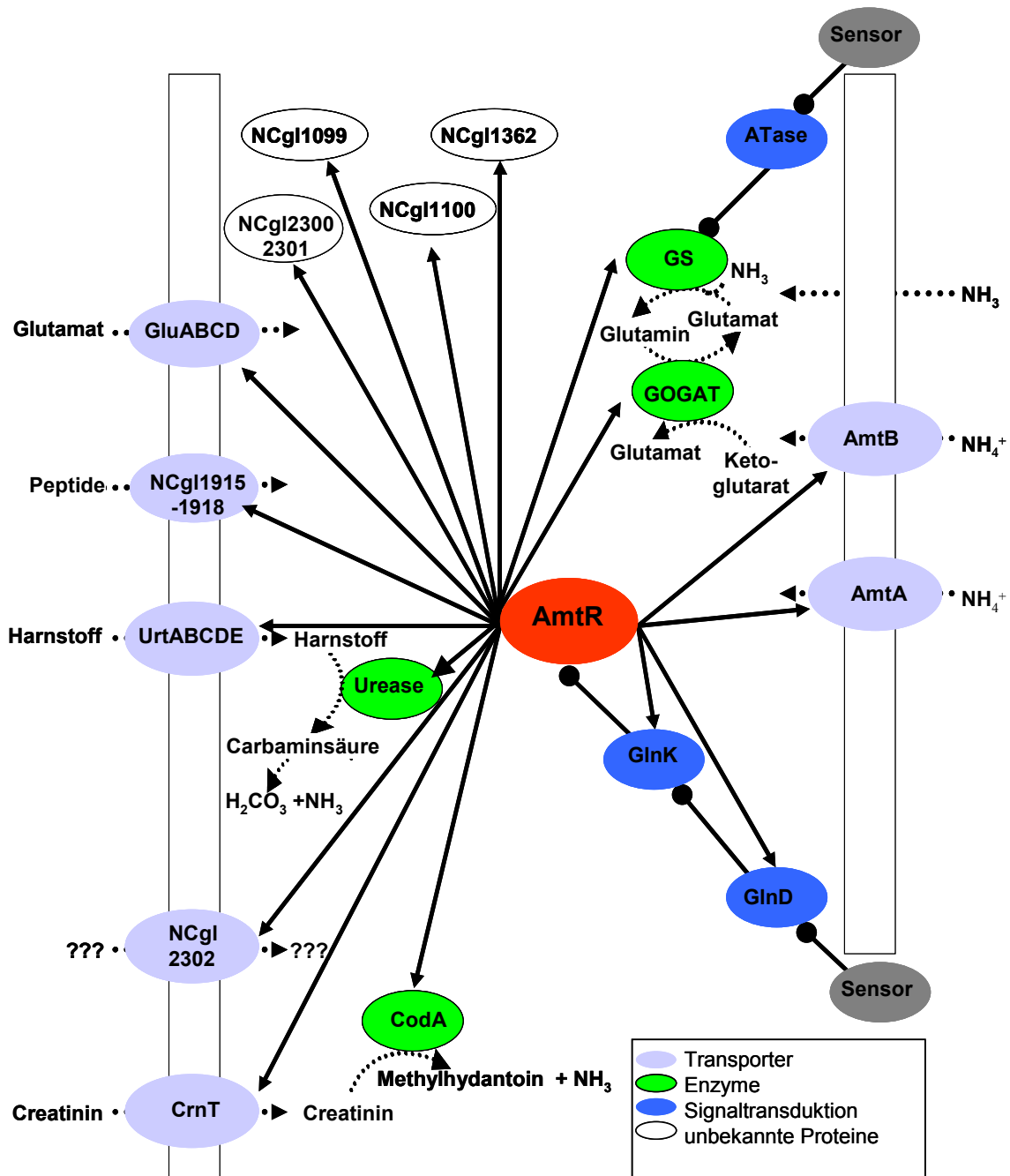


Abbildung 1.2: Aktuelles Modell der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*. Der AmtR-Repressor stellt den einzigen bekannten Regulator dar, so dass eine globale Expressionssteuerung von Genen mit Relevanz für die Stickstoffversorgung der Zelle wahrscheinlich ist. Der Stickstoffstatus der Zelle wird mit Hilfe noch unbekannter Sensor(en) gemessen. Die Information wird entweder direkt oder über weitere Proteine an das GlnD-Protein und die Adenylyltransferase (ATase) weitergeleitet. GlnD modifiziert GlnK, welches anschließend vermutlich in Wechselwirkung mit AmtR tritt. Unter N-Mangel gibt AmtR die Transkription der regulierten Gene frei. Die GS wird neben der Transkriptionsregulation auch noch über eine Modifikation durch die ATase reguliert. Deren Regulation der ATase ist bisher noch unbekannt (Quelle: Beckers, 2004).

—————> Expressionsregulation durch AmtR ————●——— Protein-Protein-Interaktion
> Aufnahme, Assimilation oder Metabolisierung von Substraten

Der Stickstoffstatus der Zelle wird durch einen oder mehrere übergeordnete, noch unbekannte(n) Sensor(en) detektiert. Die Informationsweiterleitung erfolgt entweder direkt oder über Zwischenschritte an die Proteine ATase und GlnD. Liegt ein Mangel des Substrates Stickstoff vor, kommt es zum einen zur Aktivierung der ATase. Diese versetzt wiederum durch Deadenylylierung die GS in ihren aktiven Zustand und macht somit den hochaffinen GS/GOGAT-Weg zur Glutamat- und Ammoniumassimilation möglich (siehe oben). Zum anderen erhält das GlnD-Protein das Signal zur Adenylylierung von GlnK, dem zentralen Signaltransduktionsprotein der Stickstoffkontrolle. Dessen reversible Modifikation ermöglicht die noch unbestätigte Wechselwirkung mit AmtR, welches nun die Bindestellen im Promotorbereich der kontrollierten Operone und Gene verlässt und ihre Transkription freigibt. Die einer Mangelsituation unterworfenen Zelle besitzt damit einen Grundstock an Proteinen für die effektive Aufnahme und Assimilation der Stickstoffquellen Ammonium, Harnstoff, Glutamat und Creatinin. Glutamin kann über einen biochemisch charakterisierten, Na⁺-gekoppelten Symporter aufgenommen werden, über dessen Regulation zur Zeit keine Informationen vorliegen (Siewe *et al.*, 1995). Die Existenz von Transportern für die weiteren Stickstoffquellen Arginin, Allantoin und Ornithin ist zwar wahrscheinlich, jedoch konnten bisher keine Anhaltspunkte für ihre Existenz gefunden werden.

Die Suche nach dem Sensor bzw. den Sensoren des Stickstoffstatus bei *C. glutamicum* hat in der aktuellen Forschung große Bedeutung. Für andere Mikroorganismen wurde eine Sensorik des Stickstoffstatus über interne stickstoffhaltige Metabolite beschrieben (z.B. Ikeda *et al.*, 1996; Schmitz, 2000). In *E. coli* konnte beispielsweise eine essentielle Rolle von α -Ketoglutarat und L-Glutamin nachgewiesen werden. Das Verhältnis dieser beiden Komponenten zueinander reguliert einerseits die Expression stickstoffabhängiger Gene und andererseits den Adenylylierungsstatus und damit die Aktivität der GS. Dabei wirken α -Ketoglutarat und L-Glutamin antagonistisch. Die intrazelluläre L-Glutaminkonzentration stellt den wesentlichen Effektor der Regulation bei *E. coli* dar und hat einen direkten Einfluss auf die Aktivität zweier wichtiger Enzyme der Stickstoffkontrolle, der Uridylyltransferase und der Adenylyltransferase. Dagegen hat die intrazelluläre α -Ketoglutaratkonzentration keine entscheidende Auswirkung auf diese Proteine, sondern bestimmt die Konformation und Aktivität des Signaltransduktionsproteins GlnB (Überblick, siehe Merrick und Edwards, 1995; Arcondéguy *et al.*, 2001; Reitzer, 2003). Weiterhin wirkt AmtB, einer der beiden Ammoniumtransporter aus *E. coli*, als Sensor der extrazellulären Ammoniumkonzentration (Javelle *et al.*, 2004). Die Quantifizierung interner Metabolite bei *C. glutamicum* führte zum Ausschluss der Beteiligung der stickstoffhaltigen Metabolite L-Glutamin und L-Glutamat. Des Weiteren kommt die α -Ketoglutaratmenge als alleinige Komponente nicht für diesen Zweck in Frage, eine Co-Funktion bei der Signalgebung kann aber noch nicht ausgeschlossen werden (T. Müller, persönliche Mitteilung). Als in die Sensorik involvierte Proteine konnten sowohl

GlnK, als auch GlnD bereits ausgeschlossen werden (Nolden, 2001). Die Identifizierung ihrer Interaktionspartner würde wahrscheinlich entscheidend zum Verständnis dieser Grauzone beitragen.

Die detaillierte Kenntnis des Regulationsnetzwerkes Stickstoffkontrolle und seiner indirekten Effekte auf den Zellstoffwechsel hat große Bedeutung für die weitere Prozessentwicklung mit *C. glutamicum*. Die relevantesten Faktoren mit Einfluss auf den Produktionsprozess von beispielsweise L-Glutamat sind die Gelöst-Sauerstoffkonzentration, der pH-Wert und die Ammoniumkonzentration. Eine ausreichende Menge an Ammonium ist zwar essenziell für die Aminosäurebildung, hohe Konzentrationen wirken sich jedoch negativ auf Wachstum und Produktivität der Mikroorganismen aus. Daher wird in den aktuellen Produktionsprozessen neben der Kohlenstoffquelle auch Ammonium limitierend zugefüttert (Eggeling *et al.*, 2001b).

Das Signaltransduktionsprotein GlnK spielt auch eine wichtige Rolle, wenn die Versorgung der Zelle mit Stickstoff nach einer Mangelsituation durch externen Eintrag wieder gewährleistet ist. In diesem Fall ist die Synthese von Transportern alternativer Stickstoffquellen und hoch-affinen Enzymen zur Metabolisierung und Assimilation überflüssig und die Transkription AmtR-kontrollierter Gene könnte eingestellt werden. Strösser *et al.* (2004) haben ein Modell zur Beschreibung der Funktion von GlnK entwickelt. Sie postulieren eine komplexe Regulation der GlnK-Aktivität über die Modifizierung bzw. Demodifizierung des Proteins (siehe Abbildung 1.3). Sie konnten zeigen, dass GlnD aus *C. glutamicum* nicht nur die Adenylylierung, sondern auch die Deadenylylierung des GlnK-Proteins katalysiert. Unmodifiziertes GlnK ist vermutlich nicht mehr in der Lage, die putative Interaktion mit dem Repressorprotein AmtR einzugehen. AmtR kann dann wieder an die Promotoren der Operone und Gene seines Regulons binden, so dass deren Transkription unterbunden wird.

Zusätzlich zur geschilderten Demodifizierung konnte ein schneller proteolytischer Abbau von GlnK nachgewiesen werden. In Folge eines Stickstoffpulses verschiebt sich die Lokalisation des deadenylylierten GlnK vom Cytoplasma zur Membran. Diese geschieht nur in Anwesenheit des Ammoniumtransporters AmtB, so dass eine Interaktion zwischen beiden Proteinen vorausgesetzt wird. Die Membranbindung lässt eine sequenzielle Proteolyse des GlnK-Proteins zu, in welche neben der membrangebundenen FtsH-Protease auch die ClpCP- und ClpXP-Proteasekomplexe involviert sind. Auf diese Weise kann die Signalkaskade der Stickstoffkontrolle bei Bedarf schnell und gezielt abgeschaltet werden.

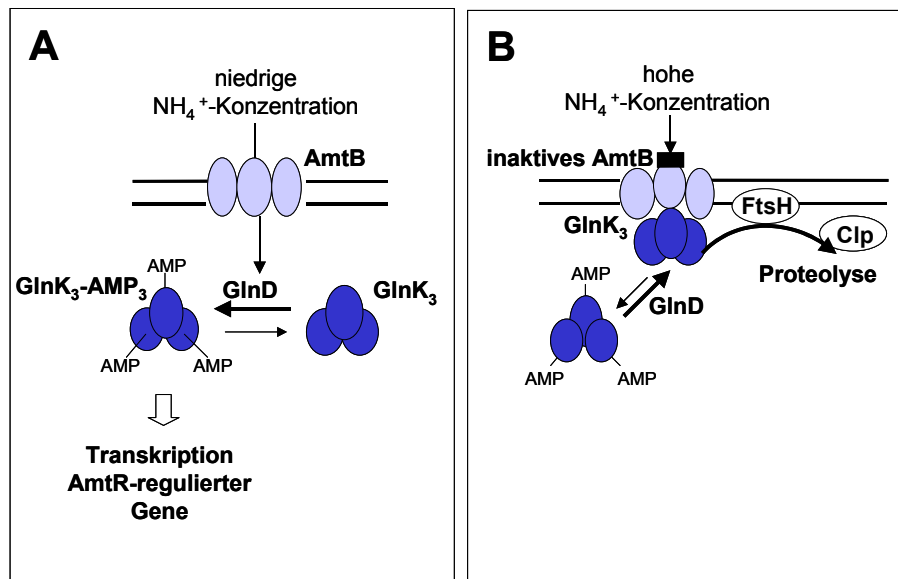


Abbildung 1.3: Modell der Funktion des Signaltransduktionsproteins GlnK. (A) GlnK wird bei Eintreten eines Stickstoff-Mangels im Cytoplasma synthetisiert. Das Protein formt Homotrimer, welche unmittelbar vom GlnD-Protein adenyliert werden. GlnK₃-AMP₃ interagiert vermutlich mit dem globalen Repressorprotein AmtR, welches dann die Transkription stickstoff-abhängiger Gene freigibt. **(B)** Ein plötzlicher Ammoniumpuls hat die sofortige Deadenylierung von GlnK durch das GlnD-Protein zur Folge. Unmodifizierte Trimere können nicht mehr an AmtR binden, so dass die oben erläuterte Transkription gestoppt wird. Statt dessen erfolgt wahrscheinlich die Bindung an AmtB, wodurch einerseits die Transportaktivität reduziert wird und andererseits die Proteolyse des Signaltransduktionsproteins durch die FtsH-Protease und den Clp-Proteasekomplex eingeleitet wird (Quelle: Strösser *et al.*, 2004).

Etwa 2-5% des GlnK-Proteins scheint vor dem Abbau geschützt zu sein, es verbleibt an der Membran. Daher werden der putativen Interaktion zwischen deadenyliertem GlnK und AmtB weitere Funktionen zugeschrieben (Strösser *et al.*, 2004). Denkbar wäre eine Aktivitätsregulation des AmtB-Transporters: die Bindung von GlnK könnte zum Transportstopp bei verbesserter Stickstoffversorgung beitragen. Einem solchen Mechanismus unterliegt beispielsweise das AmtB-Protein in *E. coli* (Coutts *et al.*, 2002). Für eine sensorische Funktion von AmtB analog zur Situation in *E. coli* (Coutts *et al.*, 2002; Javelle *et al.*, 2004) konnte bis dato keine Hinweise gefunden werden.

Zielsetzung dieser Arbeit

C. glutamicum besitzt eine Stickstoffkontrolle, deren Mechanismus sich deutlich von der in anderen Mikroorganismen unterscheidet. Bisher konnte das Regulon des *Master*-Regulatorproteins AmtR vollständig charakterisiert werden. Neben dem direkten sollte als zentraler Schwerpunkt dieser Arbeit auch der indirekte Einfluss einer Stickstoff-Mangelsituation entschlüsselt werden. Die Kombination von globaler Transkriptom- und Proteomanalyse über DNA-*Microarrays* und 2-D-Gelelektrophorese sollte einen möglichst umfassenden Überblick über alle Gene und Proteine geben, deren Expression und/oder Synthese sich spezifisch unter Stickstoffmangel ändert. Zwei verschiedene Kultivierungstechniken sollten dazu eingesetzt werden. Einerseits kann eine Mangelsituation einfach als Stickstoffhunger durch abrupten Entzug der Substratquelle im Kleinkulturmaßstab des Schüttelkolben realisiert werden. Andererseits kann im Fermenter die Stickstoffquelle langsam zudosiert werden, so dass eine Stickstoff-Limitierungssituation vorliegt. Ein solches kontinuierliches Fermentationssystem musste für diese Zwecke etabliert werden.

Ein weiteres Ziel bildete die Auffindung potenzieller Protein-Protein-Interaktionen im Rahmen der Stickstoff-Kontrolle.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit für Klonierungen eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 2.1 aufgelistet, die verwendeten *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme sind Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften. Abkürzungen: Ap^R = Ampicillinresistenz, Cm^R = Chloramphenicolresistenz, Km^R = Kanamycinresistenz. Die Konstruktion der Plasmide ist in Kapitel 7.1 des Anhangs detailliert beschrieben.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBS1479	Hefeexpressionsvektor, Ap ^R , ori <i>colE1</i> , <i>trp1</i> aus <i>Kluyveromyces lactis</i> , 1x TAPtag	Cellzome, Heidelberg, D
pDRIVE	Ap ^R , Km ^R , A-T Insertionsvektor	Qiagen, Hilden, D
pDRIVE <i>amtR</i>	pDRIVE mit <i>amtR</i> -Gen	diese Arbeit
pDRIVE <i>glnK</i>	pDRIVE mit <i>glnK</i> -Gen	diese Arbeit
pDRIVE <i>eno</i>	pDRIVE mit <i>eno</i> -Gen	diese Arbeit
pGEM3z16 <i>SrRNA</i>	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus 16 <i>SrRNA</i> -Gen	Nolden, 2001
pGEM3z <i>amt</i>	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>amt</i> -Gen	Nolden, 2001
pGEM3z <i>amtB</i>	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>amtB</i> -Gen	Nolden, 2001
pQE70	ptac, Ap ^R , ori ColE1, 6x His	Qiagen, Hilden, D
pQE <i>glnK</i>	pQE70 mit <i>glnK</i> -Gen zur Überexpression von GlnK-His	diese Arbeit
pXMJ19	ptac, <i>lacI^q</i> , Cm ^R	Jakoby <i>et al.</i> , 1999a
pXMJ19-TAP	pXMJ19 mit TAP-Fragment aus pBS1479	diese Arbeit
pXMJ19- <i>amtR</i> -TAP	pXMJ19TAP mit <i>amtR</i> -Gen zur Expression von AmtR-TAP	diese Arbeit
pXMJ19- <i>glnK</i> -TAP	pXMJ19TAP mit <i>glnK</i> -Gen zur Expression von GlnK-TAP	diese Arbeit
pXMJ19- <i>eno</i> -TAP	pXMJ19TAP mit <i>eno</i> -Gen zur Expression von Enolase-TAP	diese Arbeit

Tabelle 2.2: Verwendete *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme. Abkürzungen: Ap^R = Ampicillinresistenz, Cm^R =Chloramphenicolresistenz. Die Konstruktion der Stämme ist in Kapitel 7.2 des Anhangs detailliert beschrieben.

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α <i>mcr</i>	<i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 ϕ80ΔlacZ ΔM15<i>mcrA</i> Δ(<i>mmr hsdRMS mcrBC</i>)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
pQEglnK	Ap ^R	diese Arbeit
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
RES167	Restriktionsdefiziente Mutante von ATCC13032 Δ (<i>cgIIIM-cgIIR-cgIIR</i>)	Tauch <i>et al.</i> , 2002a
pXMJ19- <i>glnK</i> -TAP	Cm ^R	diese Arbeit
pXMJ19- <i>amtR</i> -TAP	Cm ^R	diese Arbeit
pXMJ19- <i>eno</i> -TAP	Cm ^R	diese Arbeit

2.2 Kulturmedien

Die Zusammensetzung der eingesetzten Nährmedien ist in Tabelle 2.3 angegeben. *E. coli*-Stämme wurden standardmäßig in Luria Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) kultiviert. Als Komplexmedium für *C. glutamicum* diente *Brain Heart Infusion* (BHI-) Medium (Difco, Detroit, USA). Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar-Agar (ICN, Aurora, USA) zugesetzt. Als definiertes Minimalmedium für die globale Analyse von Stickstoffhunger und -limitierung kamen MM1- bzw. MM1oN-Medium (Kase und Nakayama, 1972) bzw. modifiziertes MM1-Medium (Fermentationsmedium) zum Einsatz, für Protein-Interaktionsstudien wurde CgC- bzw. CgCoN-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993) verwendet.

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker bei *E. coli* und *C. glutamicum* wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: 50 μ g/ml Carbenicillin, 30 μ g/ml Chloramphenicol, 25 μ g/ml Kanamycin. Nach der Elektroporation wurden BHI-Agarplatten mit nur 50% der angegebenen Antibiotikumkonzentrationen verwendet. Nach der Bildung sichtbarer Kolonien erfolgte deren Überimpfung und Kultivierung auf BHI-Agarplatten mit den oben angegebenen Konzentrationen.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung [pro Liter]
LB	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl
CgCoN	Basismedium: 42 g MOPS, 0,5 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g K ₂ HPO ₄ , pH _{NaOH} = 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 1 mM CaCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 200 µg Biotin, 1 mL Spurensalze, 222 mM Glucose.
CgC	CgCoN mit 20 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g Harnstoff
MM1oN	Basismedium: 2 g K ₂ HPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ , pH _{NaOH} = 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 1 mM CaCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 200 µg Biotin, 1 mL Spurensalze, 222 mM Glucose.
MM1	MM1oN mit 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g Harnstoff
Fermentationsmedium	Basismedium: 2 g K ₂ HPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ , 2,75 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH _{NaOH} = 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 1 mM CaCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 200 µg Biotin, 1 mL Spurensalze, 222 mM Glucose.
Spurensalze	28,5 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O, 16,5 g MnSO ₄ x H ₂ O, 6,4 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 764 mg CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 128 mg CoCl ₂ x 6 H ₂ O, 44 mg NiCl ₂ x 6 H ₂ O, 64 mg Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O, 48 mg H ₃ BO ₃ , 50 mg SrCl ₂ , 50 mg BaCl ₂ x 2 H ₂ O, 28 mg KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O, pH _{H₂SO₄} = 1. Sterilisation durch Filtration.

2.3 Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Kultivierung im Schüttelkolben

E. coli-Stämme wurden bei 37°C und *C. glutamicum*-Stämme bei 30°C angezogen. Die Schüttelfrequenz betrug 125 rpm.

Um die Reproduzierbarkeit der Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten, wurde zur Untersuchung der Effekte von Stickstoff-Mangelbedingungen bei *C. glutamicum* ein standardisiertes Animpfverfahren verwendet. Dazu wurden 20 ml BHI-Medium mit Zellen einer Stammkultur beimpft und 7-8 h unter Schütteln inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 100 ml Minimalmedium auf eine OD_{600nm} = 0,2 - 0,5 angeimpft und über Nacht geschüttelt. Dadurch konnte eine optimale Anpassung der Zellen an das Minimalmedium erzielt werden. Die Übernachtskultur diente zum Animpfen von zweimal je 100 ml frischem Minimalmedium auf eine OD_{600nm} von 0,5 - 1,0. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} = 4,0 - 6,0) inkubiert. Zur Induktion von Stickstoffmangel wurden die Zellen pelletiert (10 min, 30°C, 3.200xg). Zum einen wurden die Zellen in vorgewärmtem Minimalmedium (+N-Kontrolle), zum anderen in vorgewärmtem Minimalmedium ohne Stickstoffquelle (oN) resuspendiert und für eine Stunde inkubiert. Für anschließende Proteingewinnung wurden die Zellen zur Gänze unter Kühlung auf 4°C geerntet, pelletiert und direkt zur Proteingewinnung verwendet oder bei -80°C verwahrt. Zur Gewinnung von RNA wurde mit 2 ml-Aliquots genauso verfahren.

2.3.2 Kultivierung im *Respiration Activity Monitoring System* (RAMOS)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die Versuche zum Projekt „Globale Analyse von Stickstoffhunger“ im Schikane-Schüttelkolben durchgeführt und mit den Fermentationen des Projektes „Globale Analyse einer Stickstofflimitierung“ verglichen werden. Da im Schüttelkolben je nach Art der Kultivierung die Gefahr einer Sauerstofflimitierung besteht, sollte eine solche für die gewählten Versuchsparameter ausgeschlossen werden. Eine informative Größe ist hier die Sauerstofftransferrate (OTR), welche entscheidend zur Charakterisierung eines aeroben Bioprozesses beiträgt. Die Aufnahme dieser Größe als wichtigem Standard-Versuchsparameter war lange auf Fermentationen in gerührten Bioreaktoren beschränkt und in kleinerem Maßstab, wie z.B. Schüttelkolben, nicht möglich. Mittlerweile erlaubt das *Respiration Activity Monitoring System* (RAMOS, AC Biotec, Jülich, D) die *online*-Messung des Sauerstoffpartialdrucks in Schüttelkolben.

2.3.2.1 Aufbau im RAMOS

Als Reaktionsgefäße dienen Erlenmeyerkolben. Sie sind am Reaktorboden unverändert, weisen im oberen Teil jedoch Modifikationen auf: am Kopf des Kolbens ist die Anbringung eines mit einer gaspermeablen Membran versehenen Schraubverschlusses möglich. Auf diesen sind als Messwertgeber Sauerstoffsonden (Maxtec, Salt Lake City, USA) gasdicht aufschraubbar. Seitlich am Kolben befinden sich verschraubbare Anschlüsse für Zu- und Abluft, sowie eine Dosieröffnung. Zu- und Abluftstrecke können über Ventile gasdicht verschlossen werden. Aus Abbildung 2.1 ist der Aufbau der Messanlage ersichtlich.

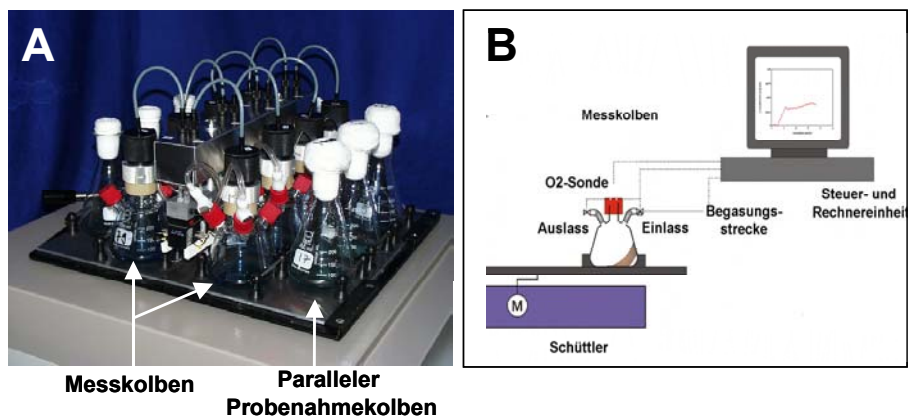


Abbildung 2.1: Aufbau der RAMOS-Messanlage. Der vollständige Aufbau der Anlage mit Mess- und parallelen Probenahme Kolben ist im Foto (A) und in der schematischen Zeichnung (B) gezeigt.

Die Kolben sind auf einen Tischschüttler (Kühner AG, Birsfelden, CH) montiert. Als Zuluft wird Druckluft verwendet, der Gasvolumenstrom beträgt 0,6 l/h.

Der geschilderte Aufbau gestattet die kontinuierliche Aufnahme sich wiederholender Messzyklen. Ein solcher besteht aus einer Spül- und einer Messphase. In der Spülphase sind die Ventile von Zu- und Abluft geöffnet, so dass der Reaktionsraum mit Luft durchspült wird und die O₂-Versorgung des Organismus für die Dauer eines Zyklus gewährleistet ist. Der Verschluss von Ein- und Auslassventil leitet die Messphase ein. Die andauernde Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen verursacht im Reaktionsraum einen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks, welcher über die angebrachten Sauerstoffsonden gemessen und rechnergesteuert in die zugehörige OTR umgerechnet wird. Schließlich öffnen die Ventile wieder und die nächste Spülphase beginnt.

An Hand des Messsignals kann die Sauerstofftransferrate OTR mit Gleichung 2.1 berechnet werden. Die zusätzliche Registrierung des Gesamtdrucks im System über eingebaute Drucksensoren liefert über mehrere Berechnungsschritte die Kohlenstoffdioxidtransferrate (CTR), welche als weiterer Parameter zur Interpretation der Daten genutzt werden kann. Durch Bildung des Quotienten dieser beiden Größen (CTR/OTR) kann der Respirationsquotient RQ berechnet werden. Nähere Angaben zu Aufbau und Funktionsweise der Messanlage sind in der Literatur zu finden (Anderlei und Büchs, 1999; 2001).

$$OTR = \frac{n_{O_2}}{V_L \cdot t} = \frac{\Delta p_{O_2}}{\Delta t} \cdot \frac{V_G}{R \cdot T \cdot V_L} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

mit n_{O_2} = Stoffmenge an O₂ [mol], **OTR** = Sauerstofftransferrate [mol/(l·h)],
 p_{O_2} = O₂-Partialdruck [bar], **T** = Temperatur [K], **t** = Zeit [h], V_L = Flüssigkeitsvolumen im Kolben [l], V_G = Gasvolumen im Kolben [l]

2.3.2.2 Vorbereitung und Versuchsdurchführung im RAMOS

Nach dem Autoklavieren wurden die Kolben zur Kalibrierung der Sauerstoffsonden auf die Messanlage montiert. Die Nullkalibrierung erfolgte mit N₂, die Luftkalibrierung mit Druckluft. Im Anschluss daran wurden die Kolben auf Dichtigkeit untersucht. Sie war gegeben, wenn der Gesamtdruck im Gasraum des Kolbens bei geschlossenen Ventilen konstant blieb.

Die Kultivierung erfolgte nach dem unter Kap. 2.3.1 beschriebenen Schema. Das Hauptkulturmedium wurde steril vorbereitet, auf eine OD_{600nm} von ca. 1,0 angeimpft und à 50 ml auf die 250 ml-Schikane-Messkolben und die parallelen 250 ml-Schikane-Probenahme kolben verteilt. Nach dem Anschluss der Kolben an die Messanlage war eine nochmalige Kontrolle auf Dichtigkeit unerlässlich. Vor Versuchsstart mussten die variablen Versuchsparameter (1) Temperatur T = 30°C, (2) aktueller Umgebungsdruck, (3) Füllvolumen V_L = 50 ml, (4) erwarteter RQ = 1, (5) Volumenstrom des Gases V_G = 0,6 l/h und (6) Dauer der Mess- und Spülphase = 10 bzw. 20 min in das rechnergesteuerte Messprogramm eingegeben werden.

Probenahmen während des Versuches waren nur durch die parallel mitgeführten Schüttelkolben möglich. Die dazu genau wie die Messkolben vorbereiteten Erlenmeyerkolben unterlagen denselben Kulturbedingungen. Als Probe diente jeweils das Medium eines Parallelkolbens, an Hand dessen die externen Parameter optische Dichte und pH-Wert bestimmt wurden.

2.3.3 Kultivierung im Fermenter

Die Analyse einer Stickstofflimitierung erforderte die Etablierung einer alternativen, komplizierteren Kultivierungstechnik, da die N-Quelle für diese Zwecke nicht wie im Schüttelkolben abrupt entzogen werden kann. Sie muss kontinuierlich auf einem gleichbleibend niedrigen Level zur Verfügung gestellt werden. Der effizienteste Weg, um für die Grundlagenforschung eine dauerhafte Ammoniumlimitierung zu untersuchen, ist die kontinuierliche Prozessführung im Fermenter. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes offenes System. Einer im Fermenter wachsenden Kultur wird ein konstanter Volumenstrom frisches Medium zugeführt und parallel ein gleich großer Volumenstrom Kulturbrühe abgezogen. Der auf das Flüssigvolumen des Fermenters bezogene Volumenstrom ist die Durchflussrate D . Da die Kultur ständig mit frischem Medium versorgt wird, passt sie langfristig ihr Wachstum der Menge an zugefüttertem Substrat an: der Vorrat eines der zugefütterten Nährstoffe wird vor allen anderen verbraucht, so dass eine Mangelsituation bezüglich dieser Komponente eintritt. Das Wachstumsverhalten ist auf Grund dessen durch Nährstofflimitation festgelegt und erreicht ein sogenanntes stationäres Fließgleichgewicht. Hier sind Substrat-, Produkt- und Biomassekonzentrationen unabhängig von der Fermentationsdauer. Da zudem die Wachstumsrate μ der gewählten Durchflussrate D entspricht und damit kontrollierbar ist, kann eine hohe Reproduzierbarkeit der Proben gewährleistet werden. *C. glutamicum*-Zellen aus solch stationären Umgebungsbedingungen befinden sich in einem definierten metabolischen Zustand und eignen sich daher ideal für moderne globale Analysetechniken. Kontinuierliche Kulturen mit *C. glutamicum*-Stämmen dienten bereits der Analyse von osmotischem Stress unter Einwirkung verschiedener Substratlimitierungen (Guillouet und Engasser, 1995; 1996), der Verbesserung der L-Lysin-Produktion (Lee *et al.*, 1998) und der Untersuchung der temperaturabhängigen L-Glutamat-Produktion (Uy *et al.*, 2003).

Der Reaktor wurde mit der Standardausstattung ausgerüstet und zusätzlich zwei mit Sterilkupplungen versehene Stutzen montiert, über die eine sterile Zudosierung von frischem Medium aus einer Substratvorlage und die Ernte von Kulturbrühe möglich war. Beide Prozesse konnten über externe Pumpen aufeinander abgestimmt werden, so dass eine konstante Durchflussrate einstellbar war. Der Fermentationsaufbau ist schematisch in Abb. 2.2 dargestellt. Zur Kultivierung im gerührten Bioreaktor dienten 3 l-Fermenter des Typs

Biostat B (B.Braun Biotech, Melsungen, D) mit einem Füllvolumen von 1,3 l. Die Überwachungs- und Steuerungsmöglichkeiten in einem Fermentationssystem bezüglich pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck (pO_2) sind auf Grund der umfassenden *online*-Analytik mit denen im Schüttelkolben nicht zu vergleichen.

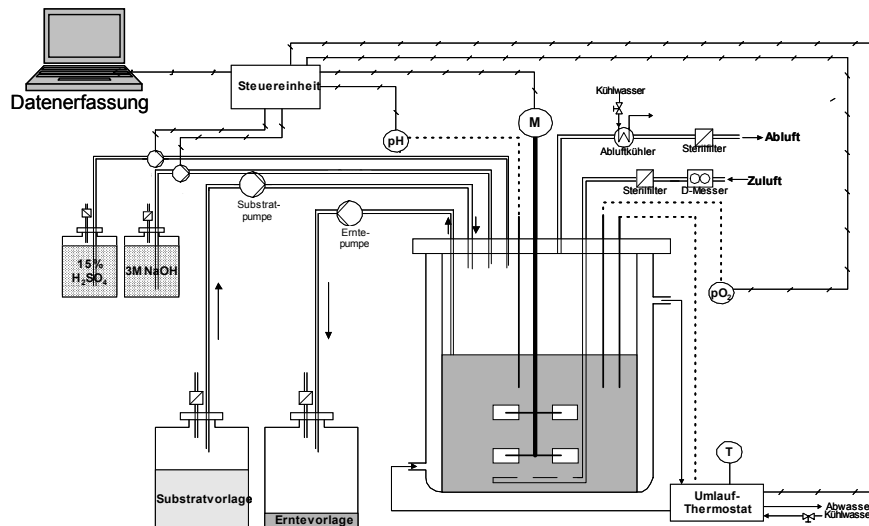


Abbildung 2.2: Anlagenschema für die kontinuierliche Fermentation. Abkürzungen: D-Messer = Durchflussmesser, M = Motor, pH = pH-Sonde, pO_2 = pO_2 -Sonde, T = Temperatur

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte wie für Schüttelkolbenexperimente bereits beschrieben, wobei ein Teil der Übernachtskultur als Inokulum für die Fermentation verwendet wurde. Sowohl das Fermentationsgrundmedium, als auch das Zufütterungsmedium basieren auf MM1-Medium nach Kase und Nakayama (1972), mussten aber für die Anwendung in dieser Arbeit modifiziert werden: die Konzentration an Stickstoffquellen im Grundmedium wurde durch das ersatzlose Weglassen von Harnstoff stark vermindert. Im Zufütterungsmedium war zusätzlich der $(NH_4)_2SO_4$ -Gehalt von 5 g/l auf 2,75 g/l reduziert. Die Glucosekonzentration im Zufütterungsmedium konnte auf 20 g/l halbiert werden. Über die gesamte Fermentationsdauer wurden *online* die Parameter Temperatur, pH-Wert, Rührerdrehzahl, Sauerstoffpartialdruck und die zugepumpten Volumina an Säure und Base überwacht und aufgezeichnet. Mindestens zweimal täglich erfolgte zudem die Probenahme zur externen Kontrolle des pH-Wertes, der NH_4 - und der Glucosekonzentration. Einmal pro Tag wurde der Zustand der Kultur mikroskopisch überprüft, um mögliche Veränderungen der Kulturzustandes und eventuelle Kontaminationen frühzeitig zu erkennen.

Mit einer $OD_{600nm} = 1,0$ wurde die Fermentation im diskontinuierlichen Modus (*batch*-Phase) gestartet. Die Temperatur betrug $30^\circ C$, der pH-Wert 7,0 (pH-Stellmittel: 3 M NaOH und 15% H_2SO_4) und die Begasungsrate wurde über die gesamte Versuchsdauer bei 1 vvm konstant gehalten. Die Rührerdrehzahl wurde im Verlauf der *batch*-Phase von 600 rpm auf einen

Endwert von 1000 rpm gesteigert. Bei einer $OD_{600nm} = 18,0$ erfolgte die Probenahme für Transkriptom- und Proteomanalyse. Für die Proteingewinnung wurden 30 ml Zellen unter Kühlung auf 4°C geerntet, pelletiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung von RNA wurde mit 2 ml-Aliquots gleichermaßen verfahren. Anschließend erfolgte die Umschaltung vom diskontinuierlichen in den kontinuierlichen Betrieb. Die erste Durchflussrate im kontinuierlichen Modus betrug 0,075 l/(l·h). Nach Erreichen des stabilen Fließgleichgewichtes wurden Proben für Transkriptom- und Proteomanalyse genommen. Danach konnte die Durchflussrate auf 0,15 l/(l·h) gesteigert werden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden zwei unabhängige Fermentationen nach diesem Schema durchgeführt. Eine Fermentation war über eine Durchflussrate von 0,15 l/(l·h) hinaus stabil in Betrieb, so dass auch Proben bei 0,2 l/(l·h), 0,25 l/(l·h) und 0,3 l/(l·h) genommen werden konnten.

2.3.4 Herstellung kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 α mcr wurden nach Inoue *et al.* (1990) angezüchtet, á 200 μ l aliquotiert, sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung elektrokompenter *C. glutamicum* RES167 wurde nach Liebl *et al.* (1989) verfahren. Aliquots á 100 μ l wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.5 Transformation kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut.

100 μ l chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 1,0 - 4,0 μ l Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C wurden die Zellen kurz auf Eis inkubiert und anschließend mit 800 μ l SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C kultiviert und dann auf LB-Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

50 μ l elektrokompente *C. glutamicum*-Zellen wurden mit 1,0 - 2,5 μ l Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlten Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm (Equibio, Ashford, GB) pipettiert. Hierauf wurden die Zellen in einem *Gene-Pulser* (Biorad, München, D) durch einen Elektropuls von 2,5 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 μ F Kapazität transformiert. Sofort nach dem Puls wurde 1,0 ml eiskaltes BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) zugegeben. Der Inhalt der Küvette wurde in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt. Einem Hitzeschock für 6 min bei 46°C folgte eine zweistündige Inkubation unter Schütteln bei 30°C. Die Zellen wurden anschließend auf BHI-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

2.4 DNA-Techniken

2.4.1 Plasmidpräparation

Die Anzucht von *E.coli*-Stämmen zwecks Plasmidpräparationen verlief über Nacht in 5 ml antibiotikumhaltigem LB-Medium. Aus diesen Zellen erfolgte die Plasmid-Mini-Präparation über das *NucleoSpin® Plasmid Quick Pure*-Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) gemäß der Herstellerangaben. Eine Kontrolle der Plasmide erfolgte über eine elektrophoretische Auftrennung in 0,8- bis 1,0 %-igen Agarosegelen (Kap. 2.4.6).

2.4.2 Präparation chromosomaler DNA

Zur Gewinnung der chromosomalen DNA dienten in 10 ml BHI-Medium angezogene *C. glutamicum*. Die Zellen wurden pelletiert (3.000xg, 4°C, 10 min) und in 200 µl H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert, für 2 min auf Eis gekühlt, 200 µl Chloroform appliziert, der Ansatz gemischt und zentrifugiert (20.000xg, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit weiteren 200 µl Chloroform versetzt. Durch erneutes Zentrifugieren (20.000xg, 4°C, 5 min) konnte der DNA-haltige Überstand gewonnen werden. Die Lagerung der 50 µl-Aliquots der DNA erfolgte bei -20°C.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der DNA-Amplifizierung. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 0,1 - 2,0 kb wurden mit dem *Taq PCR Master Mix*-Kit (Qiagen, Hilden, D) amplifiziert. Ein 20 µl-Reaktionsansatz enthielt 10 µl *PCR Master Mix*, je 0,1 µl *Primer*, 1 µl *Template* und 8,8 µl H₂O. Die *Primer* wurden von Sigma-ARK (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) oder Operon (Köln, D) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Als *Template* diente chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder eine 10 min bei 95°C gekochte Suspension von Zellen in Wasser. Die PCR wurde in einem *Mastercycler® personal* bzw. *Mastercycler® gradient* (Eppendorff, Hamburg, D) durchgeführt. Das Standard-PCR-Programm umfasste eine Initialdenaturierung (5 min, 95°C), 30 PCR-Zyklen (DENATURIEREN: 30 s, 94°C; ANNEALING: 30 s, *Annealing*-Temperatur der Primer; DNA-SYNTHESE: 1 min pro kb zu amplifizierendem Fragment, 72°C) und eine abschließende DNA-Elongation (10 min bei 72°C). Eine Kontrolle der PCR-Fragmente erfolgte über eine elektrophoretische Auftrennung in 1 %-igen Agarosegelen (Kap. 2.4.6).

2.4.4 Restriktion und Ligation von DNA

Bei der Restriktion von DNA kamen Restriktionsenzyme der Firmen NEB (Frankfurt a.M., D) und MBI Fermentas (St. Leon-Roth, D) nach Anweisung des Herstellers zum Einsatz. Alle Restriktionsansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese, durch Ethanol-fällung oder mit dem *NucleoSpin[®]Extract*-Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) gereinigt. Aus Agarosegelen wurde die DNA mit Hilfe des *NucleoSpin[®]Extract*-Kits isoliert. Die Ligation der DNA-Fragmente in den entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten Vektor wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *Rapid DNA Ligation*-Kit (MBI Fermentas) durchgeführt.

2.4.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Die Abtrennung von Proteinen aus DNA- und RNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe eines Ethanol-Acetat-Gemisches unter Zusatz des 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,3) und dem 3-fachen Volumen 100% Ethanol. Nach Inkubation über Nacht bei -20°C wurde die präzipitierte Nukleinsäure zentrifugiert (20.000xg, 30 min, 4°C), das Pellet zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Präzipitat konnte anschließend in einem geeignetem Volumen H_2O aufgenommen werden.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8-1,5% in 1x TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Die jeweiligen Proben wurden mit 4x *Gel loading buffer II* (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt, auf das Gel aufgetragen und mit einer Spannung von maximal 10 V/cm Gellänge aufgetrennt. Die Färbung der Nukleinsäure erfolgte in einem Ethidiumbromidbad und konnte durch einen *Image Master VDS* (Amersham Biosciences, Freiburg, D) detektiert und dokumentiert werden.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der *Taq FS BigDye-terminator cycle sequencing*-Methode auf einem *ABI Prism 377 DNA-Sequencer* (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) und wurde extern im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) in Auftrag gegeben. Dazu wurde Plasmid-DNA in 5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ mit 1 μl einer 1:10-Verdünnung des Sequenzierungsprimer versetzt und zur Analyse im ZMMK abgegeben.

2.5 RNA-Techniken

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurden alle RNA-Arbeiten unter sterilen Bedingungen und unter durchgehender Benutzung von Handschuhen durchgeführt. Soweit möglich waren alle Arbeitsmaterialien und Lösungen für 40 min bei 121°C autoklaviert.

2.5.1 Verwendete Puffer

10x Blocking-Reagenz: 10 g *Blocking-Reagenz* in 100 ml Maleinsäurepuffer

CSPD-Lösung: 1% CSPD-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim, D) in Detektionspuffer

Detektionspuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, $\text{pH}_{\text{NaOH}} = 9,0$

Hybridisierungslösung: 50 ml Formamid, 20 ml 10x *Blocking-Reagenz*, 25 ml 20x SSC, 1 ml 10% Na-Lauroylsarkosinat, 200 μl 10% SDS, ad 100 ml Wasser

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, $\text{pH}_{\text{NaOH}} = 7,5$

RNA-Gelladepuffer: 250 μl 100%-iges Formamid, 83 μl 37%-iges Formaldehyd, 50 μl 10x MOPS-Puffer, 10 μl 2,5% Bromphenolblau, 50 μl 100%-iges Glycerin, 1 μl 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung, 56 μl RNase-freies Wasser.

10x SSC-Puffer: 1,5 M NaCl, 0,15 M tri-Natriumcitrat, $\text{pH}_{\text{HCl}} = 7,0$

Dot-Blot-Waschpuffer 1: 2x SSC, 0,1% SDS

Dot-Blot-Waschpuffer 2: 0,2x SSC, 0,1% SDS

Dot-Blot-Waschpuffer 3: 0,3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer

2.5.2 Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*

Für alle Transkriptomanalysen wurden ca. 4×10^9 *C. glutamicum*-Zellen einer unter den gewünschten Bedingungen exponentiell wachsenden Kultur durch Zentrifugation (2 min, 4°C, 14.000xg) geerntet. Der Überstand wurde zügig abpipettiert, das Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C verwahrt. Das Zellpellet wurde in 700 μl RA1-Puffer (*NucleoSpin®RNA II-Kit*, Macherey-Nagel, Düren, D) resuspendiert und in Aufschlussgefäße mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2–0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch zweimaliges hochfrequentes Schütteln bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s im *FastPrep*-Gerät FP120 (QBiogene, Heidelberg, D). Eine Kühlung der RNA-Proben zwischen den Intervallen auf Eis verhinderte ein zu starke Erwärmung durch mechanische Beanspruchung. Zelltrümmer und nicht-aufgeschlossene Zellen wurden pelletiert (30 min, 4°C, 14.000xg). Die weitere Gesamt-RNA-Präparation erfolgte mit dem *NucleoSpin®RNA II-Kit* (Macherey-Nagel) gemäß der Herstellerangaben. Zur vollständigen Entfernung chromosomaler DNA wurde ein zweiter DNase-Verdau mit der DNase I (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

angeschlossen. Eine Kontroll-PCR diente zur Überprüfung, ob die RNA in Folge der zweifachen DNase-Behandlung DNA-frei war. Dazu wurden gut funktionierende Primer gewählt, mit denen kleine Fragmente von 400 - 500 bp generiert werden konnten. Durch Agarose-Gelelektrophorese in RNA-Gelladepuffer erfolgte die Qualitätskontrolle der RNA im Bezug auf unerwünschten Abbau.

2.5.3 RNA-Hybridisierungen (*Dot Blots*)

Die Transkription von AmtR-kontrollierten Genen wurde an Hand von *Dot-Blots* untersucht. 5 µg Gesamt-RNA pro Dot wurden in 10x SSC-Puffer verdünnt und mittels einer *Dot-Blot*-Apparatur (S & S Minifold I, Schleicher & Schüll, Dassel, D) unter langsamem Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBond™Nylon Membrane, Sigma, Taufkirchen, D) aufgetragen. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Fixierung der RNA durch UV-Bestrahlung im *Cross-Linker* (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg, D) bei der Einstellung "preset 0" und 125 mJ/cm² und die Blockierung der Membran in 1x *Blocking*-Reagenz. Zu diesem Zweck wurde die Membran 1 h bei 50°C in Hybridisierungslösung blockiert. Nach der Erwärmung auf 68°C folgte die Zugabe einer nach Nolden (2001) präparierten DIG-markierten RNA-Sonde und eine Übernacht-Hybridisierung. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min bei 20°C in *Dot-Blot*-Waschpuffer 1, dann zweimal 25 min bei 68°C in *Dot-Blot*-Waschpuffer 2 gewaschen und nach kurzer Inkubation bei 20°C in *Dot-Blot*-Waschpuffer 3 für 30 min bei 20°C in 20 ml 1x *Blocking*-Reagenz blockiert. Hierauf wurde 2 µl Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim, D) zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem dreimaligen Waschen in *Dot-Blot*-Waschpuffer 3 für je 20 min folgte die dreiminütige Inkubation in Detektionspuffer, die Benetzung mit CSPD-Lösung und das abschließende Einschweißen in Klarsichtfolie. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C konnten die Signale durch Belichten von Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR Film, Chalon-sur-Saône, F) detektiert werden.

2.5.4 DNA-*Microarrays*

Eine globale Transkriptomanalyse wurde mit Hilfe von *C. glutamicum*-DNA-*Microarrays* durchgeführt, welche vom Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld entwickelt und gemäß Hüser *et al.* (2003) produziert wurden. Ein Vergleich von zwei verschiedenen Transkriptomen ist über die kompetitive Hybridisierung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNAs möglich. Das Prozedere ist im Folgenden beschrieben.

2.5.4.1 cDNA-Synthese und Fluoreszenzmarkierung

Die DNA-freie, nicht durch Abbau geschädigte Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde nach Hüser *et al.* (2003) über eine indirekte Technik fluoreszenzmarkiert. Dazu mussten zunächst während einer reversen Transkription Aminoallyl-Nukleotide (aa-dUTP, Sigma, Taufkirchen, D) in die Transkripte eingebaut werden. Für einen 30 µl-Ansatz wurden 5 µg der Gesamt-RNA mit 2,5 µg 5'-Aminomodifizierten Hexameren vermischt und 10 min bei 70°C denaturiert. Die Nukleinsäuren wurden anschließend zwecks *Primerannealing* 5 min auf Eis abgekühlt, bevor die Zugabe von je 0,5 mM dNTPs, 0,8 mM aa-dUTP, 3 µl 100 mM DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, D), 300 U *SuperScript RNase H Reverse Transkriptase* (Invitrogen, Karlsruhe, D) und 6 µl *First-strand-Puffer* (Invitrogen) die reverse Transkription startete. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 42°C wurden weitere 200 U *SuperScript RNase H Reverse Transkriptase* zugegeben. Nach 1,5 h Reaktionszeit bei 42°C erfolgte die Zugabe von je 10 µl 0,5 mM EDTA und 1 M NaOH. Die reverse Transkription wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 70°C gestoppt und der Reaktionsansatz durch die Zugabe von 10 µl 1 M HCl neutralisiert. Die synthetisierten cDNAs wurden mit dem *MinElute PCR Purification*-Kit (Qiagen, Hilden, D) gereinigt und in destilliertem H₂O (pH = 8,0) eluiert. Der sofortigen Zugabe von 2 µl 1 M Natriumbicarbonat (pH = 9,0) folgte die Überführung der cDNA zu Aliquots von Cy3- oder Cy5-monofunktionellen NHS-Estern (Amersham Biosciences, Freiburg, D). Eine einstündige Inkubation im Dunkeln diente der Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an die Aminoallylgruppen. Nicht in Nukleinsäuren eingebaute NHS-Ester wurden an 4,5 µl Hydroxylamin (15 min im Dunkeln) gekoppelt und durch eine Reinigung mit dem *MinElute PCR Purification*-Kits aus dem System entfernt.

2.5.4.2 DNA-Microarray-Hybridisierung

Zur Prähybridisierung der DNA-Microarrays wurden diese 75 min in DIG Easy-Hyb Hybridisierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim, D) gelagert. Einem einminütigem Waschschrift in MilliQ-Wasser folgte ein kurzer Waschschrift (ca. 10 s) in 70% Ethanol und eine anschließende Zentrifugation der DNA-Microarrays (3 min, 185xg). Zur Vorbereitung der cDNAs war die Vermischung der zu vergleichenden Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben und deren Vakuumtrocknung erforderlich. Vor der Hybridisierung erfolgte die Resuspension in 70 µl Hybridisierungslösung und die Denaturierung der Nukleinsäuren für 5 min bei 65°C. 65 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 16 h bei 42°C. Danach wurde der Glasträger vorsichtig entfernt und der DNA-Microarray nach Hüser *et al.* (2003) gewaschen.

2.5.4.3 Signaldetektion und Auswertung

Nach der Zentrifugation (3 min, 185xg) im Anschluss an alle Waschschritte erfolgte die Signaldetektion mit einem *ScanArray 4000 Microarray Scanner* (Perkin-Elmer, Boston, USA), indem beide Fluoreszenzfarbstoffe getrennt voneinander angeregt und detektiert wurden. Die Bearbeitung der erhaltenen Bilddateien mit dem Programm *ImaGene* (Version 5.0, Biodiscovery, Los Angeles, USA) machte die Signal-Hintergrund-Zuordnung, die *Spot*-detektion und die Quantifizierung möglich. Im Anschluss daran wurde zur Normalisierung der Daten und zur statistischen Analyse via t-Test die *EMMA Microarray Datenanalyse-Software* (Version 1.2, Dondrup *et al.*, 2003) verwendet.

2.6 Protein-Techniken

2.6.1 Verwendete Puffer

Äquilibriumlösung: 6 M Harnstoff, 50 mM Tris, 30% Glycerin, 2% SDS, $\text{pH}_{\text{HCl}} = 6,8$

Calmodulin-Bindungspuffer A: IPP150-Puffer mit 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl_2 , 10 mM β -Mercaptoethanol,

Calmodulin-Bindungspuffer B: 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl [$\text{pH}_{\text{HCl}} = 8,0$], 150 mM NaCl, 0,02% Nonidet NP-40, 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl_2

Calmodulin-Elutionspuffer: 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl [$\text{pH}_{\text{HCl}} = 8,0$], 150 mM NaCl, 0,02% Nonidet NP-40, 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 20 mM EGTA

Desintegrationspuffer: 24 mM NaH_2PO_4 , 36 mM Na_2HPO_4 , 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

His-tag-Basispuffer: 300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , $\text{pH}_{\text{NaOH}} = 8,0$

Inkubationspuffer: 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 100 mM Tris, $\text{pH}_{\text{HCl}} = 9,5$

IPP150-Puffer: 10 mM Tris-HCl [$\text{pH}_{\text{HCl}} = 8,0$], 150 mM NaCl, 0,1% Nonidet NP-40

Lysispuffer: 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 0,5% Zwittergent 3-12, 75 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 1x *Complete*, 1% *OrangeG*-Lösung, 0,5% Pharmalyte 3-10

NP-40-Puffer: 6 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 1% Nonidet NP-40, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 0,1 mM Na_3VO_3 , 1x *Complete*, 1,3 mM Benzamidin, 1 mM PMSF

PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , $\text{pH}_{\text{NaOH}} = 7,4$

Rehydratisierungslösung: 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% *CHAPS*, 0,5% Pharmalyte 3-10, 0,4% DTT, wenig Bromphenolblau

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, $\text{pH}_{\text{HCl}} = 7,5$

TEV-Schneidepuffer: IPP150-Puffer mit 0,5 mM EDTA, 1 mM DDT

Transferpuffer: 10 mM CAPS, 1,5 M NaCl, 10% Methanol, $\text{pH}_{\text{NaOH}} = 11$

Western-Blot-Waschpuffer: 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, $\text{pH}_{\text{HCl}} = 7,4$

2.6.2 Proteinpräparation aus *C. glutamicum*

Alle Proteinarbeiten erfolgten unter ständiger Kühlung auf Eis. Zur Gewinnung von Zell-extrakten wurden die aufgetauten Zellpellets (Kapitel 2.3) zweimal mit 20 - 40 ml TE-Puffer gewaschen und anschließend ad 1,2 ml in TE-Puffer resuspendiert. Um einen proteolytischen Abbau in den Zellextrakten zu verhindern, wurde 100 µl Protease-Inhibitor *Complete* (Roche Diagnostics, Mannheim, D) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte im *FastPrep*-Gerät FP120 (QBiogene, Heidelberg, D), wobei die Zellen viermal 30 s bei 6,5 m/s in Aufschlussgefäßen mit 300 mg Glasperlen (\varnothing 0,2–0,3 mm) geschüttelt wurden. Zwischen zwei Zyklen kühlten die Proben für 5 min auf Eis ab. Zelltrümmer und nicht-aufgeschlossene Zellen wurden pelletiert (30 min, 4°C, 14.000xg). Durch Ultrazentrifugation bei 65.000xg (20 min, 4°C) erfolgte die Trennung des Überstandes in unlösliche Membranfraktion und lösliche cytoplasmatische Proteinfraction. Das aus diesem Zentrifugationsschritt resultierende Pellet wurde zweimal mit Desintegrationspuffer und einmal mit 0,9% NaCl gewaschen. Die Solubilisierung der Membranfraktion erfolgte anschließend für 2 h bei 30°C unter Schütteln in 100 µl Lysispuffer. Alternativ wurde das Detergenz Zwittergent 3-12 im Lysispuffer durch 1% ASB-14, 0,2% Octyl- β -Glucopyranosid oder 1% Dodecylmaltosid ersetzt, um die Solubilisierung zu verbessern. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte für die Projekte „Optimierung von 2-D-PAGE mit Membranproteinen“, „Globale Analyse von Stickstoffhunger“ und „Globale Analyse einer Stickstofflimitierung“ mit Amido Black und für den Themenkomplex „Protein-Protein-Interaktionen“ nach Lowry (Kapitel 2.6.3). Die gewonnenen Proteine wurden entweder direkt verwendet oder à 25 bis 50 µl aliquotiert bei –80°C verwahrt.

2.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration mit Amido Black wurde nach Schaffner und Weissmann (1973) durchgeführt. Zur Herstellung der Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA).

Für die Konzentrationsbestimmung nach Lowry musste das Farbreagens unmittelbar vor der Versuchsdurchführung angesetzt werden. Dazu wurden 50 ml 20 g/l Na₂CO₃, 4 g/l NaOH unter ständigem Rühren mit je 1 ml 2% Na⁺K⁺-Tartrat und 1% CuSO₄ versetzt. Je 100 µl verdünnte Probenlösung und BSA-Standard (0, 2, 4, 8, 12, 20, 30 und 40 µg BSA) in Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit 20 µl 100 mM SDS gemischt. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml Farbreagens und nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C die Zugabe von 100 µl Folin-Reagens. Im Anschluss an eine 20-minütige Inkubationsphase bei 37°C wurde die Extinktion der Lösungen bei 650 nm gemessen.

2.6.4 Eindimensionale Gelelektrophorese (1-D-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte in 10% - 12%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Schägger und von Jagow, 1987) in einer *BlueVertical 101*-Apparatur (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D). Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Gele anschließend einer Coomassie-Färbung (Kap. 2.6.6), einer Silberfärbung (Kap. 2.6.7) oder einer *Western Blot*-Analyse (Kap. 2.6.8) unterzogen.

2.6.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE)

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE) ermöglicht die Trennung komplexer Proteingemische durch die sequentielle Anwendung zweier unabhängiger Methoden. In der ersten Dimension werden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung in einem pH-Gradientengel nach ihrem spezifischen isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die zweite Dimension ermöglicht durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese die zusätzliche Trennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes.

100 µg der in Lösung vorliegenden, denaturierten und reduzierten Proteine wurden zwecks „in gel“-Applikation“ ad 450 µl mit Rehydratisierungslösung versetzt. Für die Auftrennung von Membranproteinen kam ein modifiziertes Protokoll zur Anwendung: das Detergenz *CHAPS* war in der Rehydratisierungslösung durch 0,5% Zwittergent 3-12 ersetzt, die Proteinlösung wurde in 350 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen und 1 h bei 30°C geschüttelt. Die Proteinprobe wurde in die sorgfältig gereinigte Kammer pipettiert. In dieser Arbeit erfolgte die isoelektrische Fokussierung (IEF) von cytoplasmatischen Proteinen in 24 cm-IPG-Streifen und die IEF von Membranproteinen in 18 cm-IPG-Streifen im pH-Bereich von 4-7 (*Immobiline®DryStrips*, Amersham Biosciences, Freiburg, D). Der IPG-Streifen wurde mit der Gel-seite zuunterst auf die Lösung gelegt, ohne dass Flüssigkeit auf die Rückseite gelangte. Die Fokussierung erfolgte über 68.000 Vh (6 h bei 30 V, 6 h bei 60 V, 1 h bei 500 V, 1 h bei 1.000 V, 10 h bei 8.000 V) bei 20°C in einem *IPGphor™ Isoelectric Focussing System* (Amersham Biosciences). Die fokussierten Streifen wurden direkt in die zweite Dimension eingesetzt oder maximal für zwei Wochen bei -80°C verwahrt.

Vor dem Einsatz in die zweite Dimension mussten die fokussierten Streifen zur Reduktion der Proteine 15 min in Äquibrierlösung mit 1% DTT (w/v) inkubiert werden. Um überschüssiges DTT zu entfernen und die reduzierten Cysteinreste durch Alkylierung zu stabilisieren, wurden die IPG-Streifen anschließend 15 min in Äquibrierlösung mit 4% Iodacetamid (w/v) geschüttelt, mit H₂O_{dest} abgespült, kurz auf angefeuchtetem Filterpapier getrocknet und auf die vorbereiteten Gele (*ExcelGel Gradient XL 12-14*, Amersham Biosciences) gelegt. Die SDS-PAGE der zweiten Dimension lief zunächst 1 h bei 20 mA und nach Entfernung des IPG-Streifens aus dem System für weitere 2,5 h bei 40 mA.

Alle Analysen über 2-D-PAGE wurden durch die Anfertigung von mindestens zwei Replikaten derselben Probe (technische Replikate) und durch die Durchführung zweier unabhängiger biologischer Experimente (biologische Replikate) validiert. Pro untersuchtem Proteomstatus standen daher mindestens vier 2-D-Gele zur Verfügung.

2.6.6 Coomassie-Färbung

Ein- und zweidimensionale SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese einer Coomassie-Färbung nach Sambrook *et al.* (1989) unterzogen. Zunächst wurde 1 h in 45% Methanol, 10% Essigsäure fixiert und anschließend 1 h mit 45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,2% Coomassie *Brilliant Blue* G-250 gefärbt. Die Entfärbung erfolgte über Nacht in 10% Essigsäure.

2.6.7 Silberfärbung

Zur Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) wurden eindimensionale Gele 1 h in 50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,5 ml/l Formaldehyd fixiert und anschließend dreimal 20 min in 50% Ethanol gewaschen. Der einminütigen Vorbehandlung mit 0,2 g/l Na₂S₂O₃ folgte das dreimalige Spülen des Gels für 20 s in H₂O und die 20-minütige Färbung in 2 g/l AgNO₃, 0,75 ml/l Formaldehyd. Erneutes zweimaliges Spülen mit H₂O ermöglichte dann die Entwicklung in 60 g/l NaCO₃, 0,5 ml/l Formaldehyd. Diese wurde nach Erreichen des gewünschten Färbegrades mit 50% Methanol, 12% Essigsäure abgestoppt.

2.6.8 Western Blot-Analysen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinextrakten wurden die Proteine gegebenenfalls mit Hilfe eines *semi-dry-Blots* aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (*Immobilon P*, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dazu musste die Membran wenige Minuten in 60%-igem Methanol inkubiert, in Transferpuffer äquilibriert und dann in einer *semi-dry-Blot*-Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg, D) auf einen Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Whatman 3 mm-Papieren (Schleicher & Schüll, Dassel, D) gelegt werden. Darauf wurde sofort luftblasenfrei das Proteingel gelegt und mit einem weiteren Stapel aus fünf Whatman-Papieren bedeckt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA/cm² Oberfläche für 1 h. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für 1 h in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver in *Western-Blot*-Waschpuffer) inkubiert, der gewünschte erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 bis 1:50.000 zugegeben und für weitere 60 min geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit *Western-Blot*-Waschpuffer für je 20 min wurde Blockierungslösung mit dem entsprechenden zweiten Antikörper (Verdünnung 1:10.000) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C

geschüttelt. Für spätere Chemolumineszenz-Detektion standen Anti-Meerschwein- oder Anti-Kaninchen-*IgG-Peroxidase*-Konjugat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, D) zur Verfügung. Danach wurde die Membran dreimal 20 min mit *Western-Blot*-Waschpuffer gewaschen, dann nach Herstellerangaben mit dem *Uptilight HRP Blot Chemiluminescent Substrate* (Interchim, Montluçon, F) benetzt und 1 min inkubiert. Die endgültige Signaldetektion erfolgte durch Belichten eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR Film, Chalon-sur-Saône, F). Im Falle der Detektion durch Farbstoff-Präzipitation kam als zweiter Antikörper Anti-Meerschwein- oder Anti-Kaninchen-*IgG-Alkalische Phosphatase*-Konjugat (Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Nach dreimaligem Waschen wurde auf die Membran ein NBT/BCIP-Gemisch (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) in Inkubationspuffer gegeben und im Dunkeln bis zur gewünschten Signalstärke inkubiert.

2.6.9 Computergestützte Spotanalyse und Proteinquantifizierung

Der Vergleich von Coomassie-gefärbten 2-D-Gelen erfolgte computergestützt durch die Erstellung einer Falschfarbendarstellung von zwei übereinander gelagerten 2-D-Gelen mit dem Programm *Delta2D* (Versionen 3.0 bis 3.2, Decodon, Greifswald, D).

Zur Quantifizierung von Proteinen auf 2-D-Gelen wurde die Quantifizierungsfunktion des Programms *Delta2D* (Version 3.2, Decodon) verwendet. Als Bezugsgröße wurde das relative Volumen festgelegt, d.h. das Volumen des betrachteten Proteinpunktes bezogen auf das Gesamtvolumen aller Proteinpunkte des Gels. Eine Regulation eines Proteins im 2-D-Vergleich wurde angenommen, wenn (1) der ermittelte Faktor der relativen Volumina $\leq 0,5$ bzw. $\geq 2,0$ war und (2) diese Regulationsmuster in allen biologischen und technischen Replikaten nachweisbar war.

2.6.10 Protein-Identifizierung

Interessante Proteine wurden zur Aufnahme eines Peptidmassenspektrums via *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight*- (MALDI-TOF-) Massenspektrometrie aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Jedes Protein wurde zur Validierung mindestens zweimal massenspektrometrisch vermessen und einer Datenbanksuche unterzogen.

2.6.10.1 *In gel*-Verdau

Alle Lösungen besaßen nach Möglichkeit den höchsten Reinheitsgrad oder waren sterilfiltriert, um Staubfreiheit zu gewährleisten. Zu identifizierende, Coomassie-gefärbte Proteinspots wurden aus SDS- und 2-D-Gelen ausgeschnitten. Gegebenenfalls erfolgte die Reduktion mit 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 (1 h, 56°C) und anschließend die Alkylierung mit 55 mM Iodacetamid in 50 mM NH_4HCO_3 im Dunkeln (45 min). Zur Entfernung von Kontaminationen wurde zweimal 5 min und einmal 30 min mit 50 mM NH_4HCO_3 gewaschen. Danach erfolgte die Entfärbung der Proteinspots durch zweifache Inkubation für 30 min in 50% 50 mM NH_4HCO_3 , 50% Acetonitril. Die Gelstücke wurden 5 min in 100 μl Acetonitril dehydriert und anschließend Vakuum-getrocknet. Für den tryptischen Verdau erfolgte die Überschichtung der getrockneten Gelstücke je nach Größe mit 2-4 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin (*sequence grade*, Promega, Madison, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 und die Inkubation über Nacht. Der Zugabe von 2 μl 25 mM NH_4HCO_3 folgte eine weitere 90-minütige Inkubation der Proben. Der Überstand enthielt das zu analysierende Peptidgemisch. Die Proben wurden entweder sofort zur massenspektrometrischen Analyse eingesetzt oder bei -80°C verwahrt.

2.6.10.2 Konzentrierung und Entsalzung von Peptiden hydrophober Proteine

Alle Peptidgemische von Membranproteinen wurden vor der massenspektrometrischen Analyse an Hand von *reversed phase* C_{18} -Mini-Säulen in 10 μl -Pipettenspitzen (Zip Tips, Millipore, Bedford, USA) entsalzt und konzentriert. Die Äquilibrierung, die Beladung und die Waschprozedur erfolgten nach den Herstellerangaben. Die Elution war zweischrittig. Für Schritt 1 wurde 1 μl 50% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) auf die Säule aufgezogen. Unter Vermeidung eines Lufteintrages ins System wurde die Probe durch Hoch- und Herunterpipettieren der Lösung etwa acht- bis zehnmal eluiert, diese erste Elutionsfraktion auf das Edelstahl-MALDI-Target appliziert und sofort mit 1 μl 5 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50% Acetonitril, 0,1% TFA gemischt. Die zweite Elution erfolgte nach dem gleichen Schema in 100% Acetonitril. Beide Elutionsfraktionen lieferten getrennt voneinander Mess- und Auswertungsdaten.

2.6.10.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung von Proteinen über die Massenanalyse des aus dem *In gel*-Verdau resultierenden Peptidgemisches. Ein Aliquot von 0,5 - 1 μl der Peptidlösung wurde auf das Edelstahl-MALDI-Target appliziert und direkt mit der gleichen Menge 5 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50% Acetonitril, 0,1% TFA gemischt. Um für jede Probe extern kalibrieren zu können, wurde nahe der Probe ein externer Standard (Kalibriermischung 1 und 2, *Sequazyme Peptide Mass Standard Kit*, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) aufgebracht und vermessen. Die Datenaufnahme

erfolgte im *Reflectron*-Modus mit einer *Voyager-DE STR reflectron TOF BioSpectrometry Workstation* (Applied Biosystems) unter Gebrauch der Hersteller-Software (*Voyager Control Panel Software*, Version 5.0). Das Massenspektrometer war mit einem N₂-UV-Laser (337 nm, 3 ns Pulsfrequenz) ausgestattet. Die Massenspektren wurden manuell im positiven Reflektor-Modus bei 20 kV Beschleunigungsspannung, 66% Gitterspannung und 150 ns Verzögerungszeit aufgenommen. Pro Peptidprobe wurden drei Spektren à 100 - 150 Laserimpulsen im Massenbereich von 800 bis 4000 Da akkumuliert.

Zur Datenauswertung wurde das Hersteller-Programm *Voyager Data Explorer* (Version 3.5, Applied Biosystems) genutzt. Die daraus erhaltenen Peptidmassenlisten wurden für die Datenbanksuche verwendet.

2.6.10.4 Datenbanksuche

Die monoisotopischen Massen eines Peptid-*Fingerprints* wurden für eine vergleichende Datenbanksuche mit der *GPMAW Software* (Version 6.0, Lighthouse Data, Odense, DK) verwendet. Bezugspunkt war hierbei das virtuelle, computergestützt tryptisch verdaute Proteom von *C. glutamicum* ATCC13032 (Kalinowski *et al.*, 2003). Die initialen Suchparameter wurden wie folgt festgelegt: (1) Proteinverdau mit Trypsin ohne Zulassung von nicht-gefundenen Schnittstellen, (2) maximale Massenabweichung 100 ppm, (3) Carbamidomethylierung von Cystein und (4) mögliche Oxidation von Methionin. Ergab die Datenbanksuche unter diesen Kriterien keine zufriedenstellende Identifizierung, wurden die Suchparameter bezüglich der nicht-gefundenen Schnittstellen (maximal eine) und der Massenabweichung (maximal 250 ppm) variiert. Proteine wurden als identifiziert eingestuft, wenn vier oder mehr Peptide den oben genannten Suchkriterien entsprachen und durch sie mindestens 30% der Aminosäuresequenz abgedeckt war.

2.6.11 Protein-Protein-Interaktionsstudien

2.6.11.1 Tandem Affinity Purification- (TAP-) Methode

Für die Interaktionsstudien über die TAP-Methode wurden drei *C. glutamicum*-Stämme konstruiert, welche das für das jeweilige Fusionsprotein codierende Gen plasmidcodiert tragen: *C. glutamicum* pXMJ19-*glnK*-TAP, *C. glutamicum* pXMJ19-*amtR*-TAP und *C. glutamicum* pXMJ19-*eno*-TAP. Die Synthese der Fusionsproteine war IPTG-induzierbar.

Die Zellanzucht erfolgte in CgC-Medium und entsprach dem in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Schema. Allen Kulturmedien wurde 15 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Aus der Übernachtskultur wurden 400 ml CgC-Medium in 2 l-Erlenmeyerkolben angeimpft, welches bereits 1 mM IPTG enthält. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen pelletiert und in 400 ml frisches CgC-Medium bzw. CgCoN-Medium mit 1 mM IPTG

resuspendiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 30°C wurde das Zellmaterial geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit TE-Puffer wurden die Zellpellets in 2,5 ml NP-40-Puffer resuspendiert und einer Proteinpräparation gemäß Kapitel 2.6.2 unterzogen. Der so gewonnene Gesamt-Zellextrakt wurde in die TAP-Aufreinigung eingesetzt.

Die erste Affinitätsaufreinigung erfolgte über *IgG Sepharose™6 Fast Flow* (Amersham Biosciences, Uppsala, SW). 500 µl Säulenmaterial wurde vor Gebrauch zweimal mit 10 ml IPP150-Puffer äquilibriert. Nach der Zugabe des Zellextraktes erfolgte die Bindung der Proteinkomplexe durch Rotation der verschlossenen Säulenkörper (über Nacht, 4°C). Im Anschluss an die Elution des überschüssigen Zellextraktes wurde das Säulenmaterial dreimal mit 10 ml IPP150-Puffer gewaschen. Um die Säule für den TEV-Proteaseverdau zu äquilibrieren, musste zweimal mit 10 ml frisch angesetztem TEV-Schneidepuffer gewaschen werden. Zur Einleitung des TEV-Proteaseverdau wurde 1 ml TEV-Schneidepuffer mit 200 U *AcTEV*-Protease (Promega, Madison, USA) versetzt, zum Säulenmaterial gegeben, der Säulenkörper 2 h bei 16°C rotiert und eine Elution per Schwerkraft angeschlossen. Um das Totvolumen des Systems nicht zu verlieren, wurde nochmals mit 1 ml TEV-Schneidepuffer eluiert. Das resultierende Eluat wurde in eine zweite Affinitätsaufreinigung über *Calmodulin Affinity Resin* (Stratagene, La Jolla, USA) eingesetzt. Vor Gebrauch erfolgte die zweimalige Äquilibrierung von 500µl Säulenmaterial mit 10 ml Calmodulin-Bindungspuffer A. Dem Eluat des TEV-Proteaseverdau wurden pro ml 3 µl 1 M CaCl₂ und das dreifache Volumen Calmodulin-Bindungspuffer A zugegeben. Nach der Applikation auf die präparierte Säule wurde die Säule bei 4°C für 2 h rotiert. Die Säule wurde dreimal mit Calmodulin-Bindungspuffer A und zweimal mit Calmodulin-Bindungspuffer B gewaschen. Zur nativen Elution des Proteinkomplexes von der Säule wurden 4 ml Calmodulin-Elutionspuffer zugegeben. Das gesamte Eluat wurde aufgefangen und über eine TCA-Fällung aufkonzentriert. Dazu wurde 100% TCA bis zu einer Endkonzentration von 25% zugegeben. Es folgte eine Inkubationsphase für 30 min auf Eis, während der die Lösung regelmäßig gemischt wurde. Die Proteine wurden pelletiert (30 min, 4°C, 20.000xg) und dann einmal mit eiskaltem 0,05 M HCl in Aceton und einmal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet luftgetrocknet. Nach der Resuspension des Pellets in 25 – 30 µl H₂O wurde das Eluat über eine 1-D-PAGE aufgetrennt. Alle durch Coomassie-Färbung detektierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert.

2.6.11.2 Pull Down-Methode

Gewinnung des Fusionsproteins GlnK-His

Für die Interaktionsstudien über die *Pull Down*-Methode wurde das *C. glutamicum*-GlnK-Protein mit einem 6xHis-tag versehen und heterolog in *E. coli* pQEglnK synthetisiert. Die Vorkultivierung von *E. coli* pQEglnK erfolgte über Nacht in 50 ml carbenicillinhaltigem LB-Medium bei 37°C. Mit 10 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml frisches Medium angeimpft und kultiviert, bis eine OD_{600nm} von ca. 0,6 erreicht war. Dann erfolgte die Zugabe von 250 µl 1 M IPTG zur Induktion der GlnK-His-Expression. Nach weiteren 4 h konnten die Zellen geerntet, einmal in PBS-Puffer gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei –80°C gelagert werden.

Zur Präparation des Gesamtzellextraktes aus *E. coli* pQEglnK wurde das Zellmaterial 15 min auf Eis aufgetaut, in 1 ml *His-tag*-Basispuffer resuspendiert und mit 100 µl 100 µl Protease-Inhibitor *Complete* (Roche Diagnostics, Mannheim, D) und 2,5 µg/ml DNase I (Sigma-Aldrich, Darmstadt, D) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte im *FastPrep*-Gerät FP120 (QBiogene, Heidelberg, D) durch dreimaliges hochfrequentes Schütteln. Zelltrümmer und nicht-aufgeschlossene Zellen wurden pelletiert (15 min, 4°C, 20.000xg) und der Überstand zur nativen *His-tag*-Aufreinigung verwendet.

Native His-tag-Aufreinigung

Die Aufreinigung von GlnK-His erfolgte über *TALON®Metal Affinity Resin* und *TALON®Superflow Metal Affinity Resin* (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA). Vor Gebrauch wurde das Säulenmaterial einmal mit dem 10-fachen Säulenvolumen *His-tag*-Basispuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit dem GlnK-His-haltigem Zellextrakt beladen und der Durchfluss zwecks späterer Analysen eingefroren. Alle Proteine aus dem *E.coli*-Zellextrakt wurden mit dem 40-fachen Säulenvolumen *His-tag*-Basispuffer mit 40 mM Imidazol entfernt. Die Waschfraktionen wurden aufbewahrt, um die Effizienz der Waschprozedur zu überprüfen. Die Elution erfolgte mit dem 10-fachen Säulenvolumen *His-tag*-Basispuffer mit 250 mM Imidazol. Alle Elutionsfraktionen wurden über 1-D-PAGE (Kap. 2.6.4) auf den Gehalt von GlnK-His überprüft. Elutionsfraktionen, welche nur das gereinigte GlnK-His-Protein enthielten, wurden mit *Centriplus YM-3*-Konzentratoren (Millipore, Bedford, USA) gemäß der Herstellerangaben bei 4°C konzentriert.

Pull Down-Experimente mit *C. glutamicum*-Zellextrakt

Für die Interaktionsstudien über die *Pull Down*-Methode wurde GlnK-His heterolog in *E. coli* pQEglnK exprimiert. Das gereinigte Protein lag daher im unmodifizierten Zustand vor. Um für die Interaktionsstudien *C. glutamicum*-Zellen zu gewinnen, welche GlnK in einem vergleichbaren Modifizierungsstatus enthalten, wurde wie folgt verfahren. *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben kultiviert. Im Anschluss an eine Phase des zwei-stündigen Stickstoffhungers in CgCoN-Medium wurde ein zehnmütiger Stickstoffpuls mit 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ angeschlossen. Danach erfolgte die Zellernte und Proteinpräparation entsprechend Kapitel 2.6.2.

250 µg gereinigtes, heterolog in *E. coli* synthetisiertes GlnK-His wurden an eine Affinitäts-säule (*TALON®Metal Affinity Resin*, BD Biosciences Clontech) gebunden. 10 ml Zellextrakt aus *C. glutamicum* ATCC13032 wurde appliziert, die Säule verschlossen und 2 h bei 4°C rotiert. Nach Durchlauf der nicht gebundenen Proteine wurde mit dem 40-fachem Säulen-volumen PBS-Puffer ($\text{pH}_{\text{NaOH}}=8,0$) gewaschen. Die Elution erfolgte sequenziell mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen im Elutionspuffer: (1) *His-tag*-Basispuffer mit 20 mM Imidazol, (2) *His-tag*-Basispuffer mit 40 mM Imidazol und (3) *His-tag*-Basispuffer mit 250 mM Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden aufgefangen und einer Acetonfällung unterzogen. Jeder Fraktion wurde das 5-fache Volumen eiskaltes Aceton zugegeben. Nach dem Mischen wurde für 1 h bei -20°C inkubiert. Die Proteine wurden bei 20.000xg pelletiert (30 min, 0°C), der Überstand abpipettiert und das Pellet luftgetrocknet. Nach der Resuspension des Pellets in 50 µl H₂O erfolgte die Auftrennung des Eluats über eine 1-D-PAGE. Alle durch Coomassie-Färbung detektierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert.

3 Ergebnisse

Bisherige Studien zum Einfluss von Stickstoffhunger haben gezeigt, dass *C. glutamicum* zur schnellen Reaktion auf eine solche Mangelsituation ein regulatorisches Netzwerk besitzt, die sogenannte Stickstoffkontrolle. Auf Expressionsebene reguliert das globale Repressorprotein AmtR die Transkription verschiedener Komponenten. Zum AmtR-Regulon gehören Gene, die für die Aufnahme von Ammonium (*amtA* und *amtB*), von alternativen Stickstoffquellen (*crnT*, *gluABCD*, *urtABCDE*), für stickstoffassimilierende Enzyme (*glnA*, *gltBD*, *ureABCEFGD*, *codA*) und für Proteine der Signaltransduktion (*glnK* und *glnD*) codieren.

Ziel dieser Arbeit war die genaue Analyse des Einflusses von abruptem Stickstoffhunger auf Transkriptom und Proteom von *C. glutamicum* unter Verwendung globaler Methoden. Analog dazu sollte die Auswirkung einer Langzeit-Limitierung bezüglich Stickstoff auf Transkriptom- und Proteomebene aufgeklärt werden, da diese der tatsächlichen Mangelsituation in der natürlichen Umgebung der Bodenbakterien eher entspricht.

3.1 Optimierung der 2-D-PAGE von Membranproteinen

Die 2-D-Gelelektrophorese ermöglicht die Darstellung eines Großteils der zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorhandenen Proteine. Eine Methode zur Trennung cytoplasmatischer *Corynebacterium*-Proteine wurde von Hermann *et al.* (1998) beschrieben und kontinuierlich weiterentwickelt (Bendt, 2002).

Das AmtR-Regulon von *C. glutamicum* umfasst neben den für assimilatorische Enzyme und Proteine der Signaltransduktion codierenden Genen mindestens 17 für Transportproteine codierende Gene (Beckers, 2004). Die Möglichkeit zur Analyse des Proteinmusters hydrophober Membranproteine würde die globale Analyse des Einflusses von Stickstoffhunger und -limitierung auf Proteomebene ergänzen und vervollständigen. Aus Tabelle 3.1 ist ersichtlich, dass neun der 17 oben genannten Kandidaten theoretisch auf einem 2-D-Gel mit engem pH-Bereich (4-7) und sogar 15 auf einem 2-D-Gel mit weitem pH-Bereich (3-10) detektiert werden könnten. Alle Proteine liegen im analysierbaren Massenbereich von 5-110 kDa. Verfahren zur Analyse des Membranproteoms von *C. glutamicum* wurden zwar in der Literatur beschrieben, führten jedoch nicht zur Identifizierung von Membranproteinen mit mehr als einer Transmembranhelix. Lediglich der Nachweis membranassoziierter Proteine gelang (Hermann *et al.*, 1998; Schaffer *et al.*, 2001). Eine Optimierung der bestehenden Methode sollte die Auflösung von Membranproteinen auf 2-D-Gelen ermöglichen.

Tabelle 3.1: Molekulargewicht (M_w) und theoretischer pI der AmtR-regulierten Transportproteine. Die Zuordnung erfolgte an Hand des *pI/M_w-Tools* des *Expasy Protein Servers* (www.expasy.ch) mit den Aminosäuresequenzen der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation).

NCgl Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
0074	<i>crnT</i>	Creatininpermease	20,8	8,6
0893	<i>urtA</i>	periplasmatische Komponente, ABC-Transporter	45,6	4,2
0894	<i>urtB</i>	Permease-Komponente, ABC-Transporter	30,9	9,9
0895	<i>urtC</i>	Permease-Komponente, ABC-Transporter	37,9	10,2
0896	<i>urtD</i>	ATPase-Komponente, ABC-Transporters	26,2	5,9
0897	<i>urtE</i>	ATPase-Komponente, ABC-Transporters	24,7	6,8
1521	<i>amtA</i>	Ammoniumtransporter AmtA	47,7	5,5
1875	<i>gluA</i>	Glutamatttransport ATP-Bindeprotein GluA	26,5	5,7
1876	<i>gluB</i>	Glutamattbindeprotein GluB-Vorstufe	31,7	4,1
1877	<i>gluC</i>	Glutamatttransportpermeaseprotein GluC	24,5	10,2
1878	<i>gluD</i>	Glutamatttransportpermeaseprotein GluD	34,4	9,8
1915		periplasmatische Komponente, ABC-Transporter	57,7	3,9
1916		Permease-Komponente, ABC-Transporter	33,2	9,7
1917		Permease-Komponente, ABC-Transporter	36,9	6,4
1918		ATPase-Komponente, ABC-Transporter	63,1	6,0
1993	<i>amtB</i>	niedrig affines NH_4^+ -Aufnahmeprotein AmtB	45,4	5,1
2302		Permease	46,7	9,6

Zugunsten der besseren Auflösung des Proteinmusters wurden im Rahmen dieses Projektes 18 cm-IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 4-7 verwendet. Die Waschprozedur für die Membranfraktion wurde durch das zusätzliche einmalige Waschen mit 0,9% NaCl im Anschluss an das zweimalige Waschen mit Desintegrationspuffer ausgedehnt, was den Gehalt an cytoplasmatischen Proteinen reduziert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde statt 4% CHAPS im Lysispuffer 0,5% Zwittergent 3-12 als Detergenz verwendet (A. Bendt, persönliche Mitteilung). Der von Herbert *et al.* (1998) empfohlene Ersatz des reduzierenden thiolhaltigen Agens DTT durch Tributylphosphin hatte keinen darstellbaren Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine und ihren Transfer in die zweite Dimension (Daten nicht gezeigt).

Um N-abhängige hydrophobe Proteine finden zu können, wurden aus N-gehungerten Zellen zwei Proteinfractionen gewonnen, die cytoplasmatische Proteinfraction und die Membranfraktion. Je 100 μ g Protein wurde in eine 2-D-Gelelektrophorese eingesetzt, die Membranproteine wurden nach dem optimierten Protokoll behandelt (Abb. 3.1).

Der Vergleich beider 2-D-Gele zeigt in der Membranfraktion eine deutliche Anreicherung von abundanten Proteinen. Besonders deutlich wurde dies an Proteinen wie der Enolase (Eno), der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Gap), der Fructosebisphosphataldolase (Fda), der Citratsynthase (GltA) und des Elongationsfaktors EF-Tu. Insgesamt 55 Proteine wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie aus der Membranfraktion identifiziert. Sie sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

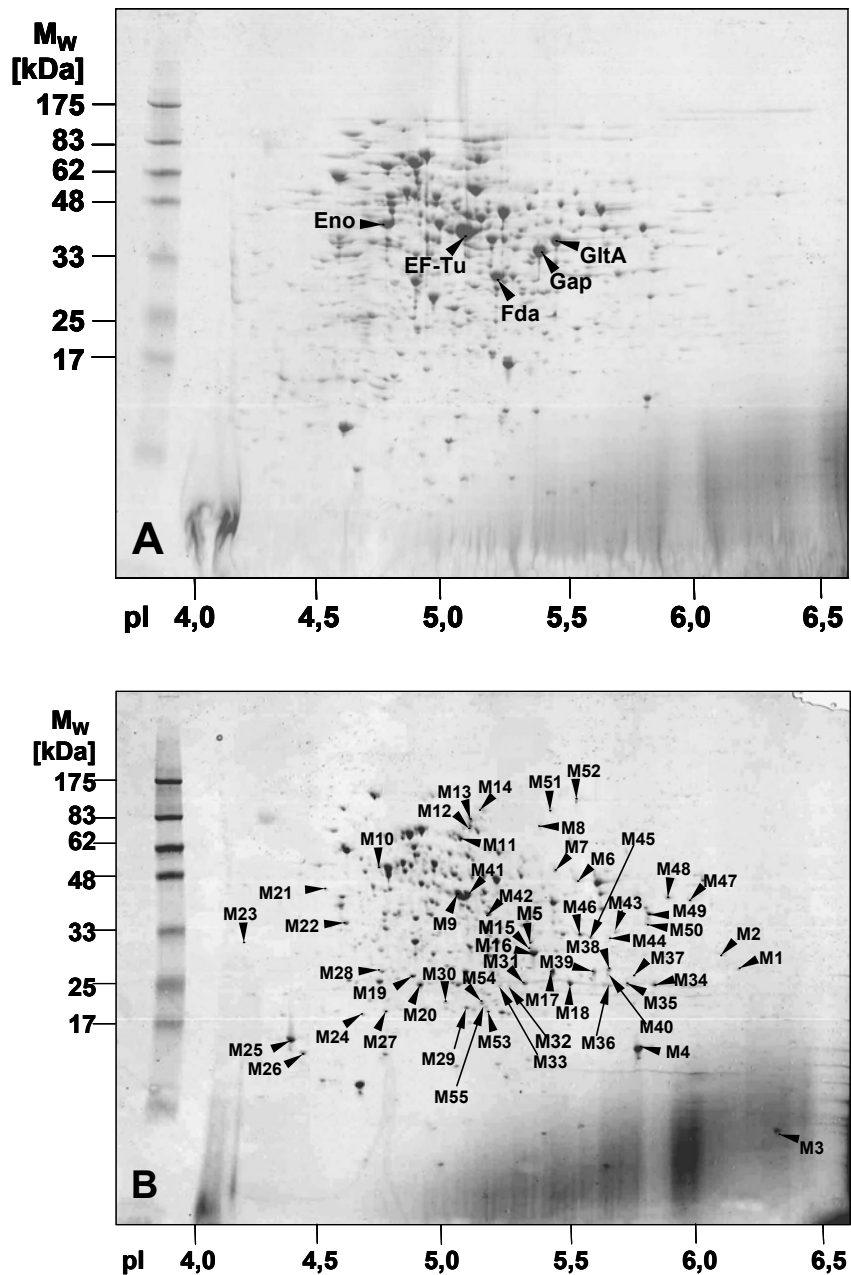


Abbildung 3.1: Proteommuster der cytoplasmatischen Proteinfraction (A) und der Membranfraction (B) aus einer stickstoffgehungenen *C. glutamicum*-Kultur. Jeweils 100 μ g Protein wurden über 2-D-PAGE getrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Das apparente Molekulargewicht M_w der Proteine in kDa sowie der dargestellte pH-Bereich (pI) sind angegeben. Die markierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Abkürzungen: EF-Tu = Elongationsfaktor Tu, Eno = Enolase, Fda = Fructosebisphosphataldolase, Gap = Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, GltA = Citratsynthase.

Tabelle 3.2: Identifizierte Proteine aus der Membranfraktion von *C. glutamicum*. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben. Für die hier nicht aufgelisteten Proteinspots (M12-13, M15, M18, M21-26, M28, M32-33, M35, M40-43, M51-52 und M54) konnte kein ähnliches Protein aus der *C. glutamicum*-Datenbank identifiziert werden. Abkürzungen: DH = Dehydrogenase

Spot	NCgl Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
M1	0186		putative DH	26,7	5,82
M2	2487		Histonacetyltransferase HPA2-ähnliches Protein	32,1	5,86
	0873	<i>ksgA</i>	Dimethyladenosintransferase	31,8	5,82
M3	2881	<i>rpsF</i>	ribosomales Protein S6	11,0	6,29
M4	0468	<i>rplJ</i>	ribosomales Protein L10	18,0	5,63
M5	2449		putative Zn-NADPH:Quinon-DH	35,8	5,26
M6	2198	<i>glyS</i>	Klasse II Glycyl-tRNA-synthetase	53,0	5,28
M7	0827	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-formyltransferase/IMPCyclohydrolase	55,8	5,26
M8	1109		putative Helicase	80,6	5,22
M9	0480	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	43,9	4,92
M10	1235	<i>serA</i>	Phosphoglycerat-DH	55,3	4,70
M11	1053		putative, in Stressantwort involvierte Membran-GTPase	68,7	4,90
	1573	<i>aspS</i>	Aspartyl-tRNA-synthetase	67,0	4,93
M14	2585	<i>clpC</i>	ATP-bindende Untereinheit der ATPase mit Chaperonaktivität	101,5	5,02
M16	1886		Phagen-Schockprotein A (IM30)	30,4	5,28
M17	0725		Ribosomen-assoziiertes Protein Y	24,6	5,41
M19	2530		putative Hydrolase der HAD-Superfamilie	29,6	4,80
M20	1015		putative PEP-Phosphonmutase	26,6	4,80
M27	1544	<i>gmk</i>	Guanylatkinase	22,6	4,73
M29	0328		Nitroreductase	21,2	4,94
M30	1551	<i>pyrR</i>	Uracilphosphoribosyltransferase	21,0	4,93
M31	0779		ATPase-Komponente eines Cobalamin/ Fe^{3+} -Siderophoren ABC-Transportsystems	27,9	5,11
M34	1875	<i>gluA</i>	Glutamattransport ATP-Bindeprotein	27,4	5,50
M36	0779		ATPase-Komponente eines Cobalamin/ Fe^{3+} -Siderophoren ABC-Transportsystems	27,9	5,11
M37	0636		ATPase-Komponente, ABC-Transporter	29,1	5,48
M38	2934		hypothetisches Protein	29,0	5,47
M39	0725		Ribosomen-assoziiertes Protein Y	24,6	5,41
M44	1061	<i>dapD</i>	Tetrahydrodipicolinat-N-succinyltransferase	31,2	5,43
M45	2086	<i>mraW</i>	putative S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase	36,8	5,39
M47	2810	<i>ldh</i>	L-Lactat-DH	34,4	5,10
M48	2747		PLP-abhängige Aminotransferase	48,7	5,54
M49	2377	<i>msiK1</i>	ATPase-Komponente eines ABC-Zuckertransporters	40,3	5,53
M50	1022		Cysteinsulfinatdesulfhinase	37,8	5,52
M53	2471		hypothetisches Protein	21,0	5,01
M55	1947	<i>frr</i>	Ribosomenrecyclingfaktor	20,6	5,07
	2579	<i>cynT</i>	Carboanhydrase	22,2	5,09

Die in Tab. 3.2 aufgelisteten Proteine ergeben ein umfassendes Bild der Zusammensetzung der Membranfraktion von *C. glutamicum*. Insgesamt 28 der identifizierten Proteine (ca. 51%) sind im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Die Trennung der Proteinfractionen erscheint ineffizient. Sechs membranassoziierten Proteine (ca. 11%) konnten detektiert werden: eine putative Membran-GTPase (M11), das Glutamattransport-ATP-Bindeprotein GluA (M34), die ATPase-Komponente eines Cobalamin/Fe³⁺-Siderophoren ABC-Transporters (M31 und M36) und zwei ATPase-Komponenten von uncharakterisierten ABC-Transportern (M37, M49). Keines der genannten Proteine besitzt integrale Membranbestandteile. Bei weiteren 16 der analysierten Proteine gelang die Identifizierung über MALDI-TOF-Massenspektrometrie nicht. Die aus der Messung resultierenden Massenlisten wiesen keine ausreichende Ähnlichkeit mit Proteinen der *C. glutamicum*-Datenbank auf.

Die verwendete Methode zur Auftrennung von Membranproteinen verfehlt bei Betrachtung der in Tab. 3.2 gezeigten Ergebnisse ihr Ziel. Als Ursachen hierfür kommen eine unzureichende Solubilisierung hydrophober Proteine im Lysispuffer, ein unzureichender Transfer der Proteine in die erste Dimension und/oder ein unzureichender Transfer der Proteine von der ersten in die zweite Dimension in Frage. Im Rahmen ihrer Diplomarbeit konnte Britta Walter zeigen, dass nach einer Abreicherung cytoplasmatischer und membranassoziierten Proteine über Carbonatextraktion und Solubilisierung im Standard-Lysispuffer viele Membranproteine auf 1-D-Gelen identifizierbar sind (B. Walter, persönliche Mitteilung). Eine unzureichende Solubilisierung der hydrophoben Proteine im verwendeten Lysispuffer konnte daher ausgeschlossen werden. Um die Effizienz des Transfers von Membranproteinen in die erste Dimension zu untersuchen, wurde das System durch die Verwendung eines Modellproteins (BetP) auf ein Minimum vereinfacht. BetP ist der gut charakterisierte Glycin-Betaintransporter aus *C. glutamicum*. Er besitzt 12 Transmembranhelices und liegt mit einer Größe von ca. 64 kDa und einem theoretischen pI von 5,56 im analysierbaren Bereich der 2-D-PAGE. Das über Strep-tag isolierte Protein wurde von Johannes Botzenhardt zur Verfügung gestellt.

Das Modellprotein BetP wurde in Lysispuffer aufgenommen und nach dem Standardprotokoll in die erste Dimension eingesetzt (Kap. 2.6.5). Durch Austausch des Detergenz Zwittergent 3-12 im Lysispuffer gegen 1% ASB-14, 0,2% Octyl- β -Glucopyranosid oder 1% Dodecylmaltosid sollte eine effektivere Solubilisierung erreicht werden.

Die IPG-Streifen wurden silbergefärbt, um den Proteintransfer aus der Rehydratisierungslösung in das Gel zu überprüfen. Abb. 3.2 zeigt exemplarisch das Ergebnis unter Einsatz von 0,2% Octyl- β -Glucopyranosid zur Solubilisierung.

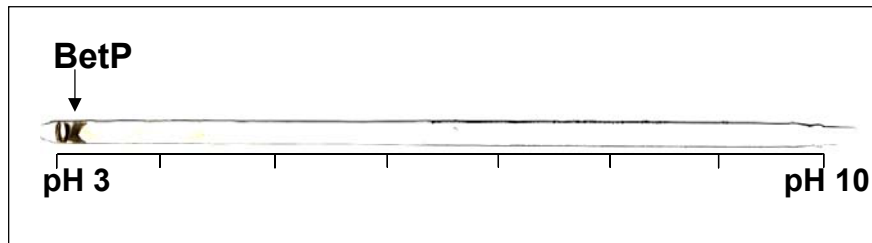


Abbildung 3.2: Eindimensionale Auftrennung des Modellproteins BetP im pH-Bereich 3-10. 200 ng gereinigtes Protein wurden getrennt und silbergefärbt. Zur Solubilisierung wurden der Rehydratisierungslösung 0,2% Octyl- β -Glucopyranosid zugegeben. Der dargestellte pH-Bereich ist angegeben.

Aus Abb. 3.2 ist ersichtlich, dass der eigentliche Transfer des Modellproteins mit 12 Transmembranhelices in das Gel der ersten Dimension funktioniert. Jedoch fokussiert BetP nicht bei seinem theoretischen pI (5,56) aus, sondern am sauren Ende des IPG-Streifens. Der Einsatz alternativer Detergenzien im Lysispuffer beeinflusste dieses Ergebnis nicht. Vergleichbare Experimente mit einem zweiten Modellprotein, LysE aus *C. glutamicum*, zeigten einen weniger ausgeprägten *Shift* in den sauren pH-Bereich (B. Walter, persönliche Mitteilung). Beide Ergebnisse deuten auf eine Bindung saurer Komponenten an Membranproteine hin, die ihren theoretischen pI verschieben. Im Fall von BetP konnte ein *pH-Shift* um über 2,5 pH-Einheiten gezeigt werden. Dieser Effekt macht den Einsatz einer aus pH- und Molekulargewichtsauftrennung bestehenden 2-D-PAGE bei Membranproteinen sinnlos. Diese Methode ist daher für die Projekte „Globale Analyse von Stickstoffhunger“ und „Globale Analyse einer Stickstofflimitierung“ nicht geeignet.

3.2 Globale Analyse von Stickstoffhunger

Im Rahmen dieses Teilprojektes sollte der Einfluss von abruptem Stickstoffhunger auf Transkriptom- und Proteomebene von *C. glutamicum* charakterisiert werden.

3.2.1 OTR- und CTR-Profile in Minimalmedium

Stickstoffhunger kann in Schüttelkolben durch ersatzloses Streichen der Stickstoffquellen realisiert werden. Der große Nachteil in diesem Kultursystem sind die nur eingeschränkten Überwachungsmöglichkeiten. Der pH-Wert des Mediums kann lediglich durch die Wahl eines guten Puffersystems und den eingestellten Anfangs-pH-Wert beeinflusst werden und die Versorgung mit Sauerstoff findet allein durch die Diffusion von O_2 an der Flüssigkeitsoberfläche statt. Daher ist die Gefahr einer Sauerstofflimitierung gegeben. Um in den geplanten Experimenten nicht den Einfluss einer Doppellimitierung bezüglich der Stickstoff- (N-) und der O_2 -Quelle zu untersuchen, sollte eine Sauerstofflimitierung in Vorversuchen ausgeschlossen werden.

In direktem Zusammenhang mit der O_2 -Konzentration in einem System steht die Sauerstofftransferrate (OTR, Gleichung 2.1). Durch diese kann ein biologisches System unter aeroben Bedingungen charakterisiert werden. Die Aufnahme dieser Größe ist in Schüttelkolben durch das *Respiration Activity Monitoring System* (RAMOS, AC Biotech, Jülich, D) möglich. Die *online*-Messung des Sauerstoffpartialdrucks mit Hilfe von eingebauten Sauerstoffsonden und des Gesamtdrucks über montierte Drucksensoren ermöglicht die Berechnung von drei wichtigen Bezugsgrößen: die OTR, die Kohlendioxidtransferrate (CTR) und der respiratorische Quotient (RQ). Die Messungen im RAMOS-System wurden am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ing. Tibor Anderlei (AC Biotech) und Dipl.-biol. Christoph Stöckmann durchgeführt.

Das Standardprotokoll zur Anzucht von *C. glutamicum* unter N-Überschuss in CgC- und MM1-Medium, sowie unter N-Hunger in CgCoN- und MM1oN-Medium wurde untersucht. Aus Abb. 3.3 sind das OTR- und CTR-Profil über der gesamten Versuchsdauer in MM1-Medium gezeigt. Zusätzlich wurden in regelmäßigen Abständen pH-Wert und OD_{600nm} aus parallel mitgeführten Probenahmekolben bestimmt.

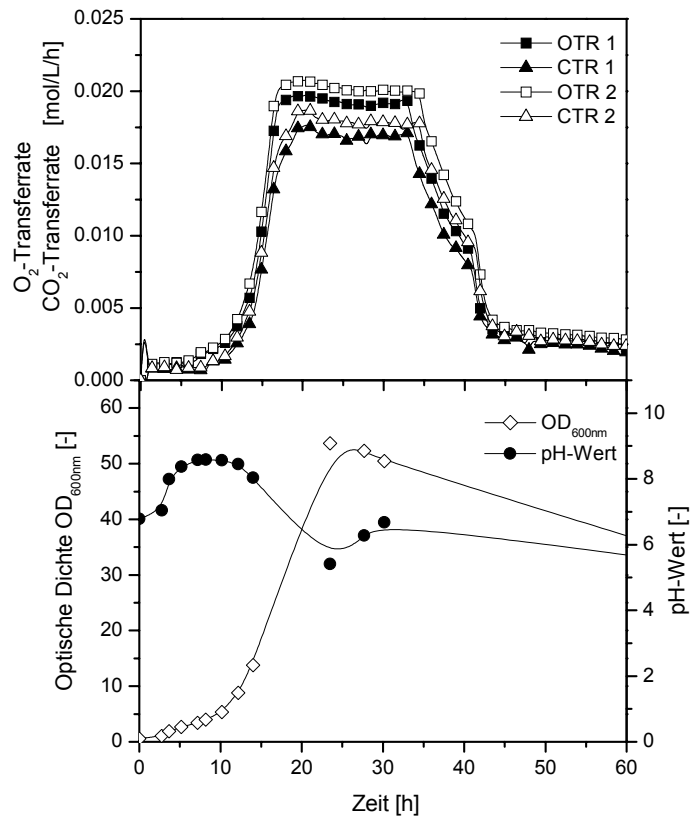


Abbildung 3.3: Aufnahme des Wachstumsprofils von *C. glutamicum* unter Stickstoffüberschuss in MM1-Medium. Gezeigt ist der *online*-Verlauf der Sauerstofftransferrate (OTR 1 und 2) und der Kohlendioxidtransferrate (CTR 1 und 2) von zwei parallelen Kultivierungsexperimenten im *Respiration Activity Monitoring System* (RAMOS). Externe Proben zur Messung der optischen Dichte (OD_{600nm}) und des pH-Wertes wurden aus unter gleichen Bedingungen kultivierten Schüttelkolben gewonnen.

Die Kultur befand sich nach dem Animpfen erwartungsgemäß in einer *lag*-Phase, in der die OD_{600nm} , die OTR und die CTR nahezu unverändert blieben. Mit dem Übergang in die exponentielle Phase nach 2 bis 3 Stunden stieg nicht nur die Zellzahl an, sondern proportional dazu auch OTR und CTR. Die OTR spiegelt direkt den aktuellen O_2 -Verbrauch der Zelle wider, die CTR die CO_2 -Produktion. Der pH-Wert stieg in dieser Phase von 6,7 auf 8,6. Die Entstehung basischer Komponenten ist auf die Spaltung des zur Verfügung stehenden Harnstoff zurückzuführen. Da MM1-Medium als Pufferkomponente nur ein niedrig-molares Phosphatsalzgemisch enthält, wirkte sich dies extrem auf den pH-Wert des Mediums aus. Die exponentielle Phase ist aus OD_{600nm} -, OTR- und CTR-Verlauf ersichtlich (Bemerkung: zwischen den Probenahmen bei 14 und 23 Stunden wird durch den Verlauf der OD_{600nm} ein eher lineares Wachstum suggeriert, welches vermutlich nicht dem realen Verlauf entspricht). Bei einem Wert von ca. 20 mmol/(l·h) erreichte die OTR ein Plateau, welches für etwa 17 Stunden aufrecht erhalten wurde. Dieser Kurvenverlauf ist ein direktes Zeichen für eine vorliegende O_2 -Limitierung, *C. glutamicum* benötigte hier mehr Sauerstoff als durch Schütteln der Kolben in das System eingetragen werden konnte. Die CTR verlief synchron

zur OTR-Kurve und zeigte ein Plateau bei ca. 17 mmol/(l·h). In der Limitierungsphase wurde die stationäre Wachstumsphase erreicht und der pH-Wert sank auf einen Wert von ca. 5,5 ab. Durch Wachstum und Stoffwechselaktivität wurden die basischen Komponenten im Medium ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) verbraucht. Ergänzend könnte der pH-Abfall aus der Produktion von Säure resultieren. Für *C. glutamicum* ist bekannt, dass bei schlechter O_2 -Versorgung verstärkt Lactat und Isobutyrat gebildet wird (Sassi *et al.*, 1996). Nach 34 Stunden fielen OTR und CTR abrupt ab. Der lineare Abfall deutet darauf hin, dass zusätzlich zum O_2 ein weiteres unbekanntes Substrat limitierend vorlag. Die Zellzahl nahm in dieser Phase langsam ab. Nach ca. 42 Stunden stellten die Mikroorganismen ihre Stoffwechselaktivität komplett ein, OTR und CTR fielen innerhalb von zwei Stunden auf ihr Basislevel ab.

Die für die hier gesetzte Fragestellung interessante Versuchsphase ist der Übergang der *C. glutamicum*-Kultur in die O_2 -Limitierung. Zu diesem Zeitpunkt betrug die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ etwa 25. Da in der Versuchsplanung zur globalen Analyse von N-Hunger die Zellernte bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 4 bis 6 vorgesehen war, konnte eine O_2 -Limitierung unter den gewählten Versuchsbedingungen in MM1-Medium ausgeschlossen werden.

Als zweites Mineralsalzmedium kommt CgC-Medium in Frage. Aus Abb. 3.4 sind das OTR- und CTR-Profil, sowie $\text{OD}_{600\text{nm}}$ - und pH-Verlauf über der gesamten Versuchszeit gezeigt. An Hand des pH-Verlaufes wurde die bessere Pufferkapazität des Mediums deutlich. Dieser sank zunächst nur langsam ab, bei Eintreten der O_2 -Limitierung fiel er dann langsam auf einen für den Rest des Versuches konstanten Wert von etwa 5,0 ab. Der Einsatz von CgC-Medium hatte eine Verlängerung der Anwachsphase von *C. glutamicum* zur Folge. Erst nach ca. 6-7 h kam es zu einem Anstieg von Zellzahl, OTR und CTR. Die Kultur ging bereits bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 4-5 in die O_2 -Limitierung über, so dass kein exponentielles Wachstum zu beobachten war. Im Gegensatz zur Situation in MM1-Medium war der Quotient von CTR und OTR bis zum Eintreten der O_2 -Limitierung nicht nahezu gleich, sondern verminderte sich von einem Ausgangswert von ca. 0,5 auf 0,15. Dieser Quotient ist der respiratorische Quotient RQ, welcher näherungsweise Aufschluss über die Art der Substratverwertung und Stoffwechselaktivität geben kann. Reines Wachstum auf Glucose hat einen RQ von ca. 1 zur Folge, da CO_2 -Produktion und O_2 -Verbrauch ausgeglichen sind. Der deutlich unter diesem Wert liegende RQ lässt in der Anwachsphase in CgC-Medium auf ein Übergewicht an oxidativen Prozessen schließen. Der Anstieg des RQ nach Einsetzen der O_2 -Limitierung auf Werte bis zu 2,2 deutet auf verstärkt reduktive Prozesse hin. Danach pendelte er sich auf einen Wert von 0,8 ein (zum Vergleich: $\text{RQ}_{\text{MM1}} = \text{ca. } 0,9$). Nach etwa 30 Stunden begann der lineare Abfall der CTR. Dieser Zeitpunkt korrelierte mit dem Erreichen des minimalen, für *C. glutamicum* nicht mehr optimalen pH-Wertes von 5,0. Die OTR blieb unverändert, bis die Stoffwechselaktivität komplett eingeschränkt wurde.

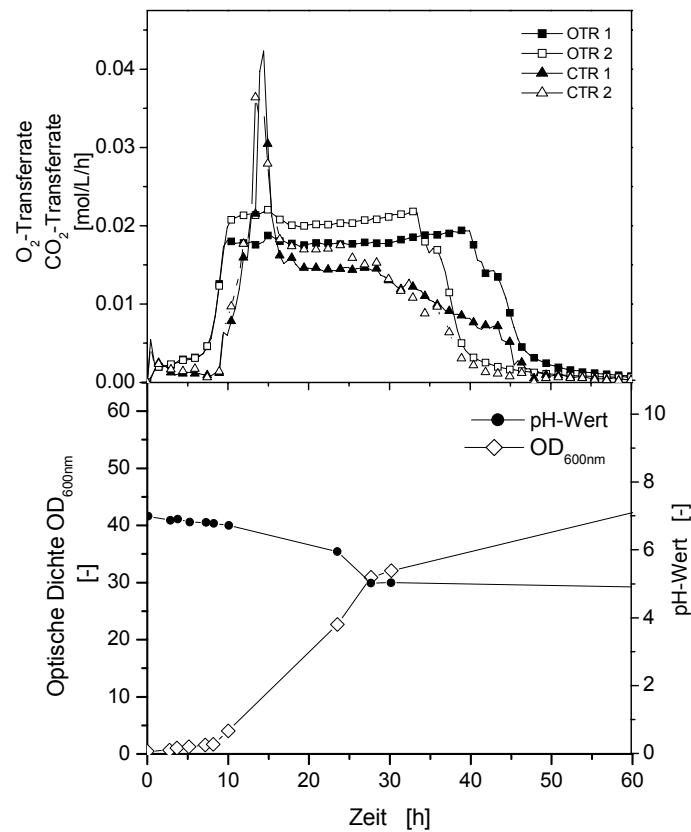


Abbildung 3.4: Aufnahme des Wachstumsprofils von *C. glutamicum* unter Stickstoffüberschuss in CgC-Medium. Gezeigt ist der *online*-Verlauf der Sauerstofftransferrate (OTR 1 und 2) und der Kohlendioxidtransferrate (CTR 1 und 2) von zwei parallelen Kultivierungsexperimenten im *Respiration Activity Monitoring System* (RAMOS). Externe Proben zur Messung der optischen Dichte (OD_{600nm}) und des pH-Wertes wurden aus unter gleichen Bedingungen kultivierten Schüttelkolben gewonnen.

Wie OTR- und CTR-Profil zeigen, ist CgC-Medium für den Einsatz zur globalen Analyse von N-Hunger ungeeignet. Einerseits konnte kein exponentielles Zellwachstum nachgewiesen werden und andererseits befanden sich die Zellen zum Zeitpunkt der geplanten Überimpfung bereits nahe der O_2 -Limitierung. Des weiteren deutet die Analyse des RQ auf mehrere unbekannte, schwer kontrollierbare Stoffwechselveränderungen hin.

Die Arbeiten von Schmid *et al.* (2000) zeigten einen erhöhten O_2 -Bedarf von N-gehungerten *C. glutamicum*-Zellen. Daher musste auch für die Kultivierung unter Stickstoffhunger eine O_2 -Limitierung ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen aus der Über-Nacht-Kultur mit einer $OD_{600nm} = 0,5$ in frisches MM1-Medium überimpft, bis zum Erreichen der exponentiellen Phase ($OD_{600nm} = 4$) kultiviert und in MM1oN-Medium in RAMOS-Messkolben überimpft. Aus Abb. 3.5 sind das OTR- und CTR-Profil, der OD_{600nm} - und der pH-Verlauf dieser Experimente ersichtlich.

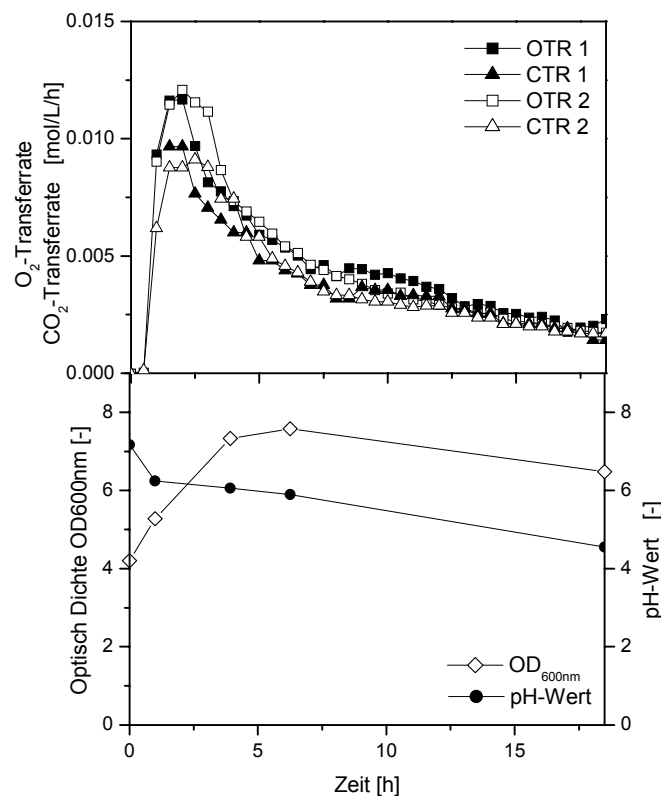


Abbildung 3.5: Aufnahme des Wachstumsprofils von *C. glutamicum* unter Stickstoffhunger in MM1oN-Medium. Gezeigt ist der *online*-Verlauf der Sauerstofftransferrate (OTR 1 und 2) und der Kohlendioxidtransferrate (CTR 1 und 2) von zwei parallelen Kultivierungsexperimenten im *Respiration Activity Monitoring System* (RAMOS). Externe Proben zur Messung der optischen Dichte (OD_{600nm}) und des pH-Wertes wurden aus unter gleichen Bedingungen kultivierten Schüttelkolben gewonnen.

Kurz vor der Überimpfung der Zellen in N-freies Medium lag die OTR bei einem Wert von 2 mmol/(l·h) und die CTR bei 0,8 mmol/(l·h). Unmittelbar danach stiegen OTR und CTR rapide an. Die Maximalwerte betragen ca. 12 mmol/(l·h) bzw. 9 mmol/(l·h) und bestätigten den erhöhten O_2 -Bedarf der Zellen. Eine O_2 -Limitierung konnte nicht beobachtet werden. N-gehungerte *C. glutamicum* konnten sich nur einmal verdoppeln, bevor das Zellwachstum eingeschränkt wurde. Der Verlauf der OTR-, CTR- und pH-Kurve zeigt an, dass die Stoffwechselaktivität erst deutlich später eingestellt wurde. Nach Erreichen der maximalen OD_{600nm} sanken die beiden *online*-Messgrößen und der pH-Wert nur langsam ab.

Eine O_2 -Limitierung konnte für die Induktion eines Stickstoffhungers in Schüttelkolben ausgeschlossen werden. Auch in ergänzenden Experimenten, bei denen die Zellen erst bei einer OD_{600nm} von 6 in MM1oN-Medium überimpft wurden, wurde eine O_2 -Limitierung nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Parallele Versuche unter Überführung der Zellen in CgCoN-Medium bei einer OD_{600nm} von 4 lieferten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Die Gefahr einer O₂-Limitierung besteht im Schüttelkolben nur in CgC-Medium. Beim Gebrauch von MM1- bzw. MM1oN-Medium ist eine O₂-Limitierung auszuschließen, wenn die Zellen bei Zelldichten von OD_{600nm} = 4-6 in den Hauptversuch eingesetzt werden. Die globale Analyse von N-Hunger wurde daher unter der Verwendung dieser Parameter durchgeführt.

3.2.2 Transkriptomanalyse

Die Methode der DNA-*Microarray*-Analyse ermöglicht den globalen Vergleich zweier Expressionsprofile. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit mit freundlicher Unterstützung von Andrea Hüser am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld durchgeführt.

Seit 2002 ist die Genomsequenz von *C. glutamicum* ATCC 13032 veröffentlicht (Ohnishi *et al.*, 2002 und Tauch *et al.*, 2002b). Von insgesamt 3568 putativen ORFs konnten 200-550 bp große, interne PCR-Produkte hergestellt werden, die in vierfacher Ausführung auf 3-Amino-propyltrimethoxysilan-beschichteten Glaträgern immobilisiert sind. Kalinowski *et al.* (2003) postulieren insgesamt 3002 tatsächlich für Proteine codierende Gene unter diesen ORFs; davon werden 2803 (93,4%) durch die DNA-*Microarrays* abgedeckt.

Um den Einfluss von N-Hunger in Schüttelkolben auf den Status des Transkriptoms zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*-Zellen, welche einem einstündigen N-Hunger ausgesetzt wurden, mit Gesamt-RNA aus einer identisch behandelten, jedoch unlimitierten Kontrolle verglichen. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde zunächst über RNA-Hybridisierungen (*Dot Blots*) überprüft. Nur in der N-gehungenerten Probe konnte die Anwesenheit von mRNA der AmtR-kontrollierten Gene *amtA* und *amtB* gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Da diese Gene nur unter N-Mangel transkribiert werden, war damit der Zustand des N-Hungers bewiesen. Die Zellen der Kontrolle waren unlimitiert.

Die beiden zu vergleichenden, fluoreszenzmarkierten Gesamt-cDNAs wurden gemischt und wie in Kap. 2.5.4 beschrieben zur Hybridisierung eingesetzt. Zur Auswertung der gescannten DNA-*Microarrays* wurde das Programm *ImaGene* (Biodiscovery, Los Angeles, USA) genutzt. Im Anschluss daran kam zur Normalisierung der Daten und zur statistischen Analyse via t-Test die *EMMA Microarray Datenanalyse-Software* (Dondrup *et al.*, 2003) zum Einsatz. Die systematischen Fehler, wie z.B. unterschiedliche physikalische Eigenschaften und Effizienzen der Fluoreszenzfarbstoffe, unterschiedliche Hybridisierungsbedingungen und verschiedene Scannereinstellungen, wurden dabei korrigiert.

Zur Validierung der Ergebnisse dienten zwei voneinander unabhängige biologische Replikate, die gemeinsam ausgewertet wurden. Jedem der 2803 vertretenen Kandidaten lagen daher acht Signale zur Auswertung zu Grunde. Nur Kandidaten, die in fünf von acht Fällen das gleiche Regulationsmuster und im t-Test einen statistischen Fehler von < 5%

aufwiesen, wurden in die weitere Analyse mit einbezogen. Alle Gene, deren Expressionslevel sich mit Faktoren von $\geq 1,74$ bzw. $\leq 0,57$ änderte, wurden als signifikant reguliert angesehen. Der gewählte Faktor basiert auf nicht veröffentlichten Daten von Andrea Hüser (Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung). Insgesamt gelang so die Auffindung von 250 regulierten Genen. Um die Diskussion im Folgenden zu erleichtern, wurde eine an den Funktionen der Genprodukte orientierte Unterteilung in neun Gruppen vorgenommen: (1) Transportproteine, (2) N-Metabolismus, (3) C-Metabolismus, (4) Nucleotidstoffwechsel, (5) Proteinsynthese, (6) Signaltransduktion und Regulation, (7) andere Funktionen, (8) hypothetische Proteine und (9) hypothetische Membranproteine. Aus Abb. 3.6 ist der Anteil jeder der genannten Gruppen am „Gesamtregulon“ ersichtlich.

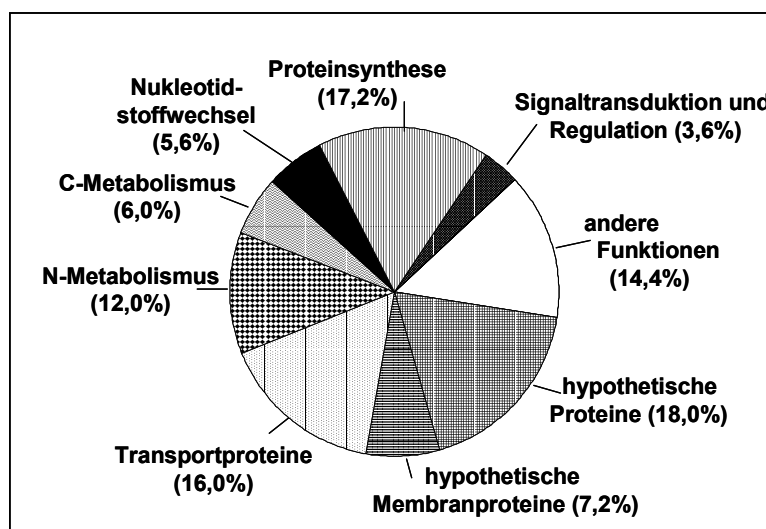


Abbildung 3.6: Anteil der funktionellen Gruppen an der Gesamtheit regulierter Gene.

Von den 250 regulierten Genen wurden 103 unter N-Hunger induziert (Faktor $\geq 1,74$) und 147 reprimiert (Faktor $\leq 0,57$). Alle Gene sind in Tabelle 7.1 im Anhang unter Angabe des zugehörigen Regulationsfaktors aufgelistet.

Tabelle 3.3 liefert in einer vereinfachten Version einen Überblick über die wichtigsten regulierten Gene und ihre Funktion. Die beiden Gruppen „hypothetische Proteine“ und „hypothetische Membranproteine“ wurden wegen des geringen Informationsgehaltes bei der Erstellung ignoriert.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der wichtigen, verändert transkribierten Gene nach Induktion eines N-Hungers in Schüttelkolben. Zur Vereinfachung sind die Gene in sieben funktionelle Gruppen (Transport, N-Metabolismus, C-Metabolismus, Signaltransduktion und Regulation, Nukleotidstoffwechsel, Proteinsynthese und andere Funktionen) eingeteilt. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr.), zusätzlich ist (falls vorhanden) der Genname angegeben Unter „Faktor“ ist die Art der Regulation als Induktion ($\geq 1,74$) oder Repression ($\leq 0,57$) der Gene unter N-Hunger angeführt. Der zugehörige Regulationsfaktor und die spezifische Annotation für jedes Gen sind der Tabelle 7.1 im Anhang zu entnehmen. Abkürzungen und Indices: * = Gen des AmtR-Regulons, ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003), ^b = nach Gerstmeir *et al.* (2004), put. = putativ

Gruppe	Faktor	NCgl-Nr.	Genname	Funktion
Transport	$\geq 1,74$	1521*, 1983*	<i>amtA</i> [*] , <i>amtB</i> [*]	Ammoniumtransport
		0893-97*	<i>urtABCDE</i> [*]	Harnstofftransport
		0074*	<i>crnT</i> [*]	Creatinintransport
		2463		put. Dicarboxylattransport
		0774, 2685, 2686		Kationentransport
		0790		put. Permease
	$\leq 0,57$	0856, 1116	<i>betP</i> , <i>putP</i>	Transport von kompatiblen Soluten
		1305, 2373, 2377, 2553	<i>ptsG</i> , <i>ptsS</i> , <i>msiK1</i> ^a	Zuckertransport
		1875-78*	<i>gluACD</i> [*]	Glutamattransport
		0100, 0799		put. Aminosäuretransport
		1915 ^{a*}		put. Oligopeptidtransport
		0378-80, 0646, 1096, 2787		Kationentransport
		0344 ^a	<i>wzx</i> ^a	put. Export
		2168-69		uncharakterisierter ABC-Transport
		0178, 2302*, 2713	<i>vanK</i> ^{a*}	put. Permease
N-Metabolismus	$\geq 1,74$	0075*	<i>codA</i> [*]	Creatininmetabolismus
		0181-82*, 2133*	<i>gltBD</i> [*] , <i>glnA</i> [*]	NH ₄ ⁺ -Assimilation
		0083-0089*	<i>ureACEFG</i> <i>D</i> [*]	Harnstoffmetabolismus
		1061	<i>dapD</i>	Diaminopimelatsynthese
		0954, 1519*	<i>glyA</i> , <i>soxA</i> [*]	Glycinsynthese
		2123	<i>ilvE</i>	Isoleucinbiosynthese
		1094	<i>metE</i> ^a	Methioninbiosynthese
		0794, 1235	<i>serC</i> , <i>serA</i>	Serinbiosynthese
		1520*	<i>ocd</i> [*]	Prolinsynthese
	$\leq 0,57$	0950, 1560	<i>aroF</i> , <i>aroK</i>	Biosynthese aromatischer Aminosäuren
		2473, 2715-19	<i>cysK</i> , <i>cysNDHIJ</i>	Cysteinbiosynthese
2274		<i>proB</i>	Prolinbiosynthese	

Fortsetzung Tabelle 3.3

Gruppe	Faktor	NCgl-Nr.	Gen-name	Funktion
C-Metabolismus	≥ 1,74	1482	<i>acn</i>	Tricarbonsäurezyklus
		2521	<i>poxB^a</i>	Pyruvatmetabolismus
		2582	<i>butA</i>	Butandioloxidation
	≤ 0,57	2247-48	<i>aceAB</i>	Glyoxylatzyklus
		0360, 2476-77	<i>sdhA, sucCD^a</i>	Tricarbonsäurezyklus
2689, 2709		<i>adhA</i>	Alkohol- und Aldehydoxidation	
	0802		Fettsäuresynthese	
Nukleotidstoffwechsel	≥ 1,74	1362*	<i>pyrG^a</i>	CTP-Synthese
		1075, 1375	<i>sigE</i>	Nukleotidsynthese
	≤ 0,57	0540	<i>rpoA</i>	RNA-Synthese
		0675, 1911		Nukleotidbindung
		2992	<i>rnpA^a</i>	RNA-Abbau
	1372	<i>cmk^a</i>	CTP-Synthese	
Proteinsynthese	≥ 1,74	0841, 1442, 1932	<i>pepC, map2</i>	Protein- und Peptidabbau
		0898	<i>pth2</i>	Peptidyl-tRNA-Hydrolyse
		1100*		(nicht ribosomale) Peptidsynthese
	≤ 0,57	34 Gene		ribosomale Proteine
		0536, 1324, 1910	<i>infABC</i>	Translationsinitiation
	0916	<i>ggtB^a</i>	Peptidsynthese	
Signaltransduktion und Regulation	≥ 1,74	1981*, 1982*	<i>glnD*, glnK*</i>	Signaltransduktionsproteine der N-Kontrolle
		2684		Transkriptionsregulation
		2518	<i>cgtR3</i>	Regulationsprotein
	≤ 0,57	0176, 0358, 0711	<i>ramB^b, whiB2^a</i>	Transkriptionsregulation
		0275	<i>whiB4^a</i>	Regulationsprotein
andere Funktionen	≥ 1,74	0090, 1099*, 1383		put. Hydrolyse
		2537	<i>otsB</i>	Trehalosesynthese
		0243		Zellwandsynthese
	≤ 0,57	2991	<i>yidC</i>	Präproteintranslokation
		0033, 0338, 1470, 1858	<i>ppiA, argK, ptpA2^a, ptsI</i>	Proteinmodifikation
		2081	<i>mraY^a</i>	Zellwandsynthese
		0171, 0786, 2826	<i>cspA, sod</i>	Stressantwort

Die Zelle reagierte auf die Induktion des N-Hungers im Schüttelkolben mit der Regulation vieler Gene, Transkriptionsänderungen mit Faktoren zwischen 0,16 und 12,5 wurden beobachtet. Im Folgenden ist grundsätzlich das Transkriptom unter N-Hunger der Bezugspunkt, d.h. unter N-Hunger verstärkt transkribierte Gene werden als induziert und unter dieser Bedingung vermindert transkribierte Gene als reprimiert bezeichnet.

Eine große Gruppe bildeten die Gene, welche für Transportproteine codieren (16,0%). Insbesondere Gene des Transportes alternativer Stickstoffquellen und Ammonium waren als Reaktion auf den N-Hunger induziert. Dazu gehören die Gene *amtA* und *amtB* (NH_4^+ -Transporter), *urtABCDE* (Harnstofftransporter) und *cmT* (Creatininpermease). Die genannten Gene stehen unter AmtR-Kontrolle und wiesen sehr hohe Regulationsfaktoren von 8-12 auf. Die Regulation von fünf weiteren Genen des AmtR-Regulons war entgegengerichtet: die Gene NCgl1915 (Komponente eines putativen Oligopeptidtransporters), *gluACD* (Glutamattransporter), und *vanK* (put. Vanillatranporter) wiesen aus ungeklärter Ursache mit Faktoren zwischen 0,37 und 0,6 eine 1,6- bis 2,7-fache Repression auf. Reprimiert waren auch zwei für Aminosäuretransporter codierende Gene, NCgl0100 (put. p-Aminobenzoylglutamattransporter) und NCgl0799 (put. Na^+ /Prolin- Na^+ -Pantothenatsympporter) sowie *yidC* (putative Präproteintranslokase). Mit der Induktion von NCgl0774 (Fe^{3+} -Transporter), NCgl2685 (Co/Zn/Cd-Transporter) und NCgl2686 (Flavoprotein des K^+ -Transportes), welche mit der verminderten Transkription der Gene NCgl0378-80, NCgl0646 (Fe^{3+} -Transporter), NCgl1096 und NCgl2787 (Flavoproteine des K^+ -Transportes) einherging, konnten Hinweise auf die Neuregulation des Ionentransportes gefunden werden. Die Expression weiterer für Membranproteine codierende Gene war in Folge des N-Hungers erniedrigt. Betroffen sind fünf Gene, deren Genprodukte in den Zuckertransport (*ptsG*, *ptsS*, *msiK1* und NCgl2373) und in den Transport organischer Säuren (NCgl2463) involviert sind. Das Gen *wzx* codiert nach Kalinowski et al. (2003) für eine in den Export eines Zelloberflächenpolysaccharides involvierte Translokase. *C. glutamicum* verminderte außerdem die Synthese von *betP* (Glycinbetaintransporter) und *proP* (Prolintransporter), zwei für Transporter kompatibler Solute codierende Gene. Kompatible Solute werden bei hyperosmotischem Stress in der Zelle akkumuliert (Morbach und Krämer, 2003), sie sind nicht verstoffwechselbar. Durch die Regulation von Transportern für verschiedene C-Quellen und kompatible Solute auf Transkriptionsebene wird deutlich, dass die Zelle versucht, ihre metabolische Aktivität und überflüssigen Energieverbrauch einzuschränken. Die restlichen Kandidaten aus der Gruppe "Transport" codieren für uncharakterisierte ABC-Transporter und Permeasen und waren überwiegend reprimiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Transportproteine einen entscheidenden Anteil in der zellulären Reaktion auf N-Hunger bei *C. glutamicum* haben, ihre Bedeutung wurde durch die Regulation von weiteren 18 uncharakterisierten Proteinen mit putativen Transmembranhelices unterstrichen.

Auf die Induktion des N-Hungers zeigte *C. glutamicum* erwartungsgemäß eine starke Reaktion auf der Ebene des N-Metabolismus. Mit *codA* (Creatinindeaminase), *glnA* (GS), *gltBD* (GOGAT) und *ureACEFGD* (Urease) waren viele Gene induziert, über deren Genprodukte die Zelle importierte alternative N-Quellen wie Creatinin, Glutamat, NH_4^+ , Harnstoff metabolisieren kann. Es handelt sich bei den genannten Genen ausnahmslos um

AmtR-regulierte Gene, deren Transkription zwischen 5- und 12-fach heraufgesetzt war. Desweiteren lagen sechs Gene der Aminosäurebiosynthese (*dapD*, *glyA*, *ilvE*, *metE*, *serA*, *serC*) und zwei Gene der alternativen Aminosäuresynthese (*soxA*, *ocd*) induziert vor. Von dieser Regulation sind die Diaminopimelat-, die Glycin-, die Isoleucin-, die Methionin- und die Serinbiosynthese sowie zwei alternative Wege zur Glycin- bzw. Prolinsynthese direkt betroffen. Die Transkription von neun weiteren Genen der Aminosäurebiosynthese, *aroF* und *aroK* (Biosynthese aromatischer Aminosäuren), *cysK* und *cysNDHIJ* (Cysteinbiosynthese) und *proB* (Prolinbiosynthese) war herabgesetzt. Das genaue Prinzip der beschriebenen Regulation der Aminosäuresynthesewege bleibt unklar.

Innerhalb des C-Metabolismus wurden verhältnismäßig wenige Gene reguliert. Nur drei Gene waren unter N-Hunger mit Regulationsfaktoren von 2-3 moderat induziert. Das *acn*-Gen codiert die Aconitase, *butA* codiert für eine L-2,3-Butandioldehydrogenase und *poxB* codiert die Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase (Prof. Dr. B. Eikmanns, persönliche Mitteilung). Die Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase aus *C. glutamicum* konnte kürzlich biochemisch charakterisiert werden (Schreiner und Eikmanns, zur Publikation eingereicht). Sie katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Acetat und scheint bei N-Hunger an der Auffüllung des Tricarbonsäurezyklus beteiligt zu sein. Die genaue physiologische Funktion dieses Enzyms ist noch unklar. Eine Transkriptionsregulation bei anderen, anapleurotischen Stoffwechselwegen zur Erfüllung dieses Zweckes konnte nicht gezeigt werden. Gene mit Funktion im C-Metabolismus und herunterregulierter Transkription waren neben NCgl0802 (Fettsäuresynthase) *sucC*, *sucD* (α - & β -Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthase) und *sdhA* (Succinat-Dehydrogenase). Die zugehörigen drei Genprodukte katalysieren zwei aufeinanderfolgende Enzymreaktionen des Tricarbonsäurezyklus, deren verminderte Synthese eine reduzierte Umsetzung von Succinyl-CoA über Succinat zu Fumarat zur Folge hätte. Die Repression der Glyoxylatzyklus-Gene *aceA* (Isocitratlyase) und *aceB* (Malatsynthase) zeigte an, dass dieser Weg in N-gehungerten Zellen nicht essentiell war.

Auf der Ebene des Nukleotidstoffwechsels schränkte die N-gehungerte Zelle ihre Möglichkeiten ein, in dem sie die Gene *rpoA* (α -Untereinheit der DNA-gerichtete RNA-Polymerase), NCgl1375 (DNA-Gyraseinhibitor), *cmk* (CTP-Synthase), NCgl0675 (Nukleotidbindeprotein) und NCgl1911 (Nukleinsäurebindeprotein) reprimiert. Das Gen *rnpA* codiert für die RNase P, was auf eine Verminderung des RNA-Abbaus unter N-Hunger schließen lässt. Nur *pyrG* (CTP-Synthase) und *sigE* (σ -Untereinheit der RNA-Polymerase) lagen in dieser Gruppe induziert vor. Das *pyrG*-Gen konnte als eines der 37 AmtR-regulierten Gene identifiziert werden, deren Transkription in Folge des N-Hungers freigegeben wird (Beckers, 2004).

Als Reaktion auf eintretenden N-Hunger konnte an Hand der durchgeführten DNA-*Microarrays* eine Reduktion der Proteinsynthesekapazität bei *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Die Genprodukte von drei etwa 1,8-fach heraufregulierten Genen haben eine Funktion in Protein- und Peptidabbau: NCgl0841 codiert für eine Serinprotease, *pepC* und *map2* für zwei Aminopeptidasen. Die 5,5-fache Induktion von *pth2*, welches für eine Peptidyl-tRNA-Hydrolase codiert, steht vermutlich im Zusammenhang mit der Regulation dieser drei Gene. Eine vermehrte Präsenz der Peptidyl-tRNA-Hydrolase würde fortlaufende Proteinsynthesen unterbrechen. Unvollständig synthetisierte Peptide könnten dann dem Abbau zugeführt werden. Zusätzlich bestätigte die verminderte Transkription von insgesamt 34 für ribosomale Proteine codierenden Genen sowie von *infA*, *infB* und *infC* (Translationsinitiationsfaktoren), von *rpoA* (DNA-gerichtete RNA-Polymerase α -Untereinheit) und von *ggtB* (γ -Glutamyltranspeptidase) die Einschränkung der Protein- und Peptidsynthese im Schüttelkolben. Außerdem deutete die Expression von *sigE* (alternativer Sigmafaktor) eine gerichtete Antwort auf Transkriptionsebene an. Die Induktion des Genes NCgl1100 (nicht-ribosomale Peptidsynthase) entsprach auf Grund seiner Zugehörigkeit zum AmtR-Regulon den Erwartungen.

Die DNA-*Microarray*-Analyse ergab eine stark erhöhte Transkription für die Gene *glnK* und *glnD*. Diese Regulation ist entscheidend für die Antwort von *C. glutamicum* auf N-Hunger, da die zugehörigen Genprodukte die zentralen Komponenten der Signaltransduktion innerhalb der N-Kontrolle darstellen (Nolden *et al.*, 2001b). Metabolische Stoffwechselwege einer Zelle funktionieren in der Regel nicht als separate Einheit, sondern sind über gemeinsame Metabolite und globale Regulationssysteme miteinander verknüpft. Das dies vermutlich auch für die N-Kontrolle zutrifft, verdeutlicht die veränderte Transkription weiterer Gene für Regulationsproteine (*cgtR3* und *whiB4*) und Transkriptionsregulatoren (NCgl2684, NCgl0176, *whiB2* und *ramB*). Über die genauen Mechanismen und Verknüpfungspunkte der N-Kontrolle zu anderen Stoffwechselwegen ist bis dato nur wenig bekannt.

In Folge des N-Hungers wurden insgesamt 36 weitere Gene reguliert, deren Genprodukten andere spezifische Funktionen zugeordnet werden können. Eine wichtige Rolle scheinen Gene zu spielen, deren Genprodukte direkt und indirekt an der Trehalose- und Zellwand-synthese beteiligt sind. Trehalose ist ein wichtiger Bestandteil der *C. glutamicum*-Zellwand, dient der Stressprotektion und kann sowohl als Kohlenstoff- als auch als Energiequelle dienen. Sie kann über drei alternative Wege synthetisiert werden, den OtsA/B-, den TreYZ- und den TreS-Weg (Wolf *et al.*, 2003). Das *otsB*-Gen (Trehalose-6-Phosphatase) konnte in N-gehungerten Zellen als induziert nachgewiesen werden. Mit *dapD* (Tetrahydrodipicolinat-succinyltransferase) und NCgl0243 (UDP-N-Acetylmuramyltripeptidsynthase) wurden zwei weitere Gene verstärkt transkribiert, deren Genprodukte direkt an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. Die Repression von *mraY* (UDP-N-Acetylmuramylpentapeptidphospho-

transferase) bleibt ungeklärt. Eine verstärkte Transkription konnte für drei Gene nachgewiesen werden, welche für putative Hydrolasen codieren (NCgl0090, NCgl1099 und NCgl1383). Die verminderte Transkription der Gene *ptpA2* (Proteintyrosinphosphatase), *argK* (putative periplasmatische Proteinkinase), *ptsI* (Phosphoenolpyruvat-Proteinkinase), *ppiA* (Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase) und auch die Induktion von *cgtR3* (Response-Regulator eines 2-Komponentensystem) ist vermutlich im Zusammenhang mit dem Einfluss des N-Hungers auf funktionell nicht bekannte Regulationsnetzwerke zu sehen. Über die Modifikation von Proteinen funktionieren Signalkaskaden, sie sind essentiell für die Signalübertragung.

Neben *betP* und *putP* wurden auch Gene reprimiert, deren Genprodukte an der Antwort auf andere Stresssituationen beteiligt sind. Dazu zählen *sod* (Superoxiddismutase, O₂-Stress), *cspA* und NCgl0786 (Kälteschockproteine).

Zusammenfassend konnte auf Transkriptomebene gezeigt werden, dass *C. glutamicum* auf N-Hunger mit einer vielschichtigen Regulation auf mehreren Ebenen reagierte. Die starke Einschränkung energieverbrauchender Transportprozesse, des Nukleotidstoffwechsels, der Proteinsynthesekapazität und der Stressantwort geben Hinweise darauf, dass *C. glutamicum* in eine Art Energiesparmodus umschaltete. Überlebenswichtige Prozesse, wie z.B. der Transport von N-Quellen in die Zelle, der N-Metabolismus und die Zellwandsynthese wurden durch verstärkte Transkription entsprechender Gene aufrechterhalten.

3.2.3 Proteomanalyse

Die globale Analyse von N-Hunger bei *C. glutamicum* umfasste im Rahmen dieser Arbeit zunächst die in Kap. 3.2.2 vorgestellten Studien auf Expressionsebene. Änderungen in der Expression von Genen sollten sich auch auf Proteinebene widerspiegeln. Daher wurde die DNA-Microarray-Analyse mit einer globalen Analyse des cytoplasmatischen Proteoms mittels 2-D-PAGE ergänzt.

Für den Proteomvergleich wurden die cytoplasmatischen Proteinfractionen aus nicht gehungerten und N-gehungen Zellen gewonnen und in der ersten Dimension über einen pH-Bereich von 4-7 nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Anschließend erfolgte in der zweiten Dimension eine Separation nach dem Molekulargewicht. Unterschiede im Proteomprofil der beiden Coomassie-gefärbten Proteinfractionen konnten mit Hilfe der *warp*-Funktion des Programms *Delta2D* (Decodon, Greifswald, D) in einer Falschfarbendarstellung visualisiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 3.7 zeigt die Proteomprofile von *C. glutamicum*-Zellen, welche unter N-Überschuss (Abb. 3.7A) und unter N-Hunger (Abb. 3.7B) kultiviert wurden. Allein der visuelle Vergleich zeigte keine markanten Veränderungen im Proteommuster N-gehungerter Zellen.

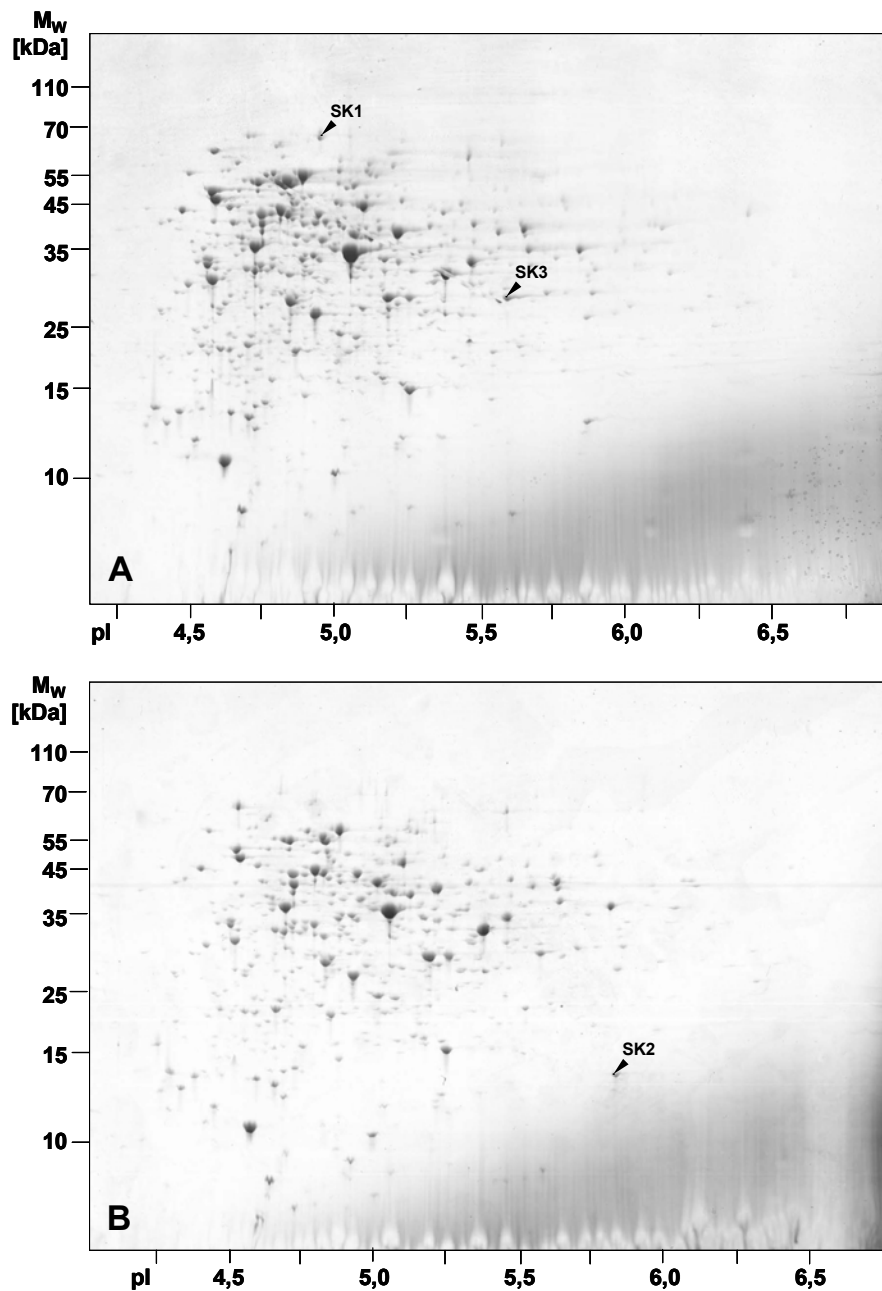


Abbildung 3.7: Proteommuster der cytoplasmatischen Proteinfraction von *C. glutamicum* nach Kultivierung bei unterschiedlicher Stickstoffverfügbarkeit. Die Zellen wurden im Schüttelkolben unter Stickstoffüberschuss (A) und unter Stickstoffhunger (B) kultiviert. Jeweils 100 μ g Protein wurden über 2-D-PAGE getrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Das apparente Molekulargewicht M_w der Proteine in kDa sowie der dargestellte pH-Bereich sind angegeben. Die markierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Mit Hilfe der Quantifizierungsfunktion von *Delta2D* wurden die Proteine mengenmäßig erfasst und der Regulationsfaktor ermittelt. Der statistischen Absicherung dienten 2-D-Gele von zwei unabhängigen biologischen Versuchen (biologische Replikate), welche für jeden Zustand zweimal wiederholt (technische Replikate) und ausgewertet wurden. Als signifikant reguliert galten nur Proteine, für die ein Faktor $\geq 2,0$ bzw. $\leq 0,5$ nachgewiesen werden konnte

und die in allen biologischen und technischen Replikaten das gleiche Regulationsmuster zeigten. Die regulierten Proteine wurden ausgeschnitten und über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert.

Die Analyse des Proteomprofils von ausreichend mit Stickstoff versorgten und N-gehungenerten *C. glutamicum*-Zellen lieferte keine markanten Unterschiede. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Regulation für die 3 in Tabelle 3.4 aufgelisteten Proteine. Unter N-Hunger konnte eine verminderte Synthese von zwei Proteinen gezeigt werden, der β -Untereinheit der DNA-gerichteten RNA-Polymerase (SK1) und des ribosomalen Proteins S2 (SK3). Als einziger Kandidat wurde das ribosomale Protein L10 (SK2) leicht verstärkt synthetisiert.

Tabelle 3.4: Im Rahmen der globalen Analyse von Stickstoffhunger identifizierte Proteine aus *C. glutamicum*. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben.

Spot	NCgl-Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
SK1	0471	<i>rpoB</i>	β -Untereinheit der DNA-gerichteten RNA-Polymerase	128,2	4,87
SK2	0468	<i>rplJ</i>	ribosomales Protein L10	18,0	5,63
SK3	1950	<i>rpsB</i>	ribosomales Protein S2	30,1	5,35

Der Abgleich mit den Daten aus der Analyse des Expressionsprofils ergab keine direkten Übereinstimmungen. Nur tendenziell kann durch die drei identifizierten Proteine eine Regulation in die gleiche Richtung angenommen werden. So war beispielsweise auf Proteomebene für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase unter unlimitierten Bedingungen eine verstärkte Proteinmenge nachweisbar, für das die α -Untereinheit codierende Gen (*rpoA*) konnte auf Transkriptomebene eine Repression gezeigt werden.

Mehrere Hinweise deuteten auf Expressionsebene auf die Umstellung der N-gehungenerten Zellen in eine Art Energiesparmodus hin. Die Verifikation dieser Ergebnisse auf Proteomebene gelang jedoch nicht. Für eine veränderte Proteinsynthese konnten keine Beweise auf 2-D-Gelen gefunden werden. Die Reaktion auf N-Hunger war offensichtlich auf die Expressionsebene begrenzt.

3.3 Globale Analyse einer Stickstofflimitierung

Im Rahmen dieses Teilprojektes sollte der Einfluss einer Stickstofflimitierung auf Transkriptom- und Proteomebene von *C. glutamicum* charakterisiert werden. Der Gegensatz zu N-Hunger besteht darin, dass die N-Quelle nicht abrupt entzogen, sondern kontinuierlich auf einem gleichbleibend niedrigen Level zur Verfügung gestellt wird. Ein solcher Limitierungszustand kann im Labormaßstab durch eine kontinuierliche Fermentation realisiert werden.

Nach dem Animpfen wurde *C. glutamicum* im geschlossenen Fermenter (*batch*-Modus) bis zu einer OD_{600nm} von 18 kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt lag die N-Quelle noch im Überschuss vor, so dass für Transkriptom- und Proteomanalyse eine unlimitierte Kontrollprobe genommen werden konnte. Dann wurden Substrat- und Erntevorlage angeschlossen und eine Durchflussrate von 0,075 l/(l·h) eingestellt. Nach Erreichen des stationären Gleichgewichtes wurde die erste N-limitierte Probe für Transkriptom- und Proteomanalyse (D_{kl}) genommen, dann die Durchflussrate auf 0,15 l/(l·h) erhöht und nach Erreichen des neuen Gleichgewichtszustandes eine zweite N-limitierte Probe (D_{gr}) gezogen. Zur Validierung der Ergebnisse erfolgte die Durchführung von zwei vollkommen unabhängigen Fermentationen nach diesem Schema. Eine Fermentation konnte über eine Durchflussrate von 0,15 l/(l·h) hinaus stabil betrieben werden, so dass auch eine Probe bei 0,3 l/(l·h) zur Proteomanalyse verwendet werden konnte.

3.3.1 Transkriptomanalyse

Analog zum Vergleich der Expressionsprofile von ausreichend mit Stickstoff versorgten und N-gehungerten *C. glutamicum*-Zellen (Kap. 3.2.2) wurden mit DNA-*Microarrays* der gleichen Charge Vergleiche unlimitierter und N-limitierter *C. glutamicum*-Zellen auf Transkriptionsebene angestellt. Um den Einfluss einer N-Limitierung auf den Status des Transkriptoms zu untersuchen, wurden drei Gesamt-RNAs aus fermentativ kultivierten *C. glutamicum* gewonnen. Eine *batch*-Probe lieferte RNA unlimitierter Zellen. Außerdem standen zwei N-limitierte Proben zur Verfügung (D_{kl} , D_{gr}). Die Qualität aller Gesamt-RNAs wurde zunächst über RNA-Hybridisierungen (*Dot Blots*) unter Verwendung von *amtA*- und *amtB*-RNA-Sonden überprüft. In der *batch*-Probe konnte kein Signal erhalten werden, die Zellen der Kontrolle unterlagen also keiner N-Limitierung. In den beiden Proben D_{kl} und D_{gr} konnten dagegen starke Signale mit diesen Sonden detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da diese AmtR-kontrollierten Gene nur unter N-Mangel transkribiert werden, war damit der Zustand der N-Limitierung bewiesen.

Pro Fermentation wurden drei Vergleiche durchgeführt: (1) unlimitierte mit N-limitierten Zellen bei kleiner Durchflussrate [*batch* vs. D_{kl}], (2) unlimitierte mit N-limitierten Zellen bei großer Durchflussrate [*batch* vs. D_{gr}] und (3) die N-limitierten Zustände miteinander [D_{kl} vs. D_{gr}]. Das Vorgehen im experimentellen Teil und bei der Datenauswertung entspricht der in Kap. 2.5.4 beschriebenen. Die erhaltenen Daten wurden durch 2 unabhängige biologische Replikate validiert und beide DNA-Microarrays eines Vergleiches gemäß der in Kap. 3.2.2 festgelegten Kriterien gemeinsam ausgewertet. Alle Gene, deren Expression sich um einen Faktor von $\geq 1,74$ bzw. $\leq 0,57$ änderte, galten als signifikant reguliert.

3.3.1.1 Expressionsprofile unlimitierter und stickstofflimitierter Zellen

Zunächst wurde das Transkriptom von *C. glutamicum* unter N-Überschussbedingungen mit dem unter N-Limitierung verglichen (*batch* vs. D_{kl} und *batch* vs. D_{gr}). Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die regulierten Gene nach den Funktionen ihrer Genprodukte in 10 Gruppen unterteilt: (1) Transportproteine, (2) N-Metabolismus, (3) C-Metabolismus, (4) Energiestoffwechsel, (5) Nukleotidstoffwechsel, (6) Proteinsynthese, (7) Signaltransduktion und Regulation, (8) andere Funktionen, (9) hypothetische Proteine und (10) hypothetische Membranproteine. Aus Abb. 3.8 ist der Anteil jeder Gruppe am „Gesamtregulon“ ersichtlich.

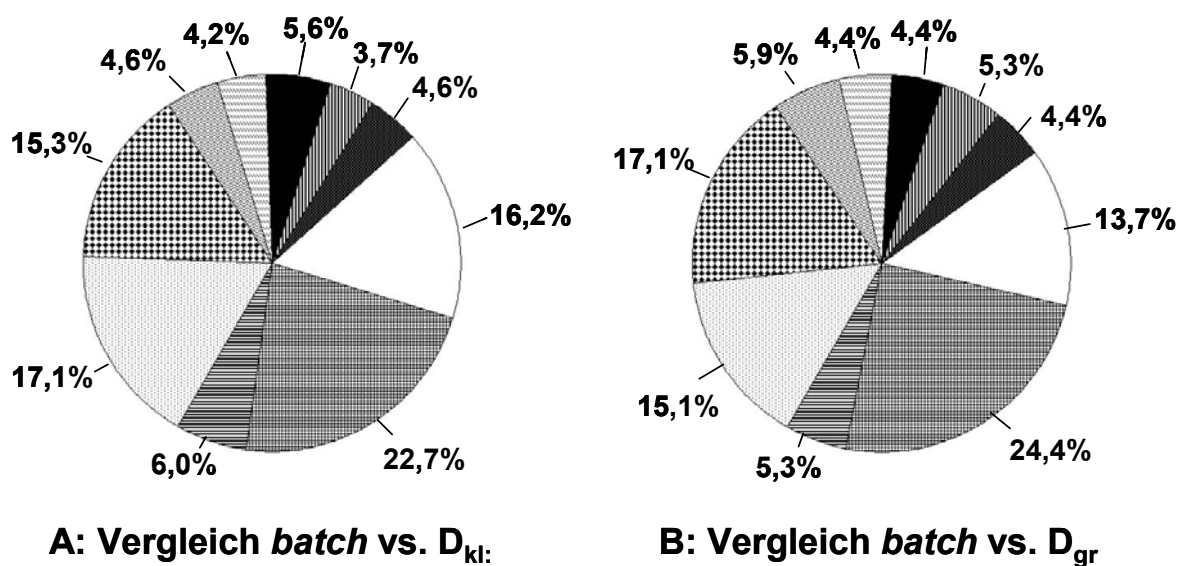


Abbildung 3.8: Anteil der funktionellen Gruppen an der Gesamtheit regulierter Gene.

Im Vergleich „*batch* vs. D_{kl} “ konnten insgesamt 216 regulierte Gene gefunden werden. 111 Gene waren unter N-Limitierung induziert (Faktor $\geq 1,74$) und 105 reprimiert (Faktor $\leq 0,57$). Der Vergleich „*batch* vs. D_{gr} “ ergab insgesamt 205 regulierte Gene, davon waren 104 verstärkt und 101 vermindert unter N-Limitierung transkribiert. Alle Gene sind in Tabelle 7.1 im Anhang unter Angabe des zugehörigen Regulationsfaktors aufgelistet. Aus praktischen Gründen wurden die beiden Vergleiche zusammengefasst. Die Tabelle 3.5 liefert in gekürzter Version einen Überblick über die wichtigsten regulierten Gene und ihre Funktion. Dabei wurden wegen des minimalen Informationsgehaltes die beiden Gruppen „hypothetische Proteine“ und „hypothetische Membranproteine“ ignoriert.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der wichtigsten, regulierten Gene unter N-Limitierung im kontinuierlichen Fermentationsversuch. Zur Vereinfachung sind die Gene in acht funktionelle Gruppen (Transport, N-Metabolismus, C-Metabolismus, Energiestoffwechsel, Signaltransduktion und Regulation, Nukleotidstoffwechsel, Proteinsynthese und andere Funktionen) eingeteilt. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr.), zusätzlich ist (falls vorhanden) der Genname angegeben. Unter „Faktor“ ist die Art der Regulation als Induktion ($\geq 1,74$) oder Repression ($\leq 0,57$) der Gene angedeutet. Genaue Regulationsfaktoren sind der Tabelle 7.1 im Anhang zu entnehmen. Abkürzungen und Indices: * = Gen des AmtR-Regulons, ¹ = nur bei geringer Wachstumsrate reguliert, ² = nur bei hoher Wachstumsrate reguliert, ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003), put. = putativ

Gruppe	Faktor	NCgl-Nr.	Gen-name	Funktion
Transport	$\geq 1,74$	1521*, 1983*	<i>amtA</i> [*] , <i>amtB</i> [*]	Ammoniumtransport
		1875-78*	<i>gluABCD</i> [*]	Gutamattransport
		0893-97*	<i>urtABCDE</i> [*]	Harnstofftransport
		0074*	<i>crnT</i> [*]	Creatinintransport
		1915-16 ^{a*} , 1918 ^{a*}		put. Oligopeptidtransport
		2051 ^a		put. Aminosäuretransport
		1101 ^a	<i>cydC</i> ^a	put. Protein-Lipid-ABC-Transport
		1305, 2377	<i>ptsG</i> , <i>msiK1</i> ^a	Zuckertransport
		1968 ¹ , 2808 ²	<i>gntP</i> ²	Transport organischer Säuren
	$\leq 0,57$	0856, 1116 ²	<i>betP</i> , <i>putP</i> ²	Transport kompatibler Soluten
		0329, 0618 ¹ , 0774, 0776 ¹ , 1034 ² -35, -37	<i>chaA</i> ^a	Kationentransport
		0344	<i>wzx</i> ^a	put. Exportprotein
		0909 ¹ , 1623 ¹ , 2650 ¹ -51		uncharakterisierter ABC-Transport
N-Metabolismus	$\geq 1,74$	0075*	<i>codA</i> [*]	Creatininmetabolismus
		0181-82*	<i>gltBD</i> [*] , <i>glnA</i> [*]	NH ₄ ⁺ - und Glutamatassimilation
		0083-89*	<i>ureABCEFG</i> <i>D</i> [*]	Harnstoffmetabolismus
		1061	<i>dapD</i>	Diaminopimelatsynthese
		1519*	<i>soxA</i> [*]	alternative Glycinsynthese
		0788, 2473, 1520*	<i>ocd</i> [*] , <i>cysK</i>	NH ₃ -Bereitstellung

Fortsetzung Tabelle 3.5:

Gruppe	Faktor	NCgl-Nr.	Gen-name	Funktion
N-Metabolismus	≤ 0,57	1132, 1340-47	<i>argS, argCJ BDFRGH</i>	Argininbiosynthese
		0730 ¹ , 0950, 2098 ¹	<i>aroA, aroF, aroG</i>	Biosynthese aromatische Aminosäuren
		0245	<i>leuA</i>	Leucinbiosynthese
		1133, 2528	<i>lysA, ddh</i>	Diaminopimelat- und Lysinbiosynthese
		1446 ²	<i>aspA²</i>	Aspartatbiosynthese
		2048 ¹		Methioninsynthese
		0098 ² , 1962 ²	<i>putA², thiO^{a2}</i>	Aminosäureabbau
C-Metabolismus	≥ 1,74	1526 ¹ , 2673	<i>gap¹, fda</i>	Glycolyse
	≤ 0,57	2247-48 ¹	<i>aceA, aceB¹</i>	Glyoxylatzyklus
		2709	<i>adhA²</i>	Alkohol-DH
Energie-stoff-wechsel	≥ 1,74	0359-61, 0427, 2110-12, 2437	<i>sdhCDAB, ccsB, qcrA1C, ctaE, ctaD</i>	Atmungskette
		0888	<i>menG^a</i>	Menaquionsynthese
Nukleotid-stoff-wechsel	≤ 0,57	1299 ¹ , 1849, 1897, 2188 ²	<i>polA¹</i>	DNA- und Nukleotidsynthese
		0094, 1993, 2739	<i>amn^a, tagA1^a, mutM1^a</i>	DNA- und Nukleotidspaltung
		1994	<i>rnc^a</i>	dsRNA-Abbau
Protein-synthese	≥ 1,74	0572-73, 2621	<i>groES, groEL</i>	Proteinfaltung
		0898	<i>pth2</i>	Peptidyl-tRNA-Hydrolyse
		1100*		nicht ribosomale Peptidsynthese
	≤ 0,57	0274 ¹ , 0440, 2124, 2219 ² , 2737	<i>pepB, dcp^a</i>	Protein- und Peptidabbau
		2138		Translationsinhibitionsinhibition
Signaltransduktion und Regulation	≥ 1,74	1981-82*	<i>glnD*, glnK*</i>	Signaltransduktionsproteine der N-Kontrolle
		1317 ² , 1887 ¹ , 2199, 2684		Transkriptionsregulation
		0275 ¹ , 0734 ¹ , 2200 ¹ , 2518 ¹	<i>whiB4^a/B1^a, cgtR3¹</i>	Regulationsprotein
	≤ 0,57	1856, 2886 ² , 2941 ²		Transkriptionsregulation
		0911 ²	<i>cgtS10</i>	Regulationsprotein
andere Funktionen	≥ 1,74	1099*, 2108		put. Hydrolyse
		0251	<i>kata</i>	O ₂ -Stressantwort
	≤ 0,57	0314, 1131		put. Hydrolyse
		1366 ² , 2084	<i>parA2^a, ftsI</i>	Zellteilung
		0337, 2086	<i>wzz, mraW</i>	Zellwandsynthese
		0351 ¹ , 0710 ¹ , 1073 ¹ , 2750	<i>udgA1, udgA2</i>	Synthese von Speicherstoffen
		1253 ² , 1961 ² , 1963	<i>thiC²E²S</i>	Thiaminbiosynthese

War *C. glutamicum* einer N-Limitierung im kontinuierlichen Fermenter ausgesetzt, reagierte die Zelle mit einer starken Änderung auf Transkriptomebene. Die Expression von ca. 210 Genen wurde mit Regulationsfaktoren zwischen 0,13 und 76,3 an die neuen Umweltbedingungen angepasst. Wie bereits in Kap. 3.2.2 werden unter N-Limitierung verstärkt transkribierte Gene als induziert und unter N-Limitierung vermindert transkribierte Gene als reprimiert bezeichnet.

Auch die einer N-Limitierung ausgesetzte Zelle reagierte mit der Anpassung ihrer Transportkapazität. Neben ca. 30 für Transportproteine codierenden Genen (15-17%) waren ca. 12 für hypothetische Membranproteine codierende Gene (5-6%) reguliert. Alle AmtR-regulierten Gene dieser Gruppe konnten erwartungsgemäß als induziert nachgewiesen werden und wiesen hohe Regulationsfaktoren auf. Dazu gehörten die Gene *amtA* und *amtB* (NH_4^+ -Transporter), *gluABCD* (Glutamattransporter), *urtABCDE* (Harnstofftransporter), *crnT* (Creatinintransporter) und NCgl1915-18 (putativer Oligopeptidtransporter). Das Gen *crnT* war in beiden Vergleichen das am stärksten induzierte Gen, was durch zwei hochkonservierte AmtR-Bindedomänen im Promotorbereich dieses Genes erklärbar ist (Beckers, 2004). Zusätzlich waren die Gene *cydC* (putativer Protein-Lipid-ABC-Transporter) und NCgl2051 (putativer Aminosäuretransport) induziert. Neben der erhöhten Expression von Genen zur Aufnahme von Ammonium und alternativen N-Quellen, scheint auch ein verstärkter Transport von C-Quellen für die N-limitierte Zelle wichtig zu sein. Die Gene *ptsG* (Glucosetransporter), *msiK1* (putativer Zuckertransporter), NCgl1968 (Di- und Tricarboxylattransporter) und *gntP* (Gluconatpermease) lagen induziert vor.

Die Expression weiterer Gene war herunterreguliert. Dazu gehörten zwei für Transporter kompatibler Solute codierende Gene: *betP* (Glycinbetaintransporter) und *putP* (Prolintransporter). *BetP* scheint eine besondere Bedeutung zuzukommen, es war in beiden Transkriptomvergleichen das am stärksten reprimierte Gen. Glycinbetain und Prolin stellen bei *C. glutamicum* die wichtigsten kompatiblen Solute in der Antwort auf hyperosmotischen Stress dar. Sie haben keinen Einfluss auf den Metabolismus der Zelle und können nicht verstoffwechselt werden (Morbach und Krämer, 2003). Unter den osmotisch strikt kontrollierten, gleichbleibenden Bedingungen der kontinuierlichen Fermentation kann die Zelle vermutlich auf den Transport kompatibler Solute vorübergehend verzichten. Mit der Repression von NCgl0329, NCgl0618, NCgl0774, NCgl0776 (Fe^{3+} -Transporter), NCgl1034-35 (Kobalttransporter) und *chaA* ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter) konnte die Einschränkung des Ionentransportes auf Expressionsebene gezeigt werden. Bei den Genprodukten handelt es sich überwiegend um Untereinheiten von ABC-Transportern. Die zusätzliche Repression der Gene NCgl0909, NCgl1623 und NCgl2650-51 (uncharakterisierte ABC-Transporter) zeigte, dass die N-limitierte Zelle insbesondere bei der niedrigen Durchflussrate überflüssige, energieverbrauchende Transportprozesse einschränkte.

Auf der Ebene des N-Metabolismus fand erwartungsgemäß eine umfangreiche Anpassung statt. Die Transkription der AmtR-regulierten Gene *codA* (Creatinindeaminase), *glnA* (GS), *gltBD* (GOGAT) und *ureABCEFGD* (Urease) wurde erhöht. Die zugehörigen Genprodukte sind für die Metabolisierung importierter N-Quellen verantwortlich. Mit der Induktion von *glnA* und *gltBD* ermöglicht die Zelle die Assimilation von Ammonium über den hochaffinen GS/GOGAT-Weg an Stelle der niedrigaffinen Glutamatdehydrogenase-Reaktion (GDH). Da *glnA* bereits bei unlimitiertem Wachstum transkribiert wird (Nolden *et al.*, 2001a), konnte nur ein Regulationsfaktor von ca. 5 beobachtet werden. Dagegen wurde die Expression von *gltBD*, welche bei N-Überschuss nahezu abwesend ist (Beckers *et al.*, 2001; Schulz *et al.* 2001), bis zu 25-fach gesteigert. Zusätzlich waren die Gene *soxA* (Sarcosinoxidase) und *ocd* (Ornithincyclodecarboxylase) induziert, deren Genprodukte in alternative Wege zur Glycin- bzw. Prolinsynthese involviert sind. Die Verfügbarkeit von $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ verbesserte die Zelle durch gesteigerte Transkription der Gene *cysK* (o-Acetylserinthiollyase), *ocd* und NCgl0788 (Glutamincyclotransferase). Bei den durch die Genprodukte katalysierten Enzymreaktionen kommt es zur Freisetzung von NH_4^+ .

Der Stickstoffverbrauch wurde durch die Repression vieler Gene mit Funktion in verschiedenen Aminosäurebiosynthesewegen reduziert. Eine schwächere Expression für die Gene *argS*, *argCJBDFRGH* (Argininbiosynthese), *aroA*, *aroF*, *aroG* (Biosynthese aromatischer Aminosäuren), *aspA* (Aspartatbiosynthese), *lysA* (Lysinbiosynthese) und *leuA* (Leucinbiosynthese) wurde detektiert. Für die *de novo*-Synthese der genannten Aminosäuren außer Aspartat sind 6 bis 10 einzelne Schritte erforderlich. Lysin, Arginin und Tryptophan enthalten darüber hinaus eine zusätzliche Aminogruppe. Eine interessante Feinregulation zeigt sich an Genen der Diaminopimelat- und Lysinbiosynthese. Hier konnten die Gene *ddh* und *lysA* unter N-Limitierung reprimiert und das Gen *dapD* induziert nachgewiesen werden. Die Genprodukte von *ddh* und *dapD* sind Teil eines verzweigten Weges zur Synthese von D,L-Diaminopimelat (Schrumpf *et al.*, 1991; Wehrmann *et al.*, 1998). Die parallele Präsenz beider Verzweigungen unter unlimitierten Bedingungen konnten Sonntag *et al.* (1993) mittels metabolischer Flux-Analysen für *C. glutamicum* beweisen. Unter N-Limitierung reguliert *C. glutamicum* den niedrig-affinen, NH_4^+ -abhängigen *ddh*-Weg herunter. Die Induktion der *dapD*-Transkription steigert den Fluss durch den hoch-affinen Weg und gewährleistet so die Synthese von D,L-Diaminopimelat. Um diese Komponente für die Zellwandsynthese verfügbar zu halten und einen übermäßigen NH_4^+ -Fluss in die Lysinbiosynthese zu verhindern, wurde *lysA* (Diaminopimelatdecarboxylase) reprimiert. Das Gen NCgl2048 (Methioninsynthase) war nur bei niedriger Durchflussrate reprimiert. Bei höherer Durchflussrate wurde der Abbau von Aminosäuren durch die verminderte Expression von *putA* (Prolindehydrogenase) und *thiO* (Glycin-D-Aminosäureoxidase) eingeschränkt. Knapp ein sechstel aller regulierten Gene konnten ihrer Funktion nach dem N-Metabolismus

zugeordnet werden. Ihre Regulation erwies sich als deutlich gerichteter als diejenige unter N-Hunger-Bedingungen im Schüttelkolben.

Nur wenige Gene mit Funktion im C-Metabolismus wiesen eine veränderte Transkription unter N-Limitierung auf (ca. 5 %). Die Induktion von *ptsG* deutete einen verstärkten Transport von Glukose in die Zellen an. Eine Anpassung der daran angeschlossenen Stoffwechselwege entweder auf Expressions- oder auf Aktivitätsebene ist wahrscheinlich. Mit *fdx* und *gap* zeigten zwei Gene mit Funktion in der Glykolyse eine verstärkte Expression. In früheren Arbeiten konnte auf Proteomebene für beide Kandidaten eine verstärkte Synthese unter N-Mangel gezeigt werden (Schmid *et al.*, 2000). Zwei weitere Gene waren vermindert transkribiert, *aceA* und *aceB*. Sie codieren für die Isocitratlyase und Malatsynthase des Glyoxylatzyklus. Da es sich beim zur Verfügung gestellten Substrat nicht um Acetat, sondern um Glucose handelt, ist die Synthese dieser Enzyme unnötig. Eine Repression konnte auch für *adhA* (Alkoholdehydrogenase) gezeigt werden.

Alle Gene, welche für die Succinat-Dehydrogenase codieren (*sdhCDAB*), konnten als induziert nachgewiesen werden. Diese hat sowohl eine entscheidende Funktion im Tricarbonsäurezyklus als auch in der Atmungskette. Vor dem Hintergrund, dass auch die Gene *qcrA1*, *qcrC*, und *ctaE* (Cytochrom bc_1 -Komplex), *ctaD* (Cytochrom aa_3 -Oxidase, Untereinheit I), *ccsB* (Cytochrom C-Hilfsprotein) und *menG* (Demethylmenaquinonmethyltransferase) verstärkt transkribiert wurden, wurde die Regulation von *sdhCDAB* im Zusammenhang mit ihrer Funktion in der Atmungskette betrachtet. Eine verstärkte Atmung führt zur verstärkten Bildung von Sauerstoffradikalen, was die Induktion des *kataA*-Gens in beiden Transkriptomvergleichen erklären würde. Das Genprodukt ist die Katalase, welche in der O_2 -Stressantwort eine wichtige Rolle spielt.

Auf Transkriptomebene wurden die Grundlagen für eine leichte Einschränkung des Nukleotidstoffwechsels geschaffen. Die verminderte Expression der Gene *polA* (DNA-Polymerase I), NCgl1849 (putative Helicase), NCgl1897 (alternative Thymidylatsynthase) und NCgl2188 (DNA-Primase) wiesen darauf hin. Da zwei der genannten Gene jeweils nur in einem der durchgeführten Transkriptomvergleiche identifiziert wurden, ist die Relevanz fraglich. Zusätzlich wurden drei Gene reprimiert, deren Genprodukte für DNA- und Nukleotidspaltung verantwortlich sind. Dazu zählten *amn* (Nukleosidphosphorylase), *mutM1* und *tagA1* (DNA-Glycosylasen). Die verminderte Expression von *rnc* (ds-spezifische RNase) deutete eine höhere RNA-Stabilität an.

N-limitierte Zellen versuchten im Gegensatz zu N-gehungerten Zellen gezielt, den Protein- und Peptidabbau einzuschränken. Dies zeigte sich durch die verminderte Transkription von NCgl0274 (Membrancarboxypeptidase), NCgl0440 (put. Serinprotease), *pepB* (Leucyl-aminopeptidase), *dcp* (put. Peptidyl-Dipeptidase) und NCgl2737 (Membranprotease). Durch

die Repression der Gene NCgl2138 (Inhibitor der Translationsinitiation) und die Induktion der Gene *pth2* (Peptidyl-tRNA-Hydrolase) und NCgl1100 (nicht-ribosomale Peptidsynthese) wurden einzelne Prozesse der Translation begünstigt. Eine verstärkte Expression von *groES*, *groEL* und NCgl2621 (Chaperonine) lässt darauf schließen, dass die Zelle zusätzlich zugunsten einer höheren Proteinstabilität regulierte.

Die Transkription der Gene *glnK* und *glnD* wurde unter N-Limitierung bis zu 36-fach verstärkt. Die zugehörigen Genprodukte stellen die zentralen Komponenten der Signaltransduktion innerhalb der N-Kontrolle dar (Nolden *et al.*, 2001b). Ihre Regulation war für die Antwort von *C. glutamicum* auf N-Limitierung unverzichtbar. Die Regulation von insgesamt fünf für Regulationsproteine und sieben für Transkriptionsregulatoren codierenden Genen (Tab. 3.5) zeigte auch unter N-Limitierung, dass die N-Kontrolle als Regulationssystem nicht isoliert funktioniert, sondern vermutlich als Bestandteil eines Netzwerkes zu sehen ist. Die genaue Zusammensetzung der transkribierten für Regulationsproteine codierenden Gene war je nach Durchflussrate verschieden.

Eine N-Limitierung hatte die Regulation von knapp 30 weiteren Genen zur Folge, die der Gruppe „Andere“ zugeordnet wurden. *C. glutamicum* reprimiert die Gene *ftsI* (Zellteilungsprotein FtsI) und *parA2* (in Chromosomenteilung involvierte ATPase), deren Genprodukte Bestandteil der Zellteilungsmaschinerie sind. Einige ihrer Bestandteile waren offensichtlich entbehrlich, da die Wachstumsrate der Zellen im stationären Gleichgewicht der kontinuierlichen Fermentation auf Werte unter $\mu_{gr} = 0,15$ 1/h beschränkt wurde. Für diese Hypothese spricht auch die Repression von zwei Genen der Zellwandsynthese (*wzz*, *mraW*) und von *wzx* (putativer Zelloberflächenpolysaccharid-Exporter). Besonders bei niedriger Durchflussrate wurden verschiedene Syntheseprozesse für Speicherstoffe eingeschränkt (*udgA1*, NCgl0710, NCgl1073 und *udgA2*). Bei der höheren Durchflussrate zeigte sich eine Repression mehrerer für die Thiaminbiosynthese wichtiger Gene (*thiC*, *thiE* und *thiS*). Des Weiteren konnte eine Regulation bei vier Genen putativer Hydrolasen (NCgl0314, NCgl1099, NCgl1131, NCgl2108) und nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte an Hand der DNA-Microarray-Analysen gezeigt werden, dass *C. glutamicum* auf eine N-Limitierung mit einer komplexen Regulation auf Transkriptomebene reagierte. Um die N-Limitierungssituation zu überdauern, wurde die Transkription entscheidender Gene mit Funktion im Import von N-Quellen, im N-Metabolismus und in der Atmungskette induziert. Die Zellteilung im stationären Gleichgewicht der kontinuierlichen Fermentation war eingeschränkt. Eine Regulation zugunsten der Proteinstabilität fand statt, eine Repression von Translationsprozessen wurde nicht vorgenommen.

3.3.1.2 Vergleich der Expressionsprofile stickstofflimitierter Zellen

Die durchgeführte N-limitierte Fermentation ermöglichte zusätzlich den Vergleich der beiden N-limitierten Zustände miteinander (D_{kl} vs. D_{gr}). Im stationären Gleichgewicht einer kontinuierlichen Fermentation ist die Wachstumsrate der Bakterien gleich der eingestellten Durchflussrate. Faktisch wurden daher die Transkriptomprofile zweier *C. glutamicum*-Kulturen mit unterschiedlicher Wachstumsrate verglichen ($\mu_{kl} = 0,075$ 1/h und $\mu_{gr} = 0,15$ 1/h). Im Idealfall ist die Identifizierung wachstumsratenabhängig regulierter Gene möglich.

Alle Gene, deren Expression sich um einen Faktor von $\geq 1,74$ bzw. $\leq 0,57$ änderte, wurden als signifikant reguliert angesehen. Auch für diesen Vergleich wurden die regulierten Gene nach den Funktionen ihrer Genprodukte in zehn Gruppen unterteilt: (1) Transportproteine, (2) N-Metabolismus, (3) C-Metabolismus, (4) Energiestoffwechsel, (5) Nukleotidstoffwechsel, (6) Proteinsynthese, (7) Signaltransduktion und Regulation, (8) andere Funktionen, (9) hypothetische Proteine und (10) hypothetische Membranproteine. Die Gewichtung der jeweiligen Gruppen ist aus Abb. 3.9 ersichtlich. Knapp ein Drittel der Gene (30,6%) gehören den Gruppen „hypothetische Proteine“ und „hypothetische Membranproteine“ an, welche für die Darstellung der Ergebnisse vernachlässigt wurden.

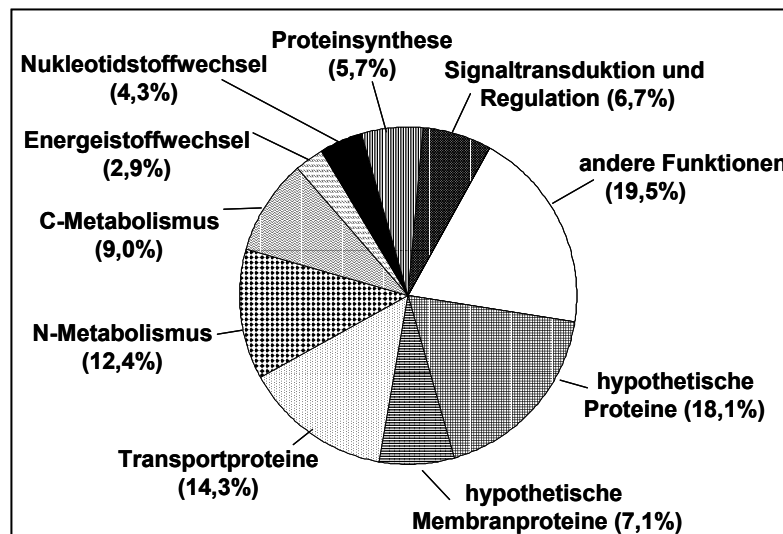


Abbildung 3.9: Anteil der funktionellen Gruppen an der Gesamtheit regulierter Gene.

C. glutamicum reagierte auf die Verdopplung der Wachstumsrate in kontinuierlicher Kultur mit der Regulation von 213 Genen. Diese trat mit Faktoren zwischen 0,2 und 11,7 auf. Über 50% dieser Gene sind mit Faktoren zwischen 0,5 und 0,57 bzw. zwischen 1,74 und 2,0 nur sehr schwach reguliert. Im Folgenden ist grundsätzlich das Transkriptom der bei der höheren Wachstumsrate kultivierten Zellen (μ_{gr}) der Bezugspunkt. Bei μ_{gr} verstärkt transkribierte Gene werden als induziert und bei μ_{gr} vermindert transkribierte Gene als reprimiert bezeichnet. Die Tab. 3.5 gibt eine zusammengefasste Übersicht über die wichtigsten regulierten Gene.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der wichtigsten regulierten Gene bei erhöhter Wachstumsrate im N-limitierten, kontinuierlichen Fermentationsversuch. Zur Vereinfachung sind die Gene in acht funktionelle Gruppen (Transport, N-Metabolismus, C-Metabolismus, Energiestoffwechsel, Signaltransduktion und Regulation, Nukleotidstoffwechsel, Proteinsynthese und andere Funktionen) eingeteilt. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr.), zusätzlich ist (falls vorhanden) der Genname angegeben Unter „Faktor“ ist die Art der Regulation als Induktion ($\geq 1,74$) oder Repression ($\leq 0,57$) der Gene angedeutet. Genaue Regulationsfaktoren sind der Tabelle 7.1 im Anhang zu entnehmen. Abkürzungen und Indices: * = Gen des AmtR-Regulons, ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003), put. = putativ

Gruppe	Faktor	NCgl-Nr.	Gen-name	Funktion
Transport	$\geq 1,74$	0074*	<i>crnT</i> *	Creatinintransport
		2553	<i>ptsS</i>	Zuckertransport
		0843	<i>mscL</i> ^a	mechanosensitiver Kanal
		2463, 2808	<i>gntP</i>	Transport organischer Säuren
		0856	<i>betP</i>	Transport kompatibler Solute
		0329, 0618, 0774-76, 1959		Kationentransport
		0986, 1411, 1623, 2141, 2168, 2302*	<i>vanK</i> ^a	uncharakterisierter Transport
	$\leq 0,57$	0342, 1305	<i>ptsG</i>	Zuckertransport
		2465		Lipoproteinexport
		1221	<i>yggB</i> ^a	mechanosensitiver Kanal
		1116	<i>putP</i>	Transport kompatibler Solute
		2787		Kationentransport
		0599, 1031, 2713		uncharakterisierter Transport
N-Metabolismus	$\geq 1,74$	0075*	<i>codA</i> *	Creatininmetabolismus
		1222-24	<i>ilvBNC</i>	Isoleucinbiosynthese
		2048		Methioninbiosynthese
		0328		Nitroreduktase
		0755, 1211	<i>gatB</i> ^a	put. Amidotransferase
	$\leq 0,57$	1340-45	<i>argCJDFR</i>	Argininbiosynthese
		1446	<i>aspA</i>	Aspartatbiosynthese
		2715-19	<i>cysNDHI</i>	Cysteinbiosynthese
		0624, 1094, 1450, 1541, 2360	<i>metXE</i> ^a HKB	Methioninbiosynthese
2528	<i>ddh</i>	Diaminopimelatsynthese		
C-Metabolismus	$\geq 1,74$	0817	<i>pgi</i>	Glycolyse
		1396, 1512, 2399	<i>gnd</i> ^a , <i>tkl</i> , <i>gntV</i> ^a	Pentosephosphat-Weg
		1482	<i>acn</i>	Tricarbonsäurezyklus
	$\leq 0,57$	1526	<i>gap</i>	Glycolyse
		2247-48	<i>aceAB</i>	Glyoxylatzyklus
		2904, 2521, 2765	<i>mez</i> , <i>poxB</i> ^a , <i>pck</i>	anapleurotische Reaktionen
		0666	<i>prpC</i>	Propionatmetabolismus
		0802		Fettsäuresynthese

Fortsetzung Tabelle 3.6:

Gruppe	Ratio	NCgl-Nr.	Gen-Name	Funktion
Energie-stoffwechsel	≥ 1,74	1161-66	<i>atpFHAGDC</i>	ATP-Synthese
Nukleotid-stoffwechsel	≥ 1,74	0791		RNA-Modifizierung
		1912	<i>nusA^a</i>	Transkriptionstermination
		2898	<i>mutM2^a</i>	DNA-Spaltung
		0826	<i>purN^a</i>	Purinsynthese
	≤ 0,57	1075, 1844	<i>sigE, sigB</i>	RNA-Synthese
Protein-synthese	≥ 1,74	7 Gene		ribosomale Proteine
		1100*		(nicht ribosomale) Peptidsynthese
	≤ 0,57	0841		Proteinabbau
		0901	<i>pth1</i>	Peptidyl-tRNA-Hydrolyse
Signaltrans- duktion und Regulation	≥ 1,74	1483, 1912, 2298, 2684		Transkriptionsregulation
	≤ 0,57	0173, 0358, 0668, 1527, 1887, 2025, 2199, 2941	<i>ramB^b</i>	Transkriptionsregulation
		0275, 2200, 2518	<i>whiB4^a, fur^a, cgtR3</i>	Regulationsprotein
andere Funktionen	≥ 1,74	1131, 1383		put. Hydrolyse
		0885, 0987, 2101	<i>cmt3^a, cmt5^a, cmt4^a</i>	Zellwandbiosynthese
		0351, 0356	<i>udgA1^a, galU2^a</i>	Synthese von Speicherstoffen
	≤ 0,57	2108		put. Hydrolyse
		0206-08, 1150	<i>moaEBCA</i>	Molybdopterinbiosynthese
		1253	<i>thiC</i>	Thiaminbiosynthese

Die Regulation von Genen, deren Produkte Transportproteine darstellen, stellte sich als weniger konsistent als bei den vorherigen Vergleichen heraus. Die erhöhte Transkription von *cmT* (Creatintransporter) zeigte im Zusammenhang mit der Induktion von *codA* (Creatinindeaminase) die Bedeutung von Creatinin als alternativer N-Quelle. Eine Verdopplung der Wachstumsrate hat auf Transkriptionsebene insbesondere für den Transport von Kohlehydraten Konsequenzen. Das Gen *ptsS* (Sucrosetransporter) wurde leicht induziert, dagegen zeigte sich eine geringere Genexpression für *ptsG* (Glucosetransporter). Die Transkription zweier für Transporter organischer Säuren codierender Gene zeigte sich durch 11,5-fache (NCgl2463, putativer Dicarboxylattransporter) und 4,4-fache (*gntP*, Gluconatpermease) Regulation am stärksten beeinflusst. Die Induktion von *gntP* zeigte zusammen mit der verstärkten Präsenz der Gene *tkt* (Transketolase), *gnd* (6-Phosphogluconatdehydrogenase) und *gntV* (Gluconatkinase) die Bedeutung des Pentosephosphat-Weges. Der Transport kompatibler Solute war durch extrem niedrige Regulationsfaktoren für das Gen *betP* (Glycinbetaintransporter) bereits im Vergleich unlimitierter mit N-limitierten

Zellen aufgefallen. Hier erhöhte sich die Transkription von *betP* mit der größeren Wachstumsrate leicht. Eine entgegengesetzte Regulation wurde für *putP* (Prolintransporter) festgestellt. Mit der verstärkten Genexpression von NCgl0329, NCgl0618, NCgl0773-74, NCgl0776 und NCgl1959 zeigte sich eine erhöhte Bedeutung des Fe^{3+} -Transportes bei μ_{gr} , dagegen wurde NCgl2787 (K^+ -Transport) reprimiert. Die Gene *mscL* und *yggB* (mechanosensitive Kanäle) zeigten eine schwache Regulation, außerdem waren neun für uncharakterisierte Transportproteine codierende Gene bei μ_{gr} reguliert.

Zur Anpassung an die erhöhte Wachstumsrate wurden auf der Ebene des N-Metabolismus viele Gene reguliert. Neben der Regulation des *codA*-Gens konnten insbesondere bei Aminosäurebiosynthesewegen Veränderungen detektiert werden. Mit *ilvBNC* (Isoleucin-, Valin- und Leucinbiosynthese) waren drei Gene induziert, welche im Vergleich unlimitierter gegen N-limitierte Zellen nicht reguliert wurden. Viele Gene der Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren (*cysNDHI*, *metXEHKB*) waren reprimiert. Nur das Gen NCgl2048, welches für die Methioninsynthase II codiert, wurde verstärkt transkribiert. Die Repression von *argCJDFR* (Argininbiosynthese), *aspA* (Aspartatbiosynthese), *ddh* (Diaminopimelatbiosynthese), und NCgl2465 (Lipoproteinexporter) gab Hinweise darauf, dass auch bei der höheren Wachstumsrate die Organisation des NH_4^+ -Verbrauches entscheidend war. Daneben war die mRNA-Konzentration der Gene NCgl0328 (Nitroreduktase), NCgl0755 und *gatB* (putative Amidotransferasen) erhöht.

Im C-Metabolismus zeigte sich neben der oben bereits genannten keine entscheidende Neuregulation bei der höheren Wachstumsrate μ_{gr} . Die Gene *pgi*, *gap* (Glykolyse) und *prpC* (Propionatmetabolismus) konnten als schwach reguliert detektiert werden. Mit einem Faktor von 3,92 wies das *acn*-Gen (Aconitase) in dieser Gruppe die stärkste Änderung auf. Die verminderte Transkription der Gene *aceAB*, deren Genprodukte eine Funktion im Glyoxylatweg haben, verdeutlichten die geringe Bedeutung dieses Stoffwechselweges unter den gegebenen Bedingungen. Ein zusätzlicher Verzicht auf drei für anapleurotische Reaktionen codierende Gene (*mez*, *poxB*, *pck*) konnte gezeigt werden. Die Bedeutung des Energiestoffwechsels unter N-Limitierung wurde durch die zusätzliche Induktion der Gene *atpFHAGDC* (F_0F_1 -ATP-Synthase) bei μ_{gr} unterstrichen.

Die Veränderung des Nukleotidstoffwechsels ist weitgehend unklar, da nur einzelne Gene reguliert wurden (siehe Tab. 3.6). Auf der Ebene der Proteinsynthese ermöglichte die höhere Wachstumsrate den Zellen eine verstärkte Expression von sieben für ribosomale Proteine codierenden Genen und von NCgl1100 (nicht-ribosomales Peptidsynthesemodul). Dies deutete auf eine Steigerung von Translationsprozessen hin, zusätzlich zeigte die leichte Repression von NCgl0841 (Trypsinähnliche Serinprotease) eine Verminderung Proteinabbauender Prozesse. Die Verdopplung der Wachstumsrate auf $\mu_{gr} = 0,15$ 1/h hatte außerdem die Neuorganisation der Regulationsnetzwerke zur Folge. Zwölf für putative

Transkriptionsregulatoren codierende Gene zeigten eine veränderte Expression, vier waren induziert und acht reprimiert. Zusätzlich waren *whiB4*, *fur* und *cgtR3* negativ reguliert.

Die schwach verstärkte Transkription der Gene *udgA1* und *galU2* verdeutlichte, dass bei schneller wachsenden Zellen (μ_{gr}) die Synthese von Speicherstoffen wieder eingeleitet wurde. Wie die Induktion von *cmt3*, *cmt5*, und *cmt4* (Corynomycolyltransferasen) zeigte, gilt gleiches für die Zellwandbiosynthese. Im Gegensatz dazu war ein Verzicht auf die Expression von Genen mit Funktion in der Thiamin- (*thiC*) und Molybdopterinbiosynthese (*moaEBCA*) nachweisbar. Verschiedene für putative Hydrolasen codierende Gene waren reguliert (NCgl1131, NCgl1383, NCgl2108).

Die kontinuierliche Fermentation erlaubte nicht nur die Analyse des in Abhängigkeit der N-Limitierung angepassten Transkriptomprofils von *C. glutamicum*, sondern ermöglichte auch Einblicke in die Reaktion auf eine Verdopplung der Wachstumsrate. Durch diesen Vergleich konnte einzelnen Prozessen, u.a. dem Pentose-Phosphatweg, den anapleurotischen Stoffwechselwegen und der Synthese von Speicherstoffen in stärker wachsenden Zellen eine Bedeutung zugeordnet werden.

3.3.2 Proteomanalyse

Im Rahmen des Projektes „Globale Analyse einer Stickstofflimitierung“ konnte auf Transkriptionsebene eine umfassende Regulation nachgewiesen werden. Diese Reorganisation auf Transkriptionsebene sollte einen detektierbaren Einfluss auf die Translation der Zelle, und damit auf die Proteinebene haben. Die DNA-*Microarray*-Analyse wurde daher mit einer globalen Analyse des Proteoms mittels 2-D-PAGE kombiniert. Diese beschränkte sich auf cytoplasmatische Proteine, da für *C. glutamicum* derzeit keine Methode zur Trennung des Membranproteoms zur Verfügung steht (Kap. 3.1).

Für den Proteomvergleich wurden die cytoplasmatischen Proteinfractionen der unlimitierten *batch*-Probe und der beiden N-limitierten Proben D_{kl} und D_{gr} isoliert. Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte über einen pH-Bereich von 4-7 und in der zweiten Dimension über ein Molekulargewicht von ca. 5-110 kDa. Von den Coomassie-gefärbten 2-D-Gelen wurde Falschfarbendarstellung mit Hilfe des Programms *Delta2D* (Decodon GmbH, Greifswald, D) erstellt, um Unterschiede zwischen beiden Proteommustern zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Eine Quantifizierung mit *Delta2D* diente zur Ermittlung des Regulationsfaktors. Analog zu der Proteomanalyse unter N-Hunger wurden 2 biologische und 2 technische Replikate angefertigt. Proteine, welche einen Faktor $\geq 2,0$ bzw. $\leq 0,5$ aufwiesen und in allen Replikaten das gleiche Regulationsmuster zeigten, wurden als signifikant reguliert eingestuft.

Die Abb. 3.10 zeigt in Teil A das Proteommuster von unlimitierten *C. glutamicum* aus der *batch*-Phase der Fermentation. Teil B zeigt das Proteomprofil N-limitierter Zellen aus der sich im kontinuierlichen Gleichgewicht befindenden, bei $D_{kl} = 0,075 \text{ l/(l}\cdot\text{h)}$ betriebenen Fermentation.

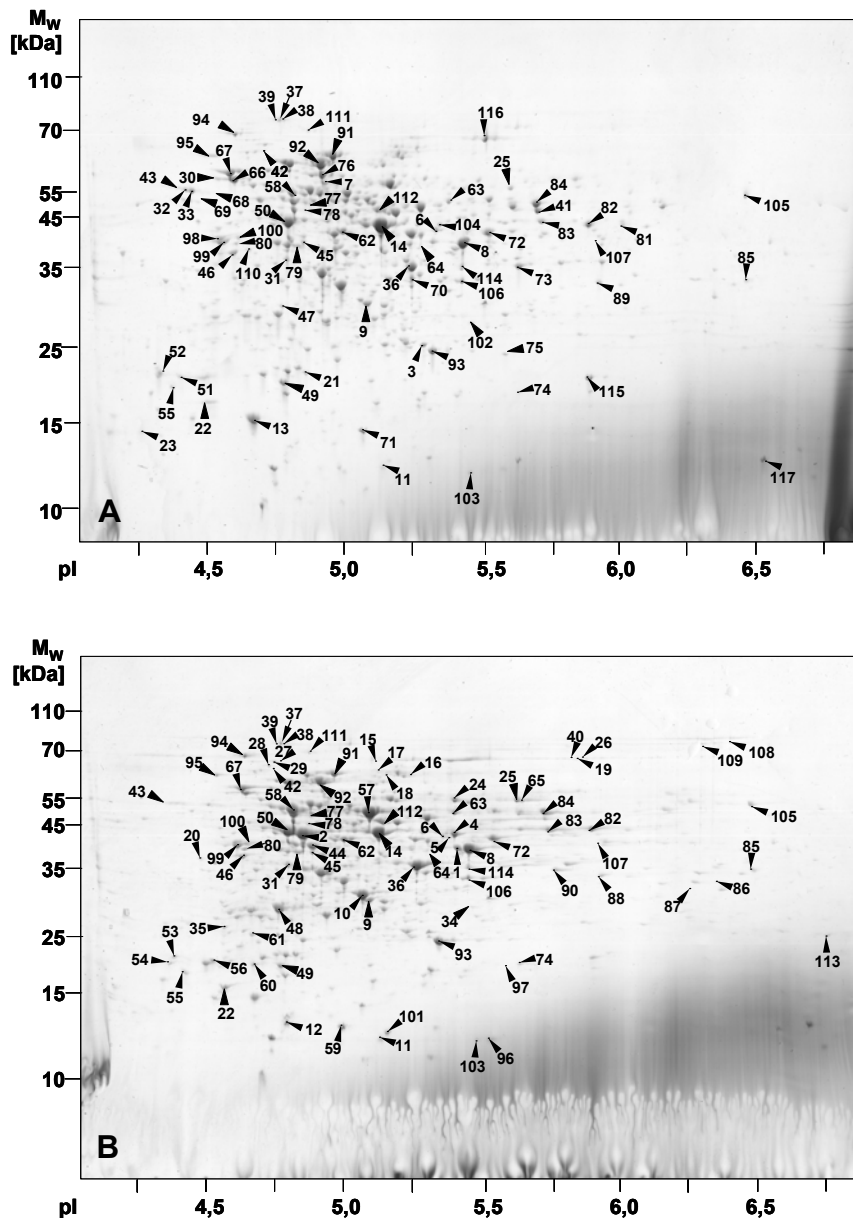


Abbildung 3.10: Proteommuster der cytoplasmatischen Proteinfraction von *C. glutamicum* nach Kultivierung bei unterschiedlicher Stickstoffverfügbarkeit. Einer Fermentation wurden in der *batch*-Phase (N-Überschuss, A) und im kontinuierlichen Gleichgewicht bei einer Durchflussrate von $D_{kl} = 0,075 \text{ l/(l}\cdot\text{h)}$ (N-Limitierung, B) Proben entnommen. Jeweils $100 \mu\text{g}$ Protein wurden über 2D-PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Das apparente Molekulargewicht M_w der Proteine in kDa sowie der dargestellte pH-Bereich sind angegeben. Die markierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und sind in den Tabellen 3.7 bis 3.9 aufgelistet.

Die globale Proteomanalyse von in Schüttelkolben kultivierten *C. glutamicum*-Zellen zeigte, dass trotz der signifikanten Regulation auf Transkriptomebene mit einer konventionellen Coomassie-Färbung keine nennenswerten Unterschiede in den Proteomprofilen ausreichend mit Stickstoff versorgter und N-gehungter Zellen detektierbar waren (Kap. 3.2.3). Mit Hilfe sensitiverer Methoden wie der [³⁵S]-Methioninmarkierung konnten Schmid *et al.* (2000) und Nolden *et al.* (2001b) einige wenige Unterschiede detektieren. Eine weitere Alternative zur Verbesserung der Sensitivität sollte im Rahmen dieses Projektes untersucht werden: die N-Limitierung im kontinuierlichen Fermentationssystem.

Allein durch einen oberflächlichen optischen Vergleich der 2-D-Gele fallen zahlreiche markante Änderungen im Proteomprofil N-limitierter Zellen auf. Aus der Quantifizierung resultierten 68 veränderte Protein-Spots, in denen 63 verschiedene Proteine nachgewiesen werden konnten. 40 dieser Protein-Spots wiesen einen Regulationsfaktor von $\geq 2,0$ auf, waren also verstärkt unter N-Limitierung synthetisiert (Tab. 3.7). 28 weitere Protein-Spots wiesen einen Regulationsfaktor von $\leq 0,5$ auf (Tab. 3.8). Zusätzlich wurden interessante Proteine, welche jedoch nicht den gewählten Kriterien für eine Regulation entsprachen, analysiert (Tab. 3.9). Die identifizierten Proteine sind bewusst über ihren Eintrag in der Genomdatenbank (NCgl-Nummer) und nicht über den in der Proteindatenbank definiert, um den Vergleich mit der vorangegangenen Transkriptomanalyse zu ermöglichen.

Tabelle 3.7: Bei Stickstofflimitierung verstärkt synthetisierte Proteine. Die Coomassiegefärbten Proteinspots wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben. Pro biologischem Replikat wurde zur Absicherung zwei technische Replikate angefertigt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software Delta2D (Version 3.2, Decodon, Greifswald, D). Alle Proteine, die in allen Replikaten unter N-Limitierung mit einem Faktor von $\geq 2,0$ detektierbar waren, wurden als „verstärkt synthetisiert“ klassifiziert. Für die hier nicht aufgelisteten Proteinspots (Proteine 108 und 109) konnte kein ähnliches Protein aus der *C. glutamicum*-Datenbank identifiziert werden. Abkürzungen und Indices: DH = Dehydrogenase, UE = Untereinheit, * = Bestandteil des AmtR-Regulons, ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003). Grau hinterlegte Proteine waren auch auf Transkriptionsebene reguliert.

Spot	NCgl-Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
1	1526	<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH	36,0	5,16
2	2450		hypothetisches Protein	49,3	4,77
4	0075*	<i>codA</i> *	Creatinindeaminase	46,3	5,21
5	0075*	<i>codA</i> *	Creatinindeaminase	46,3	5,21
10	2451		hypothetisches Protein	30,4	4,86
	0390	<i>gpm</i>	Phosphoglyceratmutase I	27,2	4,91
12	2440		Transkriptionsregulator	27,2	4,91
15	2167	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH, Decarboxylase-Untereinheit	102,8	5,26
16	1900	<i>gpsI</i> ^a	Polyribonucleotidnucleotidyltransferase	81,3	5,04
	2037	<i>treY</i>	Maltooligosyltrehalosesynthase	90,5	5,03

Fortsetzung Tabelle 3.7:

Spot	NCgl-Nr.	Gen-Name	Annotation	M _w [kDa]	pI
17	1607	<i>thrS</i>	Threonyl-tRNA-Ligase	78,1	5,04
	1094	<i>metE</i>	Homocysteinmethyltransferase	81,3	4,78
	2150		put. Pyridoxinbiosyntheseenzym	67,5	4,87
	1471	<i>mcm B^a</i>	N-terminale Domäne der Methylmalonyl-CoA-Mutase	80,1	4,94
18	1900	<i>gpsI^a</i>	Polyribonucleotidnucleotidyltransferase	81,3	5,04
	1384	<i>secA</i>	Präproteintranslocase Untereinheit SecA	83,5	4,95
	0478	<i>fusA^a</i>	Elongationsfaktor EF-G	77,9	4,81
19	2167	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH, Decarboxylase-Untereinheit	102,8	5,26
20	1513	<i>tal</i>	Transaldolase	38,3	4,47
24	0085*	<i>ureC*</i>	Harnstoff-Amidohydrolase- α -Untereinheit	61,5	5,14
26	2167	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH, Decarboxylase-Untereinheit	102,8	5,26
27	2167	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH, Decarboxylase-Untereinheit	102,8	5,26
28	2340	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	96,1	4,64
	1336	<i>pheT^a</i>	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase β -Untereinheit	89,4	4,65
29	2340	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	96,1	4,64
34	1162	<i>atpH</i>	F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase δ Untereinheit	28,9	5,37
35	0937		hypothetisches Protein	20,2	4,58
	1316	<i>uspA</i>	universelles Stressprotein UspA	15,4	4,56
40	2167	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH, Decarboxylase-Untereinheit	102,8	5,26
44	1520*	<i>ocd*</i>	put. Ornithincyclodecarboxylase	41,0	4,71
48	2582	<i>butA</i>	L-2,3-Butandiol-DH	27,1	4,62
	0242		put. Glutaminamidotransferase	26,4	4,67
53	0902	<i>rplY</i>	ribosomales Protein L25	21,8	4,29
	0385		hypothetisches Protein	17,8	4,30
54	0902	<i>rplY</i>	ribosomales Protein L25	21,8	4,29
56	0084*	<i>ureB*</i>	Urease β -Untereinheit	17,6	4,48
57	2133*	<i>glnA*</i>	Glutaminsynthetase I	53,3	4,90
59	1982*	<i>glnK*</i>	P _{II} -Typ Signaltransduktionsprotein GlnK	12,2	5,01
60	1385		FHA-Domänehaltiges Protein	15,4	4,76
61	0088*	<i>ureG*</i>	Ni ²⁺ -bindende GTPase	22,4	4,58
65	2521	<i>poxB^a</i>	Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase	62,0	5,34
86	0089*	<i>ureD*</i>	Urease, akzessorisches Protein UreD	31,6	5,82
87	1099*		put. Hydrolase	28,8	5,73
88	0620	<i>folD^a</i>	Methylentetrahydrofolat-DH	30,1	5,51
90	1061	<i>dapD</i>	Tetrahydrodipicolinat-N-succinyltransferase	31,2	5,43
96	0083*	<i>ureA*</i>	Harnstoff-Amidohydrolase γ Untereinheit	11,2	5,18
97	0086*	<i>ureE*</i>	Urease, akzessorisches Protein UreE	17,6	5,28
101	1982*	<i>glnK*</i>	P _{II} -Typ Signaltransduktionsprotein GlnK	12,2	4,86
113	2602	<i>folE^a</i>	GTP Cyclohydrolase I	22,0	6,08

Mehrere der unter N-Limitierung verstärkt synthetisierten Proteine sind für die Assimilation bzw. Metabolisierung von Ammonium und alternativen N-Quellen verantwortlich. Darunter konnten die Glutaminsynthetase (GS, 57), die Creatinindeaminase (4, 5), die Ornithincyclodecarboxylase (44) und sechs der sieben Urease-Untereinheiten (24, 56, 61, 86, 96 und 97)

identifiziert werden. Auch das zentrale Signaltransduktionsprotein der N-Kontrolle, GlnK, konnte in seiner adenylierten (59) und deadenylierten (101) Form auf 2-D-Gelen N-limitierter Zellen nachgewiesen werden. Die Transkription der für die bisher genannten Kandidaten codierenden Gene steht unter Kontrolle des globalen Repressorproteins AmtR. Wie die Tetrahydrodipicolinat-N-Succinyltransferase (90) wurden sie auf Transkriptom- und Proteomebene reguliert. Für mehrere Proteine mit Funktion im N-Metabolismus konnte kein eindeutiges Regulationsmuster festgestellt werden, da sie mit einem bis drei weiteren Proteinen im selben Protein-Spot vorkamen (16, 17, 18, 28 und 48). Neben dieser Proteinklasse zeigte die N-Limitierung auch einen Effekt auf Proteine des Kohlenstoff- und Energiemetabolismus. Mit der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (1), der Transaldolase (20), der Decarboxylaseuntereinheit der Pyruvatdehydrogenase (15, 19, 26, 27 und 40), der Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase (65), der δ -Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase (34) und der L-2,3-Butandioldehydrogenase (48) waren die Intensitäten von sechs verschiedenen Proteinen erhöht.

Zwei der markantesten Unterschiede zwischen den verglichenen Proteomprofilen konnten zwei hypothetischen Proteinen (2, 10) zugeordnet werden. Die BLAST-Datenbank-Suche ergab für NCgl2450 eine signifikante Ähnlichkeit zum Propionatkatabolismus-Protein PrpD aus *Pyrobaculum aerophilum* IM2 (58% Identität) und für NCgl2451 eine sehr schwache, eher unbedeutende Ähnlichkeit zur 2(R)-Phospho-3-Sulfolactatsynthase aus *Methanopyrus kandleri* AV19 (27% Identität). Weiterhin ergab die Quantifizierung für das ribosomale Protein L25 (53 und 54), einen Transkriptionsregulator (12), eine putative Hydrolase des AmtR-Regulons (87), die Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (88), die GTP-Cyclohydrolase (113) und ein FHA-Domänehaltiges Protein (60) einen Regulationsfaktor von $\geq 2,0$.

Aus Tabelle 3.8 sind die unter N-Limitierung geringer konzentrierten Proteine ersichtlich. Vier Proteine mit Funktion in Aminosäurebiosynthesewegen waren darunter: die Glutamat-N-acetyltransferase (21), die 2-Isopropylmalatsynthase (76), die Untereinheit 2 der Sulphat-adenylyltransferase (70) und die Ketolsäurereductoisomerase (110). Zwei dieser Proteine (21, 76) waren bereits im Vergleich der Transkriptomprofile als reguliert aufgefallen. Die verstärkte Präsenz der Pyruvatkinase (41) und der Decarboxylaseuntereinheit der Pyruvatdehydrogenase (116) deutete eine intensivere Nutzung der Pyruvatoxidation und anapleurotischer Stoffwechselwege an. Obwohl auf Transkriptionsebene keine Regulation von Genen festgestellt werden konnte, welche für ribosomale Proteine codieren, zeigte der 2-D-Gel-Vergleich Unterschiede auf Proteomebene. Betroffen waren die ribosomalen Proteine L7/L12 (13), L10 (115), L25 (52), S1 (66) und S2 (73). Außerdem waren die Intensitäten der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (98) und des Elongationsfaktors EF-Tu (81) geringer.

Tabelle 3.8: Bei Stickstofflimitierung vermindert synthetisierte Proteine. Die Coomassie-gefärbten Proteinspots wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben. Pro biologischem Replikate wurde zur Absicherung zwei technische Replikate angefertigt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software Delta2D (Version 3.2, Decodon, Greifswald, D). Alle Proteine, die in allen Replikaten unter N-Limitierung mit einem Faktor von $\leq 0,5$ detektierbar waren, wurden als „vermindert synthetisiert“ klassifiziert. Für den hier nicht aufgelisteten Proteinspot (Protein 7) konnte kein ähnliches Protein aus der *C. glutamicum*-Datenbank identifiziert werden. Abkürzungen und Indices: abh. = abhängig, DH = Dehydrogenase, UE = Untereinheit, * = Bestandteil des AmtR-Regulons, ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003). Grau hinterlegte Proteine waren auch auf Transkriptionsebene reguliert.

Spot	NCgl-Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
3	2826	<i>sod</i>	Superoxiddismutase	22,1	5,14
	2471	<i>pduO</i>	Adenosylcobalamin-abh. Dioldehydratase	21,0	5,01
13	0469	<i>rplL</i> ^a	ribosomales Protein L7/L12	13,3	4,40
21	1341	<i>argJ</i>	Glutamat-N-acetyltransferase	39,7	4,28
23	0727		hypothetisches Protein	14,5	4,29
30	0134		hypothetisches Protein	62,2	4,45
32	2133*	<i>glnA</i> *	Glutaminsynthetase I	53,3	4,90
	1071		β -Fructosidase	54,6	4,34
33	2133*	<i>glnA</i> *	Glutaminsynthetase I	53,3	4,90
	1071		β -Fructosidase	54,6	4,34
41	2008	<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	51,6	5,43
47	2582	<i>butA</i>	L-2,3-Butandiol-DH	27,1	4,62
51	2439	<i>ftn</i>	Ferritinähnliches Protein	18,1	4,42
52	0902	<i>rplY</i> ^a	ribosomales Protein L25	21,8	4,29
66	1304	<i>rpsA</i> ^a	ribosomales Protein S1	54,0	4,56
68	2329	<i>tig</i> ^a	put. Triggerfaktor, involviert in Zellteilung	49,7	4,40
69	2631		hypothetisches Protein	48,5	4,40
70	2716	<i>cysD</i>	Sulphatadenylyltransferase UE 2	34,3	5,09
	0754		Pyridoxin-Biosynthese-Enzym	31,7	5,09
71	2287	<i>ndk</i> ^a	Nucleosiddiphosphatkinase	14,8	4,97
73	1950	<i>rpsB</i>	ribosomales Protein S2	30,1	5,35
75	0573	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	45,3	4,72
76	0245	<i>leuA</i>	2-Isopropylmalatsynthase	68,2	4,79
81	0480	<i>tuF</i> ^a	Elongationsfaktor EF-Tu	43,9	4,92
89	0620	<i>folD</i> ^a	Methylentetrahydrofolat-DH	30,1	5,51
98	0540	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA-Polymerase, α -UE	36,7	4,33
102	1824		hypothetisches Protein	27,0	5,10
104	1502	<i>sufB</i>	put. eisenregulierter ABC-Transporter	42,3	5,04
	0075*	<i>codA</i> *	Creatinindeaminase	45,5	5,04
110	1224	<i>ilvC</i>	Ketolsäurereductoisomerase	36,2	4,40
115	0468	<i>rplJ</i> ^a	ribosomales Protein L10	17,9	5,50
116	2167	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH, Decarboxylase-UE	102,8	5,26

Ein verminderter Gehalt in N-limitierten Zellen konnte auch für die Superoxiddismutase (3), die Nukleosiddiphosphatkinase (71), das Chaperonin GroEL (75), den eisenregulierten Transporter SufB (104), ein ferritinähnliches Protein (51), einen putativen Triggerfaktor (68) und fünf hypothetische Proteine (3, 23, 30, 69 und 102) gezeigt werden.

Die GS (32 und 33), die Creatinindeaminase (104), die Decarboxylaseuntereinheit der Pyruvatdehydrogenase (116), die L-2,3-Butandioldehydrogenase (47), das ribosomale Protein L25 (52) und die Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (89) zeigten einerseits eine schwächere (Tab. 3.7) und an anderer Stelle im 2D-Gel der N-limitierten Probe eine stärkere Intensität (Tab. 3.6). Dies deutet vermutlich auf posttranslationale Modifikationen in der Antwort auf eine N-Limitierung hin. Der für die GS beobachtete *pl-Shift* von ca. 4,5 (Abb. 3.9A) nach ca. 5,1 in Folge der N-Limitierung (Abb. 3.9B) kann auf ihre von Jakoby *et al.* (1997, 1999b) beschriebene Deadenylierung unter N-Limitierungsbedingungen zurückgeführt werden.

Viele der identifizierten Proteine wiesen kein eindeutiges, den angesetzten Kriterien entsprechendes Regulationsmuster auf. An Hand der Quantifizierung konnte nicht in allen Replikaten eine Veränderung nachgewiesen werden. Sie vervollständigen jedoch das Gesamtbild des *C. glutamicum*-Proteoms auf 2-D-Gelen, so dass sie als unverändert synthetisierte Proteine in Tabelle 3.9 aufgeführt sind. In zwölf dieser *Spots* wurden zwei bis drei verschiedene Proteine identifiziert (6, 9, 42, 43, 55, 62, 63, 78, 92, 99, 100 und 112). Sechs weitere weisen eine Funktion in der Assimilation der N-Quellen Glutamat (43, 82) und Creatinin (80) auf. Außerdem konnten neben Enzymen der Glycin- (83, 106), der Isoleucin- (46), der Leucin- (111) der Prolin- (74, 79) und der Serinbiosynthese (58) zwei weitere Proteine des N-Metabolismus identifiziert werden (45, 49). Unter insgesamt sieben Proteinen des C-Stoffwechsels waren Komponenten der Glycolyse (8, 36), des Tricarbonsäurezyklus (72, 31), der anapleurotischen Reaktionen (25, 84) und des Propionatmetabolismus (107) vertreten. Zu einer Gruppe von Kontrollproteinen gehörten die Enolase (50), die Aconitase (94), die Transketolase (92) und EF-Tu (14, 91). Es handelt sich um sehr abundante Proteine, die im Proteomvergleich nie auffielen. Sie dienen zu Beginn der Arbeit einer Qualitätsüberprüfung der Proteinidentifizierung via MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Tabelle 3.9: Bei Stickstofflimitierung unverändert synthetisierte Proteine. Die Coomassie-gefärbten Proteinspots wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben. Pro biologischem Replikat wurde zur Absicherung zwei technische Replikate angefertigt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software Delta2D (Version 3.2, Decodon, Greifswald, D). Alle Proteine, die nur in einzelnen Replikaten eine veränderte Synthese zeigten oder unter N-Limitierung mit einem Faktor zwischen 0,5 und 2,0 detektierbar waren, wurden als „unverändert synthetisiert“ klassifiziert. Für die hier nicht aufgelisteten Proteinspots (Proteine 11, 37-39) konnte kein ähnliches Protein aus der *C. glutamicum*-Datenbank identifiziert werden. DH = Dehydrogenase, UE = Untereinheit, * = Bestandteil des AmtR-Regulons, ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003). Grau hinterlegte Proteine waren auch auf Transkriptionsebene reguliert.

Spot	NCgl-Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
6	1442	<i>pepC</i>	Aspartylaminopeptidase	44,9	5,10
	0625	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin-(thiol)-Lyase	46,8	5,16
	0345	<i>murA</i> ^a	UDP-N-Acetylglucosaminolpyruvyl-Transferase	46,9	5,06
8	1526	<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH	36,0	5,16
9	2451		hypothetisches Protein	30,4	4,86
	0390	<i>gpm</i>	Phosphoglyceratmutase I	27,2	4,91
14	0480	<i>tuf</i> ^f	Elongationsfaktor EF-Tu	43,9	4,92
22	1316	<i>uspA</i>	universelles Stressprotein UspA	15,4	4,56
25	2521	<i>poxB</i> ^a	Thiaminpyrophosphatabhängiges Enzym	62,0	5,34
31	2297	<i>mdh</i>	Malat-Lactat-DH	34,9	4,79
36	2673	<i>fda</i>	Fructosebisphosphataldolase	37,2	5,04
42	2217	<i>malQ</i> ^a	4- α -Glucanotransferase	78,5	4,58
	0478	<i>fusA</i> ^a	Elongationsfaktor G	77,9	4,81
	1094	<i>metE</i> ^a	Homocysteinmethyltransferase	81,3	4,78
43	1071		β -Fructosidase	54,6	4,34
	2133*	<i>glnA</i> *	Glutaminsynthetase I	53,3	4,90
45	2227		PLP-abhängige Aminotransferase	40,7	4,76
46	1224	<i>ilvC</i>	Ketolsäurereductoisomerase	36,2	4,62
49	0033	<i>ppiA</i>	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase	18,5	4,70
50	0935	<i>eno</i>	Enolase	44,9	4,65
55	0902	<i>rplY</i>	ribosomales Protein L25	21,8	4,29
	2439	<i>ftn</i>	Ferritinähnliches Protein	18,1	4,42
58	1235	<i>serA</i>	Phosphoglycerat-DH	55,3	4,70
62	2070		Zellteilungs-Initiationsprotein	38,7	4,87
	0730	<i>aroA</i>	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase	45,5	4,86
	1548	<i>carA</i> ^a	Carbamoylphosphatsynthase, kleine UE	42,1	4,87
63	1926	<i>mgo</i> ^q	Malat:Quinon-Oxidoreduktase	54,8	5,18
	0827	<i>purH</i> ^a	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-formyltransferase/ IMP-Cyclohydrolase	55,8	5,26
64	2955		put. Oxidoreductase	39,6	4,94
67	2702	<i>dnaK</i>	70 kDa Hitzeschock Chaperonin	66,3	4,55
72	0795	<i>gltA</i>	Citratsynthase	48,9	5,19
74	1520*	<i>ocd</i> *	put. Ornithincyclodecarboxylase	41,0	4,71
77	1012		Mg-Chelatase Untereinheit ChII	50,1	4,72

Fortsetzung Tabelle 3.9:

Spot	NCgl-Nr.	Gen-Name	Annotation	M _w [kDa]	pI
78	1012		Mg-Chelatase Untereinheit ChII	50,1	4,72
	1235	<i>serA</i>	Phosphoglycerat-DH	55,3	4,70
79	1520*	<i>ocd*</i>	put. Ornithincyclodecarboxylase	41,0	4,71
80	0075*	<i>codA*</i>	Creatinindeaminase	46,3	5,21
82	1999	<i>gdh</i>	Glutamat-DH	49,0	5,57
83	0954	<i>glyA</i>	Glycinhydroxymethyltransferase	46,5	5,42
84	2008	<i>pyk</i>	Pyruvatkinase	51,6	5,43
85	1529		put. P-Loop-haltige Kinase	34,7	6,01
91	0480	<i>tuF^a</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	43,9	4,92
92	1512	<i>tkt</i>	Transketolase	75,1	4,80
	1094	<i>metE</i>	Homocysteinmethyltransferase	81,3	4,78
93	2826	<i>sod</i>	Superoxiddismutase	22,1	5,14
94	1482	<i>acn</i>	Aconitase A	102,2	4,53
95	2499	<i>purL^a</i>	Synthetaseuntereinheit der Phosphoribosylformylglycinamidin-(FGAM) Synthase	80,8	4,48
99	1525	<i>pgk^a</i>	3-Phosphoglyceratkinase	42,7	4,40
	0540	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA-Polymerase, α -UE	36,7	4,33
100	1525	<i>pgk^a</i>	3-Phosphoglyceratkinase	42,7	4,40
	0540	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA-Polymerase, α -UE	36,7	4,33
	0794	<i>serC</i>	Phosphoserinaminotransferase	40,0	4,53
103	1731		hypothetisches Protein	11,3	5,20
105	0578	<i>guaB^a</i>	Inosinmonophosphat-DH	53,4	5,98
106	1519*	<i>soxA*</i>	Sarcosinoxidase	31,0	5,10
107	0666	<i>prpC1</i>	Citratsynthase	42,6	5,51
111	2915	<i>leuS^a</i>	Leucyl-tRNA-Synthetase	108,2	4,63
112	0967	<i>fum^a</i>	Fumarase	49,8	4,92
	2153		Exoribonuclease	54,2	4,85
	2698		NAD-abhängige Aldehyd-DH	55,1	4,82
114	2449		put. Zn-NADPH:Quinon-DH	35,8	5,16
117	2881	<i>rpsF</i>	ribosomales Protein S6	11,0	6,29

Die Möglichkeit zur Kontrolle der Wachstumsrate über die eingestellte Durchflussrate ermöglichte es, definierte und hochgradig reproduzierbare Wachstumsbedingungen einzustellen. Gewonnene Zellen stammen aus einem definierten metabolischen Zustand. Erstmals konnten mit konventioneller Coomassie-Färbung deutliche Unterschiede im Proteomvergleich beobachtet werden. Die Ergebnisse der Proteomanalyse stimmen auf mehreren Ebenen mit denen der Transkriptomanalyse überein und liefern ein ergänzendes Bild über weitere Regulationsmechanismen.

Abbildung 3.11 zeigt in Ergänzung das Proteomprofil N-limitierter Zellen aus der sich im kontinuierlichen Gleichgewicht befindenden, bei $D_{gr} = 0,15 \text{ l/(l·h)}$ betriebenen Fermentation (A). Für die Analyse dieses Zustandes standen zwei biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten zur Verfügung.

Da eine kontinuierliche Fermentation über drei Wochen stabil betrieben werden konnte, lagen zusätzlich weitere Proteinproben für den Proteomvergleich vor. Für alle der drei zusätzlichen Durchflussraten wurden 2-D-Gele angefertigt, obwohl keine Möglichkeit zur statistischen Absicherung bestand. Das Proteommuster N-limitierter Zellen der höchsten, stabil betriebenen Durchflussrate, $D = 0,3 \text{ l/(l}\cdot\text{h)}$ ist ergänzend in Abb. 3.11B dargestellt.

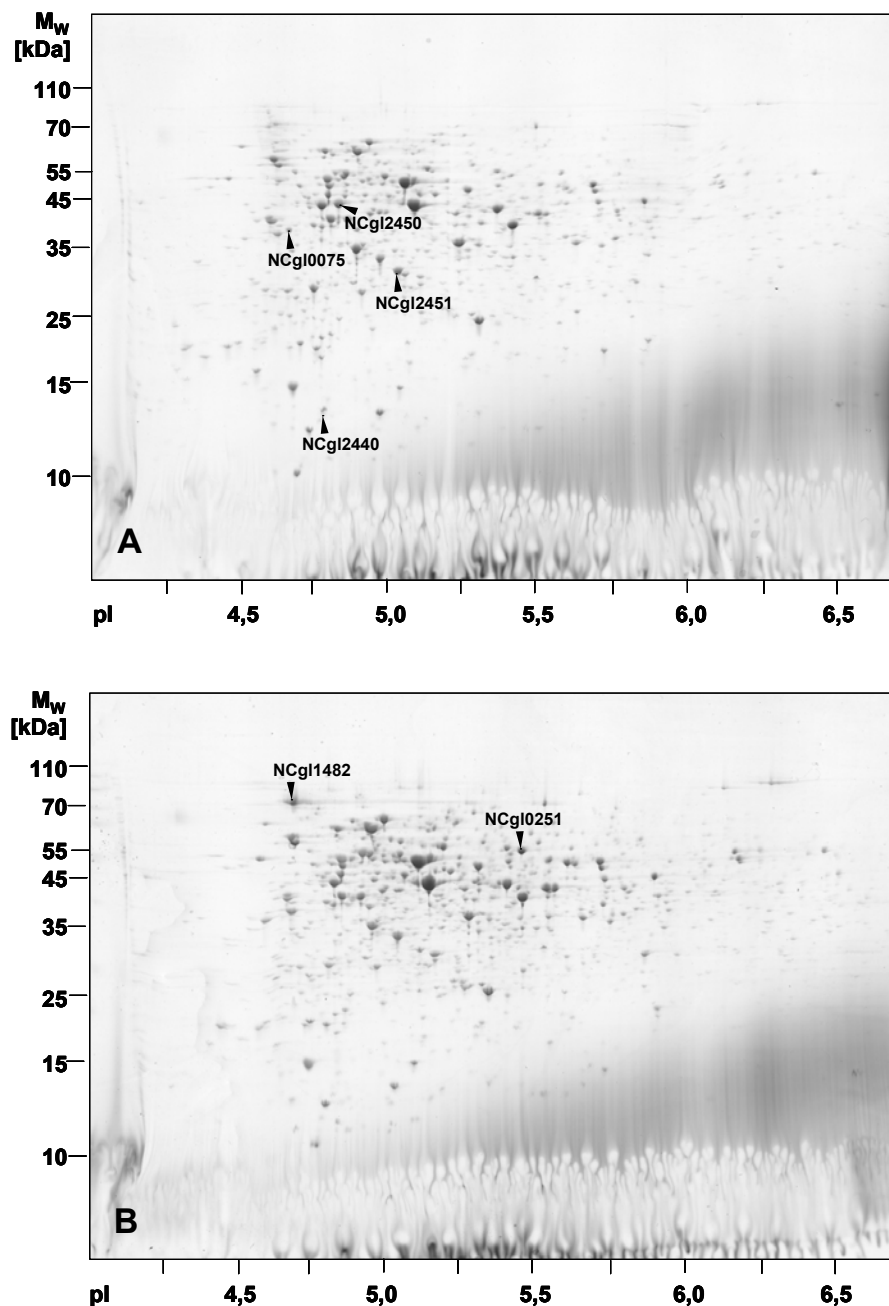


Abbildung 3.11: Proteommuster der cytoplasmatischen Proteinfraction von *C. glutamicum* nach kontinuierlicher, N-limitierter Kultivierung bei verschiedenen Wachstumsraten. Einer Fermentation wurden im kontinuierlichen Gleichgewicht bei einer Durchflussrate von $D_{gr} = 0,15 \text{ l/(l}\cdot\text{h)}$ (A) und $D = 0,3 \text{ l/(l}\cdot\text{h)}$ (B) Proben entnommen. Jeweils $100 \mu\text{g}$ Protein wurden über 2D-PAGE getrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Das apparente Molekulargewicht M_w der Proteine in kDa sowie der dargestellte pH-Bereich sind angegeben.

Die Durchflussrate spiegelt im stationären Gleichgewicht einer kontinuierlichen Fermentation die Wachstumsrate der Zellen wieder ($\mu = D$). In Abb. 3.10 ist also das Proteomprofil unlimitierter, bei maximaler Wachstumsrate kultivierter Zellen und das Proteomprofil N-limitierter, bei einer Wachstumsrate $\mu_{kl} = 0,075$ 1/h wachsender Zellen gezeigt. Aus Abbildung 3.11A ist ersichtlich, dass sich das Proteommuster N-limitierter, bei einer Wachstumsrate von $\mu_{gr} = 0,15$ 1/h wachsender Zellen nicht grundlegend von dem bereits bekannten unterschied. Dies bestätigte sowohl die mit dem Programm *Delta2D* angefertigte Falschfarbendarstellung der entsprechenden Gele (nicht gezeigt), als auch die durchgeführte Quantifizierung. Die Unterschiede, welche auf Transkriptomebene detektierbar waren, konnten daher nicht auf Proteomebene verifiziert werden.

Das Proteommuster bei der höchsten Wachstumsrate, $\mu = 0,3$ 1/h, zeigte einige deutliche Unterschiede zu den beiden niedrigeren N-limitierten Zuständen. Diese sind in Abb. 3.11 markiert, müssen aber wegen Mangels eines biologischen Replikates unter Vorbehalt betrachtet werden. Vier Proteine konnten in geringerer Intensität bei der höchsten Wachstumsrate detektiert werden. Es handelte sich um die Creatinindeaminase (NCgl0075), einen putativen Transkriptionsregulator (NCgl2440) und die beiden hypothetische Proteine NCgl2450 und NCgl2451. Die beiden Letzteren zeigten auf Transkriptom- und Proteomebene unter N-Limitierung in den vorangegangenen Vergleichen eine starke Zunahme. Ihre markante Rolle scheint sich daher auf niedrige Wachstumsraten zu beschränken. Eine höhere Proteinmenge konnte bei $\mu = 0,3$ 1/h für die Aconitase (NCgl1482) und die Katalase (NCgl0251) gezeigt werden.

3.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien

Eine wichtige Grundlage für die Regulation auf zellulärer Ebene stellen Protein-Protein-Interaktionen dar, da über sie ein Informationsaustausch stattfindet. Die N-Kontrolle ist ein gut untersuchtes System zur Regulation der Antwort auf Stickstoffmangel bei *C. glutamicum*. Innerhalb dieses Netzwerks ermöglicht die Interaktion einzelner Komponenten miteinander die Feinabstimmung zur Anpassung an die neuen Umweltbedingungen. Verknüpfungen der N-Kontrolle zu anderen Netzwerken sind bis dato nicht bekannt.

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen sollte im Rahmen dieses Projektes zunächst das für Hefe bewährte System der *Tandem Affinity Purification* für *C. glutamicum* etabliert werden. Ergänzend sollte die einfachere *Pull-Down-Methode* Aufschluss über mögliche Interaktionspartner geben.

3.4.1 *Tandem Affinity Purification-* (TAP-) Methode

Die *Tandem Affinity Purification-* (TAP-) Methode stellt eine Proteinreinigung über zwei hoch-affine Module dar. Das Zielprotein wird mit dem aus einem Calmodulinbinderpeptid und einer doppelten Protein A-Sequenz aus *Staphylococcus aureus* bestehenden TAP-tag fusioniert. Über zwei aufeinanderfolgende Affinitätschromatografien kann dann eine hochgradige Reinigung des Zielproteins im Komplex mit seinen Interaktionspartnern erzielt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen Zielproteinen gearbeitet, GlnK-TAP, AmtR-TAP und Enolase-TAP. Die Proteine GlnK und AmtR sind wichtige Komponenten der N-Kontrolle, für die eine Interaktion postuliert wird.

Alle Fusionsproteine wurden *in vivo* in *C. glutamicum* synthetisiert. Direkt aus dem Zellextrakt sollte der um das Fusionsprotein bestehende Proteinkomplex gereinigt werden. Dazu wurden die *C. glutamicum*-Zellen mit den plasmidcodierten Fusionsproteinen einerseits unter Stickstoffüberschuss und andererseits unter Stickstoffmangel angezogen. Die erste Affinitätschromatographie erfolgte über die Bindung der doppelten Protein A-Sequenz des TAP-tags an IgG-Sepharose. Für alle Fusionsproteine zeigte sich, dass in diesen Elutionsfraktionen trotz ausreichender Waschschriffe eine unerwartet große Anzahl von Proteinen enthalten war (Daten nicht gezeigt). Der erste Aufreinigungsschritt führte zwar zu einer deutlichen Abreicherung der Proteinmenge aus dem Zellextrakt, zur Reinigung des Ziel-Proteinkomplexes reichte er allein jedoch nicht aus. Daher musste die zweite Affinitätschromatographie über die Bindung des TAP-tags an Calmodulin-Säulen zwingend angeschlossen werden. Pro Fusionsprotein und N-Versorgungszustand der Zellen wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Aus Abb. 3.12 sind die Ergebnisse der TAP-Reinigungen mit den Fusionsproteinen GlnK-TAP (A), AmtR-TAP (B) und Enolase-

TAP (C) ersichtlich. Die Reinigung aus ausreichend mit Stickstoff versorgten (+N) und N-gehungerten (oN) *C. glutamicum*-Kulturen ist dargestellt.

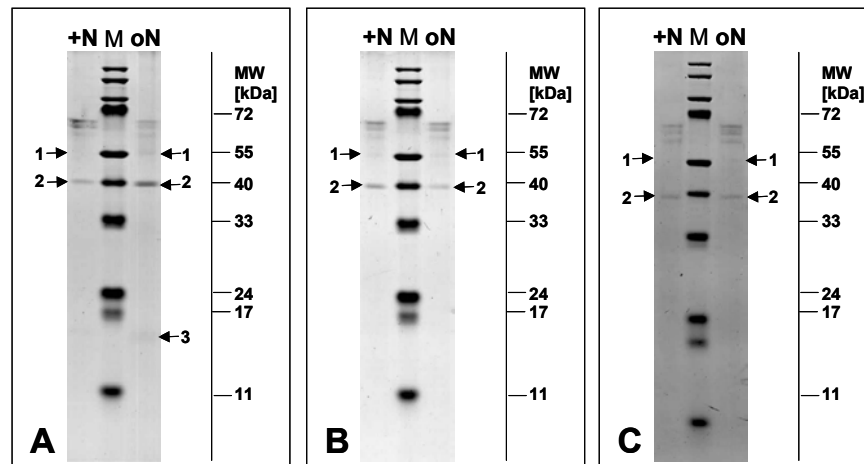


Abbildung 3.12: Tandem Affinity-Reinigung mit plasmidcodiertem (A) GlnK-TAP, (B) AmtR-TAP und (C) Enolase-TAP aus *C. glutamicum*. Die Zellen wurden im Schüttelkolben unter Stickstoffüberschuss (+N) und unter Stickstoffhungern (oN) kultiviert. Zur Induktion der Synthese des jeweiligen Fusionsproteins wurde 1 mM IPTG zugesetzt. Die gesamte Elutionsfraktion wurde TCA-gefällt, über 1-D-PAGE getrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Die Position des Markers (M) und das apparente Molekulargewicht in kDa (MW) sind angegeben. Die markierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und sind in Tab. 3.10 aufgelistet.

Die Elutionsfraktionen enthielten sehr wenige Proteine, welche zudem in allen TAP-Aufreinigungen detektiert werden konnten. Keines der getesteten Fusionsproteine war nach der Elution nachweisbar. Bei den Proteinbanden unterhalb der 72 kDa-Bande des Markers (M) handelte es sich um Verunreinigungen im Probenpuffer der SDS-Gelelektrophorese, die in allen aufgetragenen Proben vorhanden waren. Zwei Proteine wurden in allen Elutionsfraktionen (1, 2) und ein weiteres in geringer Menge nur in einer Elutionsfraktion (3) detektiert. Diese Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und sind in Tab. 3.10 aufgelistet.

Tabelle 3.10: Durch Tandem Affinity-Aufreinigung identifizierte Interaktionspartner von GlnK, AmtR und Enolase aus *C. glutamicum*. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben.

Spot	NCgl Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
1	NCgl0935	<i>eno</i>	Enolase	44,9	4,65
2	NCgl2673	<i>fda</i>	Fructosebisphosphataldolase	37,2	5,04
3			kein ähnliches Protein identifizierbar		

Die Enolase (1) und die Fructosebisphosphataldolase (2) konnten als falsch-positive Proteine in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Zum Teil waren sie nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Ein einzelnes Protein konnte aus N-gehungerten Zellen mit GlnK-TAP isoliert, jedoch nicht identifiziert werden.

Die TAP-Reinigung hat sich in der angewendeten Form aus noch ungeklärten Gründen als ungeeignet erwiesen. Obwohl sie auch für wenig abundante Fusionsproteine in Hefe erfolgreich etabliert werden konnte (Gavin *et al.*, 2002), reichte die Menge an Fusionsprotein in *C. glutamicum* nicht für eine erfolgreiche Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen aus.

3.4.2 Pull Down-Methode

Ergänzend zur TAP-Methode sollte zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen die *Pull-Down*-Methode etabliert werden. Deren Prinzip basiert auf der spezifischen Bindung zwischen Zielprotein und geeignetem Säulenmaterial. Durch moderate Waschkonditionen werden unspezifisch bindende Proteine entfernt, stark bindende Interaktionspartner verbleiben mit dem Zielprotein an der Säule und können abschließend eluiert und analysiert werden.

Im Rahmen dieses Projektes wurde das GlnK-Protein aus *C. glutamicum* mit einem His-tag versehen. Mit dem konstruierten *C. glutamicum*-Vektor konnte aus ungeklärten Gründen keine Expression erreicht werden (Daten nicht gezeigt), daher musste heterolog in *E. coli* synthetisiertes, gereinigtes GlnK-His-Protein eingesetzt werden. Über MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, dass so gewonnenes GlnK-His an Tyr-51 unmodifiziert war (Daten nicht gezeigt). Das Zielprotein GlnK-His wurde zunächst an eine *TALON®Metal Affinity*-Säule gebunden und alle *E.coli*-Proteine durch stringentes Waschen entfernt. Um für die Interaktionsstudien *C. glutamicum*-Zellextrakt zu gewinnen, welche GlnK in einem vergleichbaren Modifizierungsstatus enthalten, wurden die Zellen im Anschluss an eine Phase des zweistündigen Stickstoffhungers einem zehnmütigen Stickstoffpuls mit 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unterworfen. Dieser *C. glutamicum*-Zellextrakt wurde auf die Säule aufgetragen und alle nicht gebundenen Proteine wurden abgewaschen. Die Elution erfolgte sequenziell in drei Schritten. Die resultierenden Fraktionen wurden über 1-D-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.13) und die Ergebnisse über zwei unabhängige Reinigungen mit zwei verschiedenen GlnK-His-Chargen validiert.

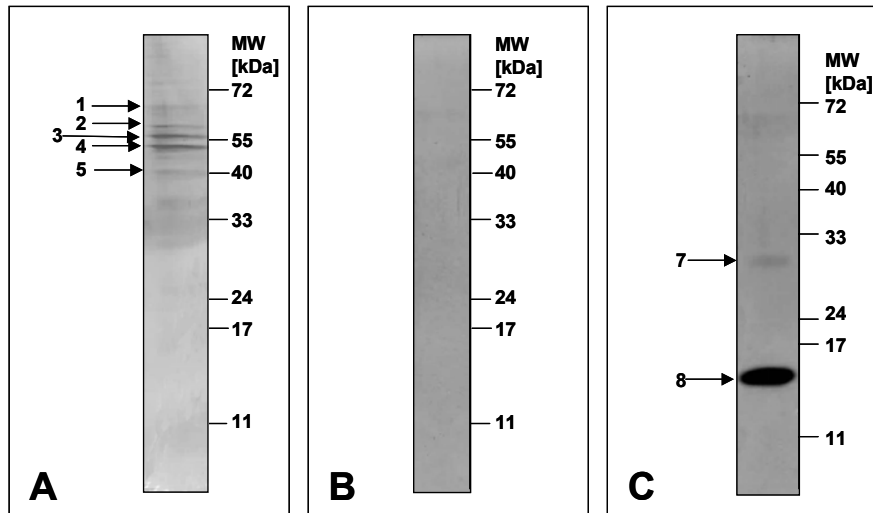


Abbildung 3.13: Pull Down-Experiment mit GlnK-His. Das Fusionsprotein aus *C. glutamicum* wurde heterolog in *E. coli* synthetisiert. 250 µg gereinigtes Protein wurde an eine *TALON®Metal Affinity*-Säule (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) gebunden und mit *C. glutamicum*-Zellextrakt inkubiert. Nach ausreichendem Waschen erfolgte die Elution in drei Schritten mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer: (A) 20mM, (B) 40 mM und (C) 250 mM Imidazol. Das apparente Molekulargewicht MW in kDa ist angegeben. Die markierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und sind in Tab. 3.11 aufgelistet.

Aus Abb. 3.13 ist ersichtlich, dass in der ersten Elutionsfraktion insgesamt sechs Proteine detektiert werden konnten. Die zweite Elutionsfraktion enthielt erwartungsgemäß keine Proteine. Im letzten Elutionsschritt wurde das Zielprotein zusammen mit einer weiteren Proteinbande nachgewiesen. Alle detektierten Proteine wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert, sie sind der Tab. 3.11 zu entnehmen.

Tabelle 3.11: Durch Pull Down-Experimente identifizierte Interaktionspartner von GlnK-His aus *C. glutamicum*. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), zusätzlich sind das Molekulargewicht (M_w) und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) angegeben.

Spot	NCgl Nr.	Gen-Name	Annotation	M_w [kDa]	pI
1			kein ähnliches Protein identifizierbar		
2	NCgl1132	<i>argS</i>	Arginyl-tRNA-Synthetase	59,7	4,81
3	NCgl1526	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-DH	36,0	5,16
4	NCgl0480		Elongationsfaktor EF-Tu	43,9	4,92
5	NCgl0624	<i>metX</i>	Homoserin-o-Acetyltransferase	41,2	5,12
	NCgl1580		Koenzym F420-abh. N5,N10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Reduktase	41,8	5,64
6			kein ähnliches Protein identifizierbar		
7	NCgl1982	<i>glnK</i>	P _{II} -Typ Signaltransduktionsprotein GlnK	12,2	5,01
8	NCgl1982	<i>glnK</i>	P _{II} -Typ Signaltransduktionsprotein GlnK	12,2	5,01

Mit Hilfe der *Pull-Down*-Methode gelang der Nachweis, dass unmodifiziertes GlnK-Protein aus *C. glutamicum* Trimere ausbildet. Neben der GlnK-Bande bei ca. 13 kDa (8) konnte GlnK mit einer Sequenzabdeckung von > 80% auch einwandfrei in der darüberliegenden 30 kDa-Bande (7) nachgewiesen werden (Abb. 3.13C). Die Trimerisierung war im SDS-Gel nachweisbar, obwohl die Elutionsfraktionen vor der Beladung des Geles bei 95°C denaturiert wurden, d. h. die Rekonstitution der Trimere erfolgte sehr schnell. Außerdem konnten durch die Identifizierung der Arginyl-tRNA-Synthetase (2), der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (3), des Elongationsfaktors EF-Tu (4), der Homoserin-o-Acetyltransferase (5), der N₅,N₁₀-Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (5) und zweier unbekannter Proteine (1, 6) Hinweise auf weitere spezifische Interaktionspartner gefunden werden.

4 Diskussion

Stickstoff ist eine wichtige Schlüsselkomponente in biologischen Molekülen. Viele Mikroorganismen besitzen spezifische Anpassungsstrategien, mit denen sie auf schwankende Umweltbedingungen reagieren können. Eine schnelle und wirkungsvolle Adaptation erlauben globale regulatorische Netzwerke. In *C. glutamicum* stellt die sogenannte Stickstoffkontrolle einen solchen systematischen und zielgerichteten Regulationsmechanismus zur Reaktion auf Stickstoffmangel dar. Ihr globaler Repressor AmtR bindet unter Stickstoffüberschuss an ein konserviertes Bindemotiv im Promotorbereich von mehreren Genen und Operonen. Dies hat die Regulation von mindestens 37 Genen zur Folge (Beckers, 2004). Insbesondere Gene, welche für Transportproteine alternativer Stickstoffquellen (*amtA*, *amtB*, *urtABCDE*, *crnT*, *gluABCD*), für Enzyme zur Stickstoffassimilation und -metabolisierung (*codA*, *glnA*, *gltBD*, *ureABCEFGD*) und für Komponenten der spezifischen Signaltransduktionskette (*glnD*, *glnK*) codieren, besitzen Bindestellen für AmtR. Unter Stickstoffmangel wird die Repression innerhalb von wenigen Minuten aufgehoben, so dass die Zelle über alternative Möglichkeiten zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs verfügt.

Die vorliegende Arbeit unterteilte sich in vier ineinander verzahnte Projekte. Die beiden zentralen Arbeitsfelder waren erstens die globale Analyse von Stickstoffhunger und zweitens die umfangreiche Charakterisierung des Einflusses einer Stickstofflimitierung sowohl auf Transkriptom-, als auch auf Proteomeebene. Um ein möglichst vollständiges Bild des Proteomprofils zu erhalten, war ein weiteres Ziel die Optimierung der 2-D-Gelelektrophorese von Membranproteinen. Punktuell erfolgte im vierten Projekt die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Zusammenhang mit dem Regulationsnetzwerk Stickstoffkontrolle.

4.1 Optimierung der 2-D-PAGE von Membranproteinen

Komplexe Proteingemische können durch eine Auftrennung über den spezifischen isoelektrischen Punkt und das Molekulargewicht ihrer Komponenten getrennt werden. Mehrere tausend der zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle synthetisierten löslichen Proteine können über eine solche 2-D-Gelelektrophorese gleichzeitig dargestellt werden (Görg *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2003). Für *C. glutamicum* hat sich die Analyse von Subproteomen auf 2-D-Gelen besonders bewährt (Hermann *et al.*, 2000). Eine Vorfractionierung mittels Ultrazentrifugation liefert eine lösliche, cytoplasmatische Proteinfraction und eine unlösliche Membranfraction. Die Auftrennung der cytoplasmatischen Proteinfraction ist unproblematisch und resultiert in Proteomprofilen mit 550-1300 einzelnen *Spots*. Diese Anzahl an detektierten Proteinen ist abhängig von dem pH-Bereich der IPG-Streifen und der Färbemethode

(Schaffer *et al.*, 2001). Die Auflösung von *C. glutamicum*-Proteingruppen mit extremen physikochemischen Eigenschaften funktioniert über 2-D-PAGE oft noch nicht adäquat, so dass Optimierungsbedarf für sehr hydrophobe Proteine und solche mit sehr hohem bzw. niedrigem *pI* existiert. In der Membranfraktion konnten bis dato keine Proteine mit integralen Membranbestandteilen detektiert werden (Hermann *et al.*, 1998; Schaffer *et al.*, 2001). Insbesondere für Analysen von Stickstoffmangel wäre die Etablierung der 2-D-PAGE für Membranproteine interessant. So kodieren in *E. coli* 2/3 aller unter Stickstoffmangel regulierten Gene für Transportproteine (Zimmer *et al.*, 2000). Für *C. glutamicum* ist eine ähnliche Tendenz zu erwarten, da allein die Genprodukte von 17 der 37 bisher identifizierten AmtR-regulierten Gene Transportproteine sind (Beckers, 2004).

Aufbauend auf den bestehenden Protokollen wurden sequenziell einzelne Schritte der 2-D-PAGE für Membranproteine verändert. Durch stringendere Waschbedingungen und den Austausch des Detergenz zur Solubilisierung konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Abreicherung von sehr abundanten cytoplasmatischen Proteinen wie z.B. der Enolase, des Elongationsfaktors Tu und der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase erreicht werden (Abb. 3.1). Die Identifizierung von 55 Proteinen über MALDI-TOF-Massenspektrometrie lieferte einen repräsentativen Überblick über die Membranfraktion von *C. glutamicum* (Tab. 3.2). Ein auffällig großer Anteil der Proteine (ca. 29%) war nicht identifizierbar. Dies resultiert vermutlich aus der zusätzlichen Reinigung und Konzentrierung über C_{18} -Säulen, welche bei wenig abundanten Proteinen gleichzeitig zu nicht ausgleichbaren Ausbeuteverlusten führt. Denkbar wäre auch ein ineffizienter Trypsinverdau. Integrale Bestandteile von Membranproteinen besitzen wenige Trypsinschnittstellen, so dass viele Peptide möglicherweise außerhalb des analysierten Massenbereiches von 0,8-4,0 kDa liegen. Des Weiteren sind insgesamt 51% der identifizierten Proteine im Cytoplasma lokalisiert, weitere 11% liegen in Assoziation zu Membranproteinen vor und keine Proteine mit integralen Membranbestandteilen waren nachweisbar. Die angewendete Methode verfehlte daher ihr eigentliches Ziel. Die Ursache für die Unterrepräsentierung der letztgenannten Gruppe lag weder in der Solubilisierung, noch im eigentlichen Übergang der Proteine in die erste, pH-abhängige Dimension. Bei der Auflösung des Modellproteins BetP konnte aber ein pH-Shift von über 2,5 pH-Einheiten an das saure Ende des IPG-Streifens nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Offensichtlich binden saure Komponenten an das Membranprotein und verschieben seinen theoretischen *pI*. In diesen Prozess sind vermutlich saure Phospholipide der *C. glutamicum*-Zellmembran involviert. Das dominierende Phospholipid ist mit einem Anteil von 70-80 % Phosphatidylglycerol (Überblick, Eggeling und Sahm, 2001a). Diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgestellte Hypothese konnte mit Hilfe einer Lipidanalyse bestätigt werden: saure Phospholipide sind in der Membranfraktion enthalten und können auch von isolierten Membranproteinen extrahiert werden (A. Wittmann, persönliche Mitteilung).

Da der apparente *pI* sich durch die Bindung saurer Phospholipide stark vom theoretischen *pI* des Membranproteins unterscheidet, ist der Einsatz pH-abhängiger Methoden wie der 2-D-PAGE zur Auftrennung dieser Fraktion nicht geeignet. Erst wenn die Abtrennung der sauren Störsubstanzen z.B. durch den Einsatz von Phospholipasen vollständig gelingt, sind weiterführende Arbeiten zur Optimierung der 2-D-PAGE als einfacher und effektiver Methode zur Darstellung des Membranproteoms von *C. glutamicum* sinnvoll.

4.2 Globale Analyse von Stickstoffhunger

Die Mechanismen der stickstoffabhängigen Regulation wurden bereits bei verschiedenen Modellorganismen untersucht und konnten z. B. für *E. coli* und *B. subtilis* weitgehend aufgeklärt werden. Die Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* unterscheidet sich deutlich von der in anderen Modellorganismen (Burkovski, 2003a). Die Genregulation erfolgt hier über das globale Repressorprotein AmtR (Beckers, 2004), welches die Transkription der kontrollierten Gene nur bei Auslösen einer Signalkaskade in Folge eines Stickstoffmangels freigibt.

Ziel des hier vorgestellten Projektes war die Identifizierung weiterer Kandidaten, deren Expression und Synthese abhängig von der Stickstoffversorgung der Zelle ist. Globale Analysetechniken dienen auf Transkriptom- und Proteomebene zur Identifizierung aller Gene und Proteine mit Relevanz für die Antwort auf Stickstoffhunger. Ein solcher Nahrungsmangel konnte im Kleinkultursystem Schüttelkolben durch ersatzloses Streichen der Stickstoffquellen realisiert werden. Für aerobe Prozesse besteht jedoch in Schüttelkolben die Gefahr einer zusätzlichen Mangelsituation bezüglich der Sauerstoffquelle. Eine multiple Mangelsituation konnte durch die Aufnahme von Profilen der Sauerstofftransferate ausgeschlossen werden. Weder im stickstoffhaltigen, noch in stickstofffreien MM1-Minimalmedium lag unter den gewählten Versuchsbedingungen ein Sauerstoffmangel vor (Abb. 3.3 und 3.5).

Mit Hilfe von DNA-*Microarrays* gelang der Vergleich der Transkriptomprofile ausreichend mit Nährstoffen versorgter und stickstoffgehungelter Zellen (Abb. 3.6, Tab. 3.3). *C. glutamicum* reagierte auf Stickstoffhunger mit der umfangreichen Anpassung seiner Transportkapazität. Dabei stand die Aufnahme von alternativen Stickstoffquellen im Vordergrund. Die intensivere Transkription der AmtR-regulierten Gene *amtA*, *amtB*, *urtABCDE* und *crnT* ermöglicht der Zelle die Neusynthese von Transportproteinen für Ammonium, Harnstoff und Creatinin. Diese Daten bestätigten für *C. glutamicum* eine von Zimmer *et al.* (2000) bereits für *E. coli* beobachtete Anpassungsstrategie bei Nahrungsmangel. Die Repression der Gene *gluACD*, *NCgl1915* und *vanK* ist vor dem Hintergrund ihrer Zugehörigkeit zum AmtR-Regulon sehr interessant, wenn auch unerwartet. Möglicherweise unterliegen ihre Transkripte in stickstoffgehungelten Zellen einem verstärktem RNA-Abbau, so dass die in Folge der Derepression verstärkt stattfindende Transkription kompensiert und das Messsignal des DNA-*Microarrays*

sogar ins Gegenteil umgekehrt wird. Für diese Operone wurde die Zugehörigkeit zu einem weiteren, unbekanntem Regulationssystem postuliert und eine Verbindung zwischen Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus vorgeschlagen (Beckers, 2004). Verminderte mRNA-Konzentrationen der Gene NCgl0100, NCgl0799 und *yidC* deuteten auf eine Reduktion des Aminosäuretransportes und der Proteinsekretion hin. Die Regulation der Gene NCgl0100 und NCgl0799 kann vor den Hintergrund ihrer putativen Funktion im Aminosäuretransport nur sinnvoll interpretiert werden, sollte es sich bei den Genprodukten um Exportproteine handeln. In diesem Fall hätte die Zelle auf Expressionsebene reguliert, um überflüssigen Verlust an Stickstoffquellen über die Zellmembran zu unterbinden. Diese Annahme liefert eine Basis für Arbeiten im Bereich *Functional Genomics*, da die Transkriptomvergleiche dieser Arbeit weitere wichtige Anhaltspunkte für die Funktion des Genproduktes lieferten. Auch eine Neuregulation des Ionentransportes konnte durch die Regulation von neun Genen gezeigt werden, wobei fünf Gene verschiedener ABC-Typ Fe^{3+} -Transporter betroffen waren. Interessanterweise waren die für zwei Transporter kompatibler Solute codierenden und an der direkten Reaktion auf hyperosmotischen Stress beteiligten Gene *betP* und *putP* reprimiert. Das gleiche Regulationsmuster trat für *cspA*, NCgl0786 und *sod* auf, deren Genprodukte in die Kälte- und O_2 -Stressantwort involviert sind. Zugunsten der akuten Antwort auf Stickstoffhunger wurden die Reaktionsmöglichkeiten auf andere Stresssituationen reduziert. Des Weiteren traten zwei Glucose- bzw. Saccharose-spezifische Transporter (*ptsG*, *ptsS*), zwei ABC-Typ Zuckertransporter (NCgl2373, *msiK1*), ein Exportprotein für ein Zelloberflächenpolysaccharid (*wzx*) und zwei uncharakterisierte Komponenten von ABC-Transportern auf Transkriptomebene vermindert auf. Aus dem nachgewiesenen Regulationsmuster ergibt sich die Vermutung, dass *C. glutamicum* in eine Art Energiesparmodus umschaltet. Die stickstoffgehungerte Zelle scheint alle für den Moment unnötigen und energieverbrauchenden Transportprozesse auf ein Minimum zu reduzieren.

Ein weiterer wichtiger Adaptationsmechanismus ist die Reorganisation metabolischer Stoffwechselwege. Ergänzend zur Regulation der Aufnahme alternativer Stickstoffquellen gewährleistete die höhere Expression der Gene *glnA*, *gltBD*, *codA* und *ureACEFGD* ihre effiziente Metabolisierung. Der hochaffine GS/GOGAT-Weg zur Ammonium- und Glutamat-Assimilation stand dadurch ebenso zur Verfügung wie die von Bendt *et al.* (2004) charakterisierte Creatinindeaminase und die Urease. Für das *ure*-Operon konnten Nolden *et al.* (2000) in vergleichbaren Schüttelkolbenexperimenten über RNA-Hybridisierung mit spezifischen RNA-Sonden keine Regulation feststellen, obwohl die Aktivität der Urease unter Stickstoffmangel signifikant zunahm. Im Rahmen dieses Projektes zeigte sich eine eindeutige, 4- bis 8-fache Induktion, was auf eine gute Qualität und Sensitivität der eingesetzten DNA-Microarrays hinweist. Die Reorganisation beschränkte sich nicht nur auf assimilatorische Reaktionen, sondern konnte auch für *de novo*-Synthesewege von

Aminosäuren beobachtet werden. Die Transkriptionsregulation deutete auf eine verminderte Synthese von aromatischen Aminosäuren, Cystein und Prolin hin. Mit der beobachteten Induktion von *dapD* stand der Zelle der hochaffine Weg zur Diaminopimelat- und damit zur Zellwandbiosynthese zur Verfügung. Neben *dapD* wiesen die Gene *otsB* und NCgl0243 auf die Aufrechterhaltung der Zellwandbiosynthese hin. Des weiteren erscheint die Induktion von Genen, deren Produkte eine Funktion in Aminosäurebiosynthesewegen mit Ausnahme der AmtR-regulierten Gene *soxA* und *ocd* sinnlos, da unnötig Stickstoff verbraucht würde.

Der Einfluss von Stickstoffhunger auf die Stoffwechselwege des C-Metabolismus war auf nur wenige Maßnahmen zur Anpassung begrenzt. Hinweise auf eine Einschränkung des Tricarbonsäurezyklus gab die Repression der Gene *sdhA*, *sucC* und *sucD*. In Folge der verminderten Aufnahme von Glucose erscheint dies konsequent, dem widerspricht allerdings die 3-fache Induktion des für die Aconitase codierenden Gens (*acn*). Da die Enzymreaktionen der Succinyl-CoA-Synthase (*sucCD*) und der Succinatdehydrogenase (*sdhA*) an eine ATP- und FADH+H⁺-Bildung gekoppelt sind, würde die Zelle eine wichtige Möglichkeit zur Synthese von Energiereserven verlieren, sollte sich das auf Transkriptionsebene entstandene Bild auf die Translationsebene fortsetzen. Der von Schmid *et al.* (2000) beobachtete und in dieser Arbeit bestätigte (Abb. 3.5) erhöhte Sauerstoffbedarf stickstoffgehungerter *C glutamicum*-Kulturen ist in Korrelation mit einem erhöhten Energiebedarf zu sehen. Dieser muss über alternative Wege gedeckt werden, für die jedoch im vorliegenden Transkriptomvergleich keine Regulation nachgewiesen werden konnte. Der Glyoxylat-Zyklus ist nur bei Acetat als C-Quelle relevant, die Zelle verzichtete auf die Genexpression von *aceA* und *aceB*.

Während die Regulation von acht Genen lediglich Anhaltspunkte für eine Einschränkung des Nukleotidstoffwechsels und des RNA-Abbaus lieferte, zeigte sich eine klare Reduktion der Proteinsynthesekapazität als ein weiterer bestimmender Adaptationsmechanismus. Die Repression von 38 Genen, deren Produkte ribosomale Proteine und Translationsinitiationsfaktoren sind, wies neben der negativen Regulation für Komponenten der Aminosäurebiosynthese darauf hin. Gleichzeitig verstärkte die Zelle Peptidabbau und Proteolyse (*pepB*, *dcp*, NCgl0274, NCgl2737) und passte Mechanismen der Proteinmodifikation den neuen Umweltbedingungen an. Die Expression von Genen einer Proteinphosphatase (*ptpA2*), zweier Proteinkinasen (*argK*, *ptsl*), eines *Response*-Regulators eines 2-Komponentensystems (*cgtR3*) und einer Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase (*ppiA*) wurde unterdrückt. Da Proteinmodifikationen entscheidend zur Informationsübertragung bei Signalkaskaden beitragen, kann ein Einfluss von Stickstoffhunger auf funktionell nicht bekannte Regulationsnetzwerke angenommen werden. Auf eine solche Verknüpfung zu anderen globalen Regulationssystemen deutete auch die veränderte Transkription von *ramB*, *cgtR3* und zweier weiterer für unbekannte Transkriptionsregulatoren codierender Gene hin. Für *cgtR3* konnte

im Zusammenhang mit Phosphathunger eine transiente Regulation nachgewiesen werden (Ishige *et al.*, 2003). Das *ramB*-Genprodukt ist das globale Repressorprotein des Acetatmetabolismus (Gerstmeir *et al.*, 2004). Neun Gene mit putativen RamB-Bindestellen im Promotorbereich konnten unter den regulierten Genen identifiziert werden (*aceA*, *aceB*, *acn*, *sucD*, NCgl0308, NCgl0379, *ptsG*, *ptsS*, *serC*). Eventuell handelt es sich hier um einen indirekten Regulationseffekt, da die veränderte Transkription des *ramB*-Gens Einfluss auf das von diesem Repressor regulierte Netzwerk hat. Der Acetatmetabolismus wird zusätzlich über das Aktivatorprotein RamA reguliert, dessen Gen (Prof. Dr. B. Eikmanns, persönliche Mitteilung) aber im vorliegenden Vergleich keiner Regulation unterlag.

Die Kombination der DNA-*Microarray*-Analyse mit der globalen Analyse des cytoplasmatischen Proteoms mittels 2-D-PAGE sollte ergänzend den Effekt auf Proteinebene klären. Obwohl sich die vielschichtigen Änderungen in der Expression von Genen auf Proteinebene widerspiegeln sollten, lieferte die Analyse nur drei signifikante Unterschiede (Abb. 3.7, Tab. 3.4). Die fast völlige Abwesenheit regulierter Proteine könnte bedeuten, dass sich das Proteom stickstoffgehungter Zellen in einem *Steady-State*-Zustand befindet.

Zusammenfassend konnten bei *C. glutamicum* auf Expressionsebene drei Kernkomponenten der Adaptation an abrupt einsetzenden Stickstoffhunger identifiziert werden: die Anpassung der Transportkapazität, die Reorganisation metabolischer Stoffwechselwege und die Reduktion der Proteinsynthesekapazität. Insbesondere der Einfluss auf Proteinsynthese und Proteolyse konnte als neuer und bis dato gänzlich unbekannter Aspekt definiert werden. Ähnliche Transkriptomvergleiche führten zur Beschreibung des Phosphathunger- (Ishige *et al.*, 2003), des L-Valin- (Lange *et al.*, 2003), des Hitzeschock- (Muffler *et al.*, 2002) und des Acetat-Stimulons (Gerstmeir *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2002; Muffler *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit angestellte globale Analyse erweitert diese Erkenntnisse um die Beschreibung des Stickstoffhunger-Stimulons. Die zelluläre Reaktion auf Stickstoffhunger war offensichtlich auf die Expressionsebene begrenzt.

4.3 Globale Analyse einer Stickstofflimitierung

Stickstoffhunger setzt einen abrupten Entzug der Stickstoffquelle voraus, welcher einfach im Labormaßstab realisierbar ist. Mit der tatsächlichen Mangelsituation in der natürlichen Umgebung des Bodenbakteriums *C. glutamicum* hat er wenig gemeinsam. Daher wurde als wichtiger alternativer Zustand für die Zelle die Stickstofflimitierung analysiert. Diese Art der Stickstoffversorgung ist für Produktionsprozesse einiger Aminosäuren ein entscheidender Faktor für die Wirtschaftlichkeit, da sich eine hohe Ammoniumkonzentration negativ auf das Wachstum und die Produktivität auswirken (Eggeling *et al.*, 2001b). Ein komplexes Kultivierungssystem, welches die Verfügbarkeit der Stickstoffquelle auf einem gleichbleibend

niedrigen Level erlaubt, konnte im Rahmen dieses Projektes erfolgreich für *C. glutamicum* angepasst und betrieben werden: die kontinuierliche Fermentation im 3 L-Maßstab. Analog zur globalen Analyse von Stickstoffhunger führte der Vergleich von Transkriptom- und Proteomprofilen zur Identifizierung aller unter Stickstofflimitierung relevanten Gene und Proteine.

Der Vergleich unlimitierter mit stickstofflimitierten Zellen über DNA-*Microarrays* wies auf substanzielle Unterschiede zwischen Stickstofflimitierung und -hunger hin (Abb. 3.8, Tab. 3.5). Mit Ausnahme des Genclusters *vanA-vanB-vanK* (NCgl2300-02) zeigte sich für alle AmtR-regulierten Gene die erwartete Aufhebung der Repression. Diese Gruppe von Genen fiel durch zum Teil extrem hohe Regulationsfaktoren von bis zu 76 auf. Die unter Stickstoffhunger beobachtete umfangreiche Angleichung der Transportkapazität bestätigte sich auch als Anpassungsstrategie für die Stickstofflimitierung. Der Suche nach alternativen Stickstoffquellen kam eine äquivalente, sehr entscheidende Bedeutung zu. Nicht nur die Neusynthese von Transportproteinen für Ammonium, Harnstoff und Creatinin, sondern auch für Glutamat und Oligopeptide wurde durch Induktion auf Transkriptomebene ermöglicht. Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die Induktion von NCgl2051, dem Gen eines ABC-Typ Aminosäuretransporters, da es eine Grundlage für *Functional Genomics* liefert. In *C. glutamicum* konnte die Existenz von Transportern für die Stickstoffquellen Arginin, Allantoin und Ornithin bisher nicht bewiesen werden und ein sekundärer Glutaminimporter wurde bisher biochemisch, jedoch nicht genetisch charakterisiert (Siewe et al., 1995). NCgl2051 sollte vor diesem Hintergrund auf eine mögliche Rolle im Arginin-, Ornithin- oder Glutamintransport untersucht werden. Bei stickstofflimitierten Zellen zeigte sich außerdem eine große Relevanz des Transportes von C-Quellen. Die Gene des Transportes von Glucose (*ptsG*), unbekanntem Zuckern (*msiK1*), Gluconat (*gntP*) und Di- bzw. Tricarboxylaten (NCgl1968) lagen induziert vor. In stickstoffgehungerten Zellen konnte diesbezüglich eine gegensätzliche Regulation beobachtet werden. Durch ihre verminderte Transkription kann eine Reduktion des Transportes kompatibler Solute und des Transportes von Eisen-, Kobalt- und Calciumionen angenommen werden. Auch unter Einfluss einer Substratlimitierung scheint *C. glutamicum* alle für den Moment unnötigen und energieabhängigen Transportprozesse auf ein Minimum zu reduzieren. Vier Gene des uncharakterisierten ABC-Transportes unterstreichen diese These insbesondere bei niedriger Zellwachstumsrate.

Als zweiten wichtigen Adaptationsmechanismus verifizierten die DNA-*Microarray*-Analysen die Reorganisation metabolischer Stoffwechselwege. Die Regulation erwies sich für die Limitierungssituation jedoch als wesentlich gerichteter. Neben Genen der Metabolisierung der importierten Stickstoffquellen intensivierte die Zelle ihre Möglichkeiten zur NH₃-Bereitstellung (*ocd*, *cysK*). Des Weiteren reagierte sie mit der Reduktion von unnötigem Stickstoffverbrauch. Die *de novo*-Synthese der sechs z. T. basischen Aminosäuren Arginin,

Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Leucin und Lysin war herabgesetzt. Obwohl der Fluss von NH_4^+ in die Lysinbiosynthese unterbunden wurde, gewährleistete eine Induktion des hochaffinen „Succinylase-Weges“ (kodiert u.a. durch *dapD*) in Kombination mit der Repression des niedrigaffinen „Dehydrogenase-Weges“ (kodiert durch *ddh*) die effiziente Bereitstellung von D,L-Diaminopimelat zur Zellwandsynthese. Eine besondere Bedeutung kommt in dieser Gruppe dem *arg-Cluster* durch die starke Repression aller zugehörigen Gene zu. Arginin stellt eine mögliche Stickstoffquelle für *C. glutamicum* dar. Die zielgerichtete Repression verhindert daher einen unnötigen Energieverbrauch für die Biosynthese einer Komponente, welche anschließend zwecks Stickstoffgewinnung wieder abgebaut würde. Über die Regulation dieser Gene ist in *C. glutamicum* noch nichts bekannt, die Ergebnisse weisen aber auf einen zweiten direkten bzw. einen indirekten Regulations-effekt hin. Der oder die unbekannte(n) Regulator(en) des Netzwerks, welches die Argininbiosynthese reguliert, müsste in Folge der Mangelsituation auf Expressionsebene, über eine weitere Signalkaskade oder über Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst sein. Hinweise auf eine Verknüpfung der Stickstoffkontrolle mit weiteren Regulationsnetzwerken auf Expressionsebene gaben außerdem sieben Transkriptionsregulatoren und fünf Regulationsproteine, welche im Transkriptomvergleich auffielen. Inbegriffen waren zwei Untereinheiten von 2-Komponentensystemen (*cgtR3*, *cgtS10*), denen eine wichtige Rolle in der Signalübertragung auf zellulärer Ebene zukommt.

Die Induktion von *ptsG* ließ auf einen erhöhten Transport von Glucose schließen, eine Anpassung der angeschlossenen metabolischen Wege war zu erwarten. Bei guter Substratversorgung fließen etwa 62% der importierten Glucose in den Pentose-Phosphat-Weg und ca. 36 % in die Glycolyse (Kiefer *et al.*, 2004). Nur in der Glycolyse passte die Zelle die Transkription von zwei Genen an (*fda*, *gap*). Eine höhere Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase könnte das Gleichgewicht zwischen Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zugunsten des letzteren verschieben. Das hätte eine verminderte Nebenproduktbildung von Dihydroxyaceton und Glycerin und eine höhere Ausbeute an Energie- und Reduktionsäquivalenten pro mol Glucose zur Folge. Die tatsächliche Relevanz des Energiestoffwechsels zeigte sich nicht nur hypothetisch, sondern auch real an der verstärkten Präsenz der Atmungskette. Konkret wurden der Weg zur Menachinonreduktion über die Succinatdehydrogenase und der zur Elektronenübertragung über den Cytochrom-bc₁-aa₃-Superkomplex induziert (Überblick Atmungskette, Bott und Niebisch, 2003; Niebisch und Bott, 2003). Der für Stickstoffhunger im Schüttelkolben gezeigte starke Anstieg des Sauerstoffbedarfs (Kap. 3.2.1) korreliert mit einem erhöhten Energieverbrauch (Schmid *et al.*, 2000). Wie die erhöhte Expression der Atmungskettengene verdeutlicht, trifft Gleiches offensichtlich auch auf die Stickstofflimitierung zu. Das von der Durchflussrate abhängige, geringe Wachstum ($\mu_{kl} = 0,075$ bzw. $\mu_{gr} = 0,15$ 1/h) führte

konsequenterweise zu einer eingeschränkten Zellteilung. Dies wurde durch die leichte Reduktion des Nukleotidstoffwechsels, aber auch durch die Repression von zwei direkt an der Zellteilung beteiligten Genen (*parA2*, *ftsI*) deutlich. Zusätzlich wurden Gene der Zellwandsynthese reprimiert (*mraW*, *wzz*, *wzx*). Der dritte unter Stickstoffhunger beobachtete Adaptationsmechanismus, die Reduktion der Proteinsynthesekapazität, konnte unter Stickstofflimitierung nicht bestätigt werden. Das Wachstum der Zellen war zwar auf eine geringe Wachstumsrate beschränkt, aber kontinuierlich möglich, so dass die Anpassungsreaktion sich deutlich unterschied. Eine Limitierung führte zu einer Regulation zugunsten der Protein-stabilität. Proteolyse und Peptidabbau wurden gezielt unterbunden (NCgl0274, NCgl0440, *pepB*, *dcp*, NCgl2737) und die Synthese von Chaperoninen zur Verbesserung der Proteinfaltung gefördert (*groES*, *groEL*, NCgl2621).

Während der kontinuierlichen Fermentation war die Realisierung von zwei stationären Gleichgewichten bei $\mu_{kl} = 0,075$ 1/h und $\mu_{gr} = 0,15$ 1/h möglich. Daher erlaubte die DNA-*Microarray*-Analyse nicht nur den Vergleich unlimitierter und stickstofflimitierter Zellen, sondern auch den Vergleich der beiden Limitierungssituationen miteinander (Abb. 3.9, Tab. 3.6). Zwar können aus diesem Vergleich keine weiteren Erkenntnisse über die Limitierungssituation selbst gewonnen werden, dafür konnte die Regulation zur Anpassung an die höhere Wachstumsrate verfolgt werden. Hier fand mit Regulationsfaktoren zwischen 0,2 und 12 eine Feinregulation auf verhältnismäßig niedrigem Level statt. Eine wichtige Bedeutung kommt einerseits dem Creatintransport und der Creatininmetabolisierung zu, andererseits wurde der Transport von organischen Säuren wie Gluconat und Dicarboxylaten bei stärkerem Wachstum gefördert. Die zusätzliche Induktion von drei Genen des Pentose-Phosphat-Weges zeigte eine Verstärkung dieses Stoffwechselweges, außerdem intensivierte die schneller wachsende Zellen die Energiegeneration über die F_0F_1 -ATP-Synthase. Verschiedene einzelne Prozesse wurden bei der höheren Wachstumsrate wieder aufgenommen. Dazu zählten die Synthese von Speicherstoffen, die Zellwandsynthese, der Fe^{3+} -Transport, der Glycinbetaintransport und die Isoleucinbiosynthese. Interessant war auch die Neuregulation von anapleurotischen Reaktionen und von vielen Transkriptionsregulatoren. Faktisch zeigte dieser Vergleich eine Feinregulation zur Anpassung eine bessere Nahrungssituation. Die erhoffte Identifizierung von eindeutig wachstumsratenabhängig regulierten Gene gelang über diesen Ansatz nicht. Dazu müssten die Vergleiche von mindestens 3 verschiedener Durchflussraten miteinander und die zusätzliche Analyse anderer Limitationen kombiniert werden.

Die innerhalb dieser Transkriptionsanalyse erhaltenen Daten zeigen eine komplexe und gerichtete Expressionsregulation in Folge einer Stickstofflimitierung. Dabei stand die Aufnahme und Metabolisierung aller eventuell verfügbaren Stickstoffquellen im Vordergrund. Die Zelle versucht durch Reduktion unnötiger Transport- und Syntheseprozesse und die

Regulation zugunsten der Proteinstabilität Stickstoffquellen und/oder Energie einzusparen, um so das Überleben der Limitierungssituation zu erreichen. Da die Adaptationsmechanismen sich hier deutlich von denen des Stickstoffhungers unterschieden, kann das hier charakterisierte Stickstofflimitierungs-Stimulon als separate Einheit eingestuft werden.

Eine zelluläre Antwort auf die Stickstofflimitierung konnte in dieser Arbeit erstmals auch auf Proteomebene verifiziert werden (Abb. 3.10, Tab. 3.7-3.8). Dies war bis dato bei der globalen Analyse von Stickstoffhunger über konventionelle Coomassie-Färbung nicht möglich (Kap. 4.2). Auch sensitivere Methoden wie die *pulse chase*-Markierung mit [³⁵S]-Methionin lieferten nur marginale Unterschiede in den Proteomprofilen (Schmidt *et al.*, 2000; Nolden *et al.*, 2001b; Bendt, 2002). Wie bereits in Kap. 4.1 bereits diskutiert ist die 2-D-PAGE für Membranproteine aus *C. glutamicum* auf Grund der pH-gebundenen Auftrennung in der ersten Dimension ungeeignet. Daher konnte ein großer Teil des AmtR-Regulons, die 17 Transportproteine, nicht analysiert werden. Zwischen Proteomprofilen der cytoplasmatischen Proteinfraction unlimitierter und stickstofflimitierter Zellen konnten im Rahmen dieses Projektes erstmals deutliche Unterschiede detektiert werden. Von den 15 cytoplasmatischen Komponenten des AmtR-Regulons, für die auf Transkriptomebene ein Nachweis der Induktion gelang, konnten 67 % auf 2-D-Gelen nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Urease- β -Untereinheit, der Ni²⁺-bindenden GTPase UreG, des Urease-akzessorischen Proteins UreD, der Creatinindeaminase, der Ornithincyclodecarboxylase und des zentralen Signaltransduktionsproteins GlnK aus 2-D-Gelen gelang hier erstmalig. Die verstärkte Synthese weiterer Proteine in der Limitierungssituation verifiziert die Transkriptomanalyse. Neben der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und der Tetrahydrodipicolinat-N-succinyltransferase gehörten zwei hypothetische Proteine (NCgl2450, NCgl2451) zu den markantesten Unterschieden auf Proteomebene. Mit der Verminderung der 2-Isopropylmalat-synthase und der Glutamat-N-Acetyltransferase konnte auch die gegensätzliche Regulation auf beiden Ebenen nachvollzogen werden.

Einen interessanten Aspekt lieferte der Nachweis von posttranslationalen Modifikationen. Dieser gelang sowohl für das GlnK-Protein, als auch für die Glutaminsynthetase (GS) über MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Für stickstoffgehungerte Zellen konnten Strösler *et al.* (2004) die vollständige Adenylylierung von GlnK zeigen. Das hier untersuchte Proteom stickstofflimitierter Zellen enthielt dagegen neben adenylyliertem auch deadenylyliertes GlnK. Vermutlich resultiert dieser duale Zustand aus der limitierten, aber vorhandenen Verfügbarkeit von NH₄⁺ im Medium. Die Deadenylylierung der GS, wie sie auch von Jakoby *et al.* (1997; 1999) gezeigt wurde, war unter Stickstofflimitierung fast vollständig.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalysen konnten durch die Proteomanalyse nicht nur verifiziert, sondern auch um entscheidende Punkte ergänzt werden. Proteine des C-Metabolismus und der Aminosäurebiosynthese waren starken Änderungen unterworfen, die nicht

auf eine Regulation der zugehörigen Gene zurückzuführen war. Die Intensität der Transaldolase, der Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase, und der Citratsynthase PrpC1 verstärkte sich auf 2-D-Gelen limitierter Zellen. Im Gegensatz dazu verminderte sich die Proteinkonzentration der Pyruvatkinase. Die Decarboxylase-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase und die L-2,3-Butandioldehydrogenase waren bei beiden Stickstoffversorgungszuständen vorhanden und dem zur Folge bisher nicht identifizierten posttranslationalen Modifikationen unterworfen. Viele Proteine, deren Synthesewege ebenfalls nicht auf Transkriptionsebene reprimiert vorlagen, zeigten eine limitierungsabhängige Intensitätsabnahme auf 2-D-Gelen. Dazu zählen die Ketolsäurereductoisomerase, die Sulfatadenylattransferase-Untereinheit II, die α -Untereinheit der RNA-Polymerase, der Elongationsfaktor Tu und sechs ribosomale Proteine.

Der Vergleich der beiden Limitierungszustände miteinander lieferte auf Transkriptomebene neue Erkenntnisse, welche sich jedoch nicht auf Proteomebene widerspiegeln (Abb. 3.11). Auf Proteomebene konnte zusätzlich das Proteomprofil der mit einer Wachstumsrate von $\mu_3 = 0,3$ 1/h kultivierten Zellen analysiert werden. Interessanterweise unterschied sich die Synthese der beiden hypothetischen Proteine NCgl2450 und NCgl2451 (Abb. 3.11). Offensichtlich ist die starke Präsenz beider Proteine nur bei geringen Wachstumsraten relevant. Bei höherer Wachstumsrate verzichtet die Zelle auf ihre Synthese. Die Aufklärung der Funktion dieser Proteine wäre interessant.

Die deutlichen Unterschiede in der zellulären Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoffhunger bzw. -limitierung beruhen auf physiologischen Aspekten, welche sich aus der Art der jeweiligen Kultivierung ergeben. Abrupter Stickstoffentzug im Schüttelkolben ist für den Mikroorganismus gleichzusetzen mit einem Schockzustand. In der exponentiellen Wachstumsphase wird die Konzentration der Stickstoffquelle Ammonium plötzlich von über 200 auf 0 mM reduziert. Der Zelle stehen dann nur noch intern akkumulierte L-Glutamat- und L-Glutaminpools als Reserve zur Verfügung, bereits nach einer Verdopplung wurde die Zellteilung eingestellt. Dieser Schockzustand konnte zusätzlich durch die Einschränkung der Proteinsynthesekapazität auf Transkriptomebene und durch die fehlende Adaptation auf Proteomebene gezeigt werden. Der Ersatz des abrupten Stickstoffentzuges durch stetige Zudosierung der Stickstoffquelle auf niedrigem, limitierendem Level erlaubte in der kontinuierlichen Fermentation eine wirkliche Anpassung der Zellen an die Mangelsituation. Physiologisch unterlagen sie zwar einer Nahrungslimitierung, die Art der Kultivierung gewährleistete jedoch eine kontinuierliche Zellteilung bei niedriger Wachstumsrate. Dadurch machte die Stickstofflimitierung eine bedeutende Verbesserung der Sensitivität möglich und die spezifische Anpassung konnte durch Änderungen sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene detektiert werden.

4.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien

Die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht einen Einblick in Netzwerke von Proteinen, die über ihre Interaktion miteinander das Leben der Zelle gewährleisten. Die bis dato entwickelten Methoden ermöglichen sowohl einen punktuellen, als auch einen globalen Eindruck eines solchen Netzwerkes. Zwei Methoden, mit denen man unbekannte Interaktionspartner identifizieren kann, sind die *Pull-down*- und die *Tandem Affinity Purification*- (TAP-) Methode. Sie waren Bestandteil der Interaktionsstudien in der vorliegenden Arbeit. Hierbei steht das Netzwerk um das zentrale Signaltransduktionsprotein der Stickstoffkontrolle, das GlnK-Protein, im Fokus der Analysen. Seine Funktion in der Stickstoffkontrolle ist zwar gut untersucht (Nolden *et al.*, 2001b; Strösser *et al.*, 2004), über mögliche Verknüpfungen zu anderen Regulationsnetzwerken ist aber wenig bekannt. Erste Hinweise auf solche Verknüpfungspunkte lieferten die in den vorangegangenen Kapiteln diskutierte globale Analyse von Stickstoffhunger und Stickstofflimitierung.

Die TAP-Methode ermöglicht über zwei aufeinanderfolgende Schritte die Affinitätsreinigung eines Proteinkomplexes. Über die plasmidcodierten Fusionsproteine GlnK-TAP, AmtR-TAP und Enolase-TAP sollte direkt aus der Zelle die Isolation der zugehörigen Interaktionspartner möglich sein. In allen Tandem-Reinigungen konnten die zwei Proteine Fructosebisphosphat-aldolase und Enolase identifiziert werden (Abb. 3.12, Tab. 3.10). Dies deutete darauf hin, dass es sich um falsch-positive Interaktionspartner handelt. Vermutlich binden sie an das Säulenmaterial oder an den TAP-*tag* selbst. Beide Proteine waren auch bei der Isolation von GlnK-Protein aus stickstoffgehungerten Zellen über *Magnetic Beads* aufgefallen (J. Strösser, persönliche Mitteilung). In keinem Fall war der Nachweis des Fusionsproteins selbst in der Elutionsfraktion möglich. Die Isolation eines einzelnen Proteins konnte aus stickstoffgehungerten Zellen mit GlnK-TAP erreicht werden. Vom Molekulargewicht ausgehend könnte es sich dabei um GlnK handeln, die Proteinmenge reichte jedoch für eine signifikante Identifizierung nicht aus. Obwohl die TAP-Methode für viele Organismen erfolgreich anwendbar ist (Gavin *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004; Polanowska *et al.*, 2004), ist sie in der vorgestellten Weise nicht für *C. glutamicum* geeignet. Die Ursachen hierfür sind einerseits in der ineffektiven Proteinsynthese vom plasmidcodierten Gen zu suchen und andererseits vermutlich in der Konstruktion des TAP-*tags* selbst. Für den weiteren Einsatz dieser Methode ist zunächst die detaillierte Überarbeitung des TAP-*tags* für die Anwendung in *C. glutamicum* notwendig. Die TAP-Methode ist auf ihre Verwendung in *S. cerevisiae* optimiert. Denkbar wäre also die Existenz von Codons, welche in *C. glutamicum* sehr selten sind. Für den Fall, dass sich diese Vermutung bestätigt, müsste ein Austausch dieser Codons vorgenommen werden. Im Anschluss daran empfiehlt sich in Zukunft die Synthese der Fusionsproteine vom Chromosom, d.h. vom nativen Promotor des Zielproteins.

Bei der *Pull Down*-Methode handelt es sich ebenfalls um eine globale Methode. Heterolog in *E. coli* synthetisiertes, unmodifiziertes GlnK war zur Interaktion mit acht Proteinen in der Lage (Abb. 3.13, Tab. 3.11), welche aus dem vorläufigen Modell in Abb. 4.1 ersichtlich sind.

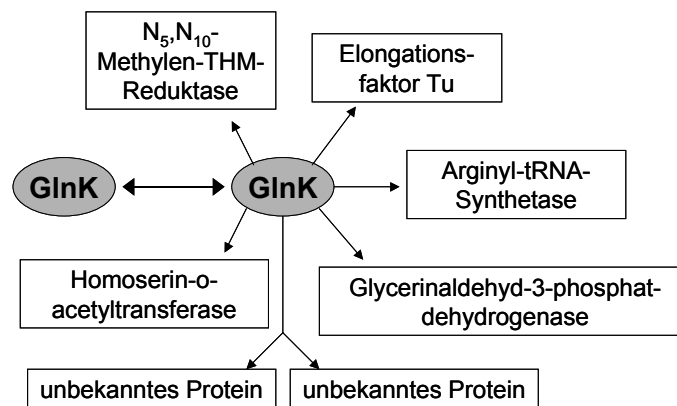


Abbildung 4.1: Vorläufiges Modell der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen von deadenyliertem GlnK-Protein. Abkürzungen: THM = Tetrahydromethanopterin

Stark an das Zielprotein gebunden lag GlnK selbst vor, eine Trimerbildung zeigte sich entsprechend der Daten von Strösser *et al.* (2004). Weitere sieben Proteine waren Bestandteil des innerhalb dieses Projektes untersuchten „Interaktoms“ um deadenyliertes GlnK. Die Auffindung der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase bestätigte Daten aus der Isolation von deadenyliertem GlnK aus *C. glutamicum* mit Hilfe von *Magnetic Beads* (J. Strösser, persönliche Mitteilung). Das bei der globalen Analyse der Stickstofflimitierung aufgefallene Arginin-Gencluster scheint auf unbekannte Weise tatsächlich mit der Stickstoffkontrolle verknüpft zu sein. Die Arginyl-tRNA-Synthetase konnte als einer von acht GlnK-Interaktionspartnern identifiziert werden. Das in Abb. 4.1 dargestellte Interaktom bedarf weiterer Absicherung und sollte als vorläufige Rohversion betrachtet werden. Die Verifikation der Daten durch unabhängige Wiederholung des biologischen Experimentes reicht im Rahmen von Interaktionsstudien in der Regel nicht aus. Eine Bestätigung der hier erhaltenen Daten könnte durch „reziproke“ *Pull-Down*-Experimente erzielt werden, d.h. die identifizierten Interaktionspartner dienen als *getaggte* Zielproteine selbst zur Verifikation der Protein-Protein-Interaktion. Die ergänzende Analyse des Interaktoms von adenyliertem GlnK-Protein setzt eine effiziente Überexpression von GlnK-His in *C. glutamicum* voraus, welche im Rahmen dieses Projektes nicht gelang. Daher empfiehlt sich in Zukunft die Kombination mit einem Strep-tag.

5 Zusammenfassung

Der Schwerpunkt der hier vorgestellten Arbeit lag auf der globalen Analyse der zellulären Antwort von *C. glutamicum* einerseits auf abrupten Stickstoffhunger und andererseits auf dauerhafte Stickstofflimitierung. Hierzu wurden zwei globale Ansätze, die Transkriptomanalyse über DNA-Microarrays und die Proteomanalyse über 2-D-PAGE, miteinander kombiniert.

In Ergänzung zum bereits bekannten AmtR-Regulon konnte das Stickstoffhunger-Stimulon charakterisiert werden. Drei bedeutende Adaptationsmechanismen stellten sich auf Transkriptomebene als die Kernkomponenten der Antwort auf Stickstoffhunger heraus. Erstens passte *C. glutamicum* seine Transportkapazität den neuen Umweltbedingungen an, in dem es die Transkription von Genen verschiedener Transportproteine regulierte. Insbesondere Gene der Transporter alternativer Stickstoffquellen wie Ammonium, Harnstoff, Glutamat und Creatinin waren von der Regulation betroffen. Zweitens wurde die Reorganisation metabolischer Stoffwechselwege auf Expressionsebene nachgewiesen. Ziel dieser Anpassung war offensichtlich, die Möglichkeiten zur Assimilation der alternativen Stickstoffquellen zu schaffen. Als dritter Adaptationsweg wurde die Einschränkung der Proteinsynthesekapazität identifiziert. Auf Expressionsebene reduzierte die stickstoffgehungerte Zelle viele Komponenten ihres Proteinsyntheseapparates. Weiterhin weist die Repression vieler energiebedürftiger, nicht essentieller Reaktionen auf die Umstellung in eine Art Energiespar-Modus hin. Das geschilderte Stimulon konnte auf Proteomebene nicht verifiziert werden. Im Muster cytoplasmatischer Proteinfractionen zeigten sich nur marginale Unterschiede, die nicht auf einen Energiespar-Modus, sondern auf einen *Steady-State*-Zustand hindeuten. Die Auftrennung hydrophober Proteine gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht. Ursache hierfür war die Ausbildung signifikanter pI-Shifts in Folge der Bindung saurer Phospholipide an Membranproteine, welche pH-abhängige Methoden unbrauchbar machen.

Die Etablierung eines kontinuierlichen Fermentationssystems ermöglichte die Realisierung einer dauerhaften Stickstofflimitierung. Da signifikante Unterschiede zum Stickstoffhunger-Stimulon gezeigt werden konnten, war die zusätzliche Beschreibung des Stickstofflimitierungs-Stimulons für *C. glutamicum* erforderlich. Auf Expressionsebene folgte die umfangreiche Anpassung der Transportkapazität und die Reorganisation der korrespondierenden metabolischen Stoffwechselwege zwar einem ähnlichen Prinzip, war jedoch sehr viel gerichteter als unter Stickstoffhunger. Der Aufnahme und Metabolisierung alternativer Stickstoffquellen kam hier eine äquivalente und sehr entscheidende Bedeutung zu. Ergänzend wurden energieabhängige, aktuell irrelevante Prozesse reduziert und gleichzeitig die Möglichkeiten zur Energiegeneration durch Induktion der Gene der Glucoseaufnahme,

der Glycolyse und der Atmungskette erweitert. Im Gegensatz zu stickstoffgehungerten regulierten stickstofflimitierte *C. glutamicum*-Zellen zu Gunsten der Proteinstabilität und vermieden so unnötigen Stickstoffverbrauch. Durch die Kombination globaler Analysetechniken mit der kontinuierlichen Prozessführung gelang erstmals der Nachweis von signifikanten Änderungen im Proteommuster von Zellen, welche einer Stickstoffmangelsituation unterworfen waren. Fast 70 % der auch auf Expressionsebene regulierten, cytoplasmatischen Komponenten des AmtR-Regulons konnten mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie aus 2-D-Gelen identifiziert werden. Die detektierten Unterschiede dienten nicht nur der Verifikation der vorgenommenen Transkriptomanalyse, sondern auch ihrer Ergänzung, da in mehreren Fällen der Nachweis einer zusätzlichen Regulation auf Aktivitätsebene gelang.

Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellte die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen dar. Die *Tandem Affinity Purification*-Methode konnte aus noch unbekanntem Gründen nicht für *C. glutamicum* etabliert werden. Dagegen lieferte die *Pull-Down*-Methode für deadenyliertes GlnK Hinweise auf insgesamt acht Interaktionspartner. Neben der Ausbildung von Homotrimeren deuteten diese Interaktionspartner auf Verknüpfungen zu den Biosynthesewegen von Methionin und Arginin, zur Glycolyse, zur Proteinsynthese und zum Methanopterinstoffwechsel hin.

6 Literaturverzeichnis

- Abe S, Takayama K, Kinoshita S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Microbiol* **13**: 279-301
- Anderlei T, Büchs J. (1999). Verfahren und Vorrichtung zur Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen. European Patent Office, European Patent No. 0905229A2
- Anderlei T, Büchs J. (2001). Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J* **7**: 157-163
- Arcondéguy T, Jack R, Merrick M. (2001). P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 80-105
- Beckers G, Nolden L, Burkovski A. (2001). Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology* **147**: 2961-70.
- Beckers G. (2004). AmtR – ein globaler Repressor der Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Beckers G, Bendt AK, Krämer R, Burkovski A. (2004). Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter- and urease-encoding genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, IN PRESS
- Bendt AK. (2002). Globale Analyse von Stickstoff-Metabolismus und Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Bendt A, Beckers G, Silberbach M, Wittmann A, Burkovski A. (2004). Utilization of creatinine as an alternative nitrogen source in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **181**: 443-450
- Blum M, Beier H, Gross HJ. (1987). Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Bott M, Niebisch A (2003). The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 129-153
- Burkovski A. (2003a). Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *FEMS Microbiol Reviews* **27**: 617-628
- Burkovski A. (2003b). I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **179**: 83-88
- Burkovski A. (2004). Nitrogen assimilation and its regulation. In: Bott M, Eggeling L (Editoren). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, IN PRESS
- Coutts G, Thomas G, Blakey D, Merrick M. (2002). Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* **21**: 536-45.

- Dominguez H, Rollin C, Guyonvarch A, Guerquin-Kern J-L, Cocaïgn-Bousquet M, Lindley ND. (1998). Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem* **254**: 96-102
- Dondrup M, Goesmann A, Bartels D, Kalinowski J, Krause L, Linke B, Rupp O, Sczyrba A, Pühler A, Meyer F. (2003). EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J Biotechnol* **106**: 135-146
- Eggeling L, Sahm H. (2001a). The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J Bioscience Bioeng* **92**: 201-213
- Eggeling L, Pfefferle W, Sahm H. (2001b). Amino Acids. In: Ratledge C, Kristiansen B (Editoren). *Basic Biotechnology*, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, S. 281-303
- Fisher SH. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol Microbiol* **32**: 223-232
- Gavin A-C, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon A-M, Cruciat C-M, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier M-A, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147
- Gerstmeir R, Wendisch VF, Schnicke S, Ruan H, Farwick M, Reinscheid D, Eikmanns BJ. (2003). Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 99-122
- 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* **186**: 2798-2809
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**: 1037-1053.
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad USA* **87**: 4645-4649
- Guillouet S, Engasser JM. (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
- Guillouet S, Engasser JM. (1996). Growth of *Corynebacterium glutamicum* in ammonium- and potassium-limited continuous cultures under high osmotic pressure. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 291-296
- Hayashi M, Mizoguchi H, Shiraishi N, Obayashi M, Nakagawa S, Imai J, Watanabe S, Ota T, Ikeda M. (2002). Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 1337-44.

- Herbert BR, Molloy MP, Walsh BJ, Gooley AA, Bryson WG, Williams KL. (1998). Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* **19**: 845-851
- Hermann T, Wersch G, Uhlemann E-M, Schmid R, Burkovski A. (1998). Mapping and identification of *Corynebacterium glutamicum* proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* **19**: 3217-3221
- Hermann T, Finkemeier M, Pfefferle W, Wersch G, Krämer R, Burkovski A. (2000). Two-dimensional electrophoretic analysis of *Corynebacterium glutamicum* membrane fraction and surface proteins. *Electrophoresis* **21**: 654-659
- Hermann T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**: 155-172
- Hüser AT, Becker A, Brune I, Dondrup M, Kalinowski J, Plassmeier J, Puehler A, Wiegräbe I, Tauch A. (2003). Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J Biotechnol* **106**: 269-286
- Ikeda TP, Shauger AE, Kustu S. (1996). *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. *J Mol Biol* **259**: 589-607
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Ishige T, Krause M, Bott M, Wendisch VF, Sahm H. (2003). The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol* **185**: 4519-4529.
- Jakoby M, Tesch M, Sahm H, Krämer R, Burkovski A. (1997). Isolation of the *Corynebacterium glutamicum glnA* gene encoding glutamine synthetase I. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 81-88
- Jakoby M, Ngoutou-Nkili C-E, Burkovski A. (1999a). Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol Techniques* **13**: 437-441
- Jakoby M, Krämer R, Burkovski A. (1999b). Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **173**: 303-310
- Jakoby M, Nolden L, Meier-Wagner J, Krämer R, Burkovski A. (2000). AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **37**: 964-977
- Javelle A, Severi E, Thornton J, Merrick M. (2004). Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. *J Biol Chem* **279**: 8530-8
- Kase H, Nakayama K. (1972). Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric Biol Chem* **36**: 1611-1621.

- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey Da, Rückert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegräbe I, Tauch A. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**: 5-25
- Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**: 5595-5603.
- Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, Wittmann C. (2004). Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* **70**: 229-239
- Kinoshita S, Ukada S, Shimono M. (1957). Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**: 193-205
- Krämer R, Lambert C. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur J Biochem* **194**: 937-944
- Krömer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C. (2004). In-depth profiling of Lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome and fluxome. *J Bacteriol* **186**: 1769-1784
- Kronemeyer W, Peekhaus N, Krämer R, Eggeling L, Sahm H (1995). Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**: 1152-1158
- Kumar JK, Tabor S, Richardson CC. (2004). Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *PNAS* **101**: 3759-3764
- Lange C, Rittmann D, Wendisch VF, Bott M, Sahm H. (2003). Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2521-32.
- Lee H-W, Pan J-G, Lebeault J-M. (1998). Enhanced L-lysine production in threonine-limited continuous culture of *Corynebacterium glutamicum* by using gluconate as a secondary carbon source with glucose. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 9-15
- Leuchtenberger W. (1996). Amino acids – technical production and use. In: Rehm H, Reed G. (Editoren). *Products of primary metabolism. Biotechnology, Volume 6*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, D. S. 465-502
- Liebl W, Bayerl A, Schein B, Stillner U, Schleifer KH. (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett* **53**: 299-303
- Merrick MJ, Edwards RA. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**: 604-622
- Morbach S, Krämer R. (2003). Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 69-95
- Muffler A, Bettermann S, Haushalter M, Horlein A, Neveling U, Schramm M, Sorgenfrei O. (2002). Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J Biotechnol* **98**: 255-268

- Niebisch A, Bott M. (2003). Purification of a cytochrome bc₁-aa₃ supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **278**: 4339-4346
- Nolden L, Beckers G, Möckel B, Pfefferle W, Nampoothiri KM, Krämer R, Burkovski A. (2000). Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organisation of corresponding genes and investigation of activity. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 305-310
- Nolden L. (2001). Mechanismen der Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Nolden L, Farwick M, Krämer R, Burkovski A. (2001a). Glutamine synthetases of *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 91-98
- Nolden L, Ngoutou-Nkili C-E, Bendt AK, Krämer R, Burkovski A. (2001b). Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: the role of *glnK* and *glnD*. *Mol Microbiol* **42**: 1281-1295
- Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, Ando S, Yokoi H, Ochiai K, Ikeda M. (2002). A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-Lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 217 - 223
- Polanowska J, Martin JS, Fisher R, Scopa T. (2004). Tandem immunoaffinity purification of protein complexes from *Caenorhabditis elegans*. *BioTechniques* **36**: 778-784
- Reitzer L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **57**: 155-176
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Sassi AH, Deschamps AM, Lebeault JM. (1996). Process analysis of L-lysine fermentation with *Corynebacterium glutamicum* under different oxygen and carbon dioxide supplies and redox potentials. *Process Biochem* **31**: 493-497
- Schägger H, von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379
- Schaffer S, Weil B, NguyenVD, Dongmann G, Günther K, Nickolaus M, Hermann T, Bott M. (2001). A high-resolution reference map for cytoplasmatic and membrane proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 4404-4422
- Schaffner W, Weissmann C. (1973). A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* **52**: 502-514
- Schmid R, Uhleman E-M, Nolden L, Wersch G, Hecker R, Hermann T, Marx A, Burkovski A. (2000). Response to nitrogen starvation in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **187**: 83-88
- Schmitz RA. (2000). Internal glutamine and glutamate pools in *Klebsiella pneumoniae* grown under different conditions of nitrogen availability. *Curr Microbiol* **41**: 357-362
- Schreiner M, Eikmanns BJ. Pyruvate:Quinone Oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*: Purification and biochemical characterization. *J Bacteriol*, 2004 zur Publikation eingereicht

- Schrumpf B, Schwarzer A, Kalinowski J, Pühler A, Eggeling L, Sahm H. (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *J Bacteriol* **173**: 4510-4516
- Schulz AA, Collett HJ, Reid SJ. (2001). Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 361-367
- Siewe RM, Weil B, Krämer R (1995). Glutamine uptake by a sodium dependent secondary transport system in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **164**: 98-103
- Sonntag K, Eggeling L, de Graaf AA, Sahm H. (1993). Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Eur J Biochem* **123**: 1325-1331
- Strösser J, Lüdke A, Schaffer S, Krämer R, Burkovski A. (2004). Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **54**: 132 -147
- Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. (2002a). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**: 362-367
- Tauch A, Homann I, Mormann S, Rüberg S, Billault A, Bathe B, Brand S, Brockmann-Gretza O, Rückert C, Hoheisel J, Möckel B, Huthmacher K, Pfefferle W, Pühler A, Kalinowski J. (2002b). Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J Biotechnol* **95**: 25-38
- Tesch M, De Graaf AA, Sahm H (1999). In vivo fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by ¹⁵N nuclear magnetic resonance. *Appl Env Microbiol* **65**: 1099-1109
- Uy D, Delaunay S, Germain P, Engasser J-M, Goergen J-L. (2003). Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J Biotechnol* **104**: 173-184
- Wehrmann A, Phillip B, Sahm H, Eggeling L. (1998). Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: a study with *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **180**: 3159-3165.
- Wendisch VF, de Graaf AA, Sahm H, Eikmanns BJ. (2000). Quantitative determination of metabolic fluxes during co-utilization of two carbon sources: comparative analysis with *Corynebacterium glutamicum* during acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**: 3088-3096
- Wohlleben W, Muth G, Kalinowski J. (1993). Genetic engineering of gram-positive bacteria. In: Pühler A. (Editor). Genetic engineering of microorganisms. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, D. S. 106f
- Wolf A, Krämer R, Morbach S. (2003). Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **49**: 1119-1134
- Zhu H, Bilgin M, Snyder M. (2003). Proteomics. *Annu Rev Biochem* **72**: 783-812
- Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, Bender RA, Kustu S. (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14044-14045

7 Anhang

7.1 Plasmidkonstruktionen

Im Folgenden sind die Konstruktionen der in Tabelle 2.1 aufgelisteten Plasmide aufgeführt.

pDRIVEamtR: Mit den Primern 5'- TG CCT GCA GGT ATG GCA GGA GCA GTG GG-3' und 5'- GA CCT GCA GGT TTT CGC GTC AGC CTG CTT G-3' wurde das *amtR*-Gen über PCR mit einer *taq*-Polymerase amplifiziert und direkt in den pDRIVE-Vektor (Qiagen, Hilden, D) kloniert.

pDRIVEglnK: Mit den Primern 5'-CC TGC AGG ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT G-3' und 5'-CC TGC AGG TAA GGG CTG CTT CGC CGC-3' wurde das *glnK*-Gen über PCR mit einer *taq*-Polymerase amplifiziert und direkt in den pDRIVE-Vektor (Qiagen) kloniert.

pDRIVEeno: Mit den Primern 5'-TGC CTG CAG GTG GCT GAA ATC ATG CAC G-3' und 5'-GT CCT GCA GGT GCC CTG AAA GCG TGG GAA-3' wurde das *eno*-Gen über PCR mit einer *taq*-Polymerase amplifiziert und direkt in den pDRIVE-Vektor (Qiagen) kloniert.

pQEglnK: Mit den Primern 5'-G CGC ATG CAT GAA ACT CAT CAC CGC AAT-3' und 5'-G CGC AGA TCT TGC TGC TTC GCC GCG CTC-3' wurde über PCR das *glnK*-Gen amplifiziert, mit *BglII/SphI* behandelt und in *BglII/SphI*-geschnittenen, dephosphorylierten pQE70-Vektor (Qiagen) kloniert. Die Basensequenz des Genes *glnK-His* wurde vollständig mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung mit den Primern 5'-CCC GAA AAG TGC CAC CTG-3' und 5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3' überprüft.

pXMJ19TAP: Der Vektor pBS1479 (Cellzome, Heidelberg, D) wurde mit *XbaI* geschnitten und die überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment (NEB, Frankfurt a.M., D) aufgefüllt. Anschließend wurde das lineare Plasmid mit *XmaI* behandelt und das über Agarosegelelektrophorese getrennte, gereinigte 0,6 kb-Fragment in den *NcoI/XmaI*-geschnittenen pXMJ19-Vektor kloniert.

pXMJ19amtRTAP: Der Vektor pDRIVEamtR wurde mit *SdaI* behandelt und das über Agarosegelelektrophorese getrennte, gereinigte 0,67 kb-Fragment in *SdaI*-geschnittenen, dephosphorylierten pXMJ19-TAP-Vektor kloniert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde an Hand eines Kontrollverdaus mit *KpnI/AflI* nachgewiesen.

Die Basensequenz des Genes *amtRTAP* wurde vollständig mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung mit den Primern 5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3' und 5'-TTG TTG TCC ACG GCT TCA TC-3' und 5'-CCA AGC TGA ATT CGA GCT GC-3' überprüft.

pXMJ19glnKTAP: Der Vektor pDRIVEglnK wurde mit *Sdal* behandelt und das über Agarosegelelektrophorese getrennte, gereinigte 0,35 kb-Fragment in *Sdal*-geschnittenen, dephosphorylierten pXMJ19-TAP-Vektor kloniert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde durch einen Kontrollverdau mit *NheI/XhoI* nachgewiesen. Die Basensequenz des Genes *glnKTAP* wurde vollständig mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung mit den Primern 5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3' und 5'-TCG TGT TCG TAC CGG TGA G-3' und 5'-CCA AGC TGA ATT CGA GCT GC-3' überprüft.

pXMJ19enoTAP: Der Vektor pDRIVEeno wurde mit *Sdal* behandelt und das über Agarosegelelektrophorese getrennte, gereinigte 1,3 kb-Fragment in *Sdal*-geschnittenen, dephosphorylierten pXMJ19-TAP-Vektor kloniert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde durch einen Kontrollverdau mit *NheI/PvuI* nachgewiesen. Die Basensequenz des Genes *enoTAP* wurde vollständig mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung mit den Primern 5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3', 5'-ACG CAC ACG TTC TTC CAG TT-3', 5'-AAG GAC GGC ACC TAC CAC TT-3', 5'-AAC TGT GGC CAG ATC AAG AC-3' und 5'-CCA AGC TGA ATT CGA GCT GC-3' überprüft.

7.2 Stammkonstruktionen

Im Folgenden sind die Konstruktionen der in Tabelle 2.2 aufgelisteten Stämme aufgeführt.

***E. coli* pQEglnK:** Dieser DH5 α -Stamm wurde durch Transformation mit dem Plasmid pQEglnK hergestellt und anschließend durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

***C. glutamicum* pXMJ19amtRTAP:** Dieser RES 167-Stamm wurde durch Elektroporation mit dem Plasmid pXMJ19amtRTAP hergestellt und durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

***C. glutamicum* pXMJ19glnKTAP:** Dieser RES 167-Stamm wurde durch Elektroporation mit dem Plasmid pXMJ19glnKTAP hergestellt und durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

***C. glutamicum* pXMJ19enoTAP:** Dieser RES 167-Stamm wurde durch Elektroporation mit dem Plasmid pXMJ19enoTAP hergestellt und durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

7.3 Transkriptomanalysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten DNA-Microarrays zur Analyse von Stickstoffhunger (Kap. 3.2.2) und von Stickstofflimitierung (Kap. 3.3.1) lieferten zusammen eine Gesamtheit von 554 regulierten Genen. Die separate Nennung mit spezifischem Regulationsfaktor und zugehöriger Annotation wurde aus praktischen Gründen vermieden. Aus Tab. 7.1 sind diese Daten für jedes einzelne der regulierten Gene ersichtlich. Die Gene sind nach aufsteigender NCgl-Nummer, d. h. nach Eintragung in die NCBI-Genomdatenbank NC_003450 für *C. glutamicum* ATCC13032, geordnet.

Tabelle 7.1: Vollständige Auflistung der im Rahmen der Transkriptomanalyse von stickstoffgehungenen und -limitierten *C. glutamicum*-Zellen regulierten Gene. Die Zuordnung erfolgte an Hand der NCBI-Datenbank (NCgl-Nr. und Annotation), falls vorhanden ist der Gennamen angegeben. Gezeigt sind die ermittelten Faktoren für Expressionsänderungen auf RNA-Ebene der Vergleiche **(A)** Stickstoffüberschuss mit Stickstofflimitierung im Fermenter bei niedriger Durchflussrate [b vs. D_{kl}] **(B)** Stickstoffüberschuss mit Stickstofflimitierung im Fermenter bei hoher Durchflussrate [b vs. D_{gr}], **(C)** beider Durchflussraten im Fermenter [D_{kl} vs. D_{gr}] und **(D)** Stickstoffüberschuss gegen Stickstoffhunger im Schüttelkolben (+N vs. oN). Jeder Vergleich basiert auf der Durchführung von zwei biologischen Replikaten. Ein Gen galt als signifikant reguliert, wenn der Faktor $\geq 1,74$ bzw. $\leq 0,57$ war. Abkürzungen und Indices: ^a = Annotation nach Kalinowski *et al.* (2003), abh. = abhängig, ähnl. = ähnlich, ^b = Annotation nach Beckers *et al.* (2004), ^c = Annotation nach Bendt *et al.* (2004), b = *batch*, ^d = Annotation nach Prof. Dr. B. Eickmanns (persönliche Mitteilung), D = Durchflussrate, DH = Dehydrogenase, dupl. = dupliziert, Glc = Glucose, gr = groß, kl = klein, periplasm. = periplasmatisch, PTS = Phosphotransferasesystem, put. = putativ, RR = *response regulator*, SHK = Sensorhistidinkinase, spez. = spezifisch, UE = Untereinheit, uncharakt. = uncharakterisiert, verw. = verwandt

NCgl-Nr.	Genname	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
0032		0,49	0,45			hypothetisches Protein
0033	<i>ppiA</i>				0,48	Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase
0034					0,43	uncharakterisiertes Membranprotein
0057			2,85			hypothetisches Protein
0058			2,10			hypothetisches Membranprotein
0059		2,03	1,84			hypothetisches Protein
0074	<i>crnT</i> ^c	76,32	44,35	2,25	9,71	Creatininpermease
0075	<i>codA</i> ^c	8,86	11,17	2,28	9,67	Creatinindeaminase
0077				0,55		hypothetisches Protein
0083	<i>ureA</i>	8,74	9,57		7,67	Harnstoffamidohydrolase (Urease) γ -UE
0084	<i>ureB</i>		2,10			Urease β -UE
0085	<i>ureC</i>	5,15	5,71		6,83	Harnstoffamidohydrolase (Urease) α -UE
0086	<i>ureE</i>	8,06	10,35		5,22	Urease-akzessorisches Protein UreE
0087	<i>ureF</i>	6,43	9,72		5,69	Urease-akzessorisches Protein UreF
0088	<i>ureG</i>	6,88	8,07		7,62	Ni ²⁺ -bindende GTPase
0089	<i>ureD</i>	5,47	5,85		4,32	Urease-akzessorisches Protein UreD
0090					2,46	put. Hydrolase oder Acyltransferase
0094	<i>amn</i> ^a	0,49	0,57			Nucleosidphosphorylase

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
0097			2,24			hypothetisches Protein
0098	<i>putA</i>		0,36			Prolin-DH
0100					0,52	put. p-Aminobenzoylglutamattransporter
0114		1,91	1,76			hypothetisches Protein
0138			0,54	0,45		hypothetisches Protein
0148		1,80				hypothetisches Protein
0171	<i>cspA</i>				0,44	Kälteschockprotein CspA
0172					0,45	hypothetisches Membranprotein
0173				0,39		Transkriptionsregulator
0174					2,63	SAM-anhängige Methyltransferase
0176					0,29	Transkriptionsregulator
0178					0,55	Permease, <i>Major facilitator</i> Superfamilie
0181	<i>gltB</i>	10,42	16,53		9,87	Glutamin-2-oxoglutarataminotransferase, große UE
0182	<i>gltD</i>	25,13	24,59		11,41	Glutamin-2-oxoglutarataminotransferase, kleine UE
0188				0,52		hypothetisches Protein
0206	<i>moaE^a</i>			0,48		Molybdopterinbiosynthese, große UE
0207	<i>moaB^a</i>			0,55		Molybdenkofaktorbiosyntheseenzym
0208	<i>moaC^a</i>			0,52		Molybdopterinbiosyntheseenzym
0226		0,27	0,33	2,09		hypothetisches Protein
0234		3,48				3,4-Dioxygenase, β -UE ^a
0243					1,79	UDP-N-Acetylmuramyl-tripeptidsynthase
0245	<i>leuA</i>	0,20	0,17			2-Isopropylmalatsynthase
0251	<i>katA</i>	2,85	3,89			Katalase
0256		1,87	2,58	2,00	1,83	hypothetisches Membranprotein
0263	<i>mnhD^a</i>		0,50			Formhydrogenlyase UE 3
0273					2,03	hypothetisches Protein
0274		0,54				Membrancarboxypeptidase
0275	<i>whiB4^a</i>	2,69		0,49	0,49	put. Regulationsprotein, WhiB-verwandt
0286					0,47	Transkriptionsregulator
0303	<i>cspA2</i>	0,42				Kälteschockprotein CspA2
0308		2,31		0,54	2,24	uncharakterisiertes phagenassoziiertes Protein
0312	<i>bgIS^a</i>	1,88				β -Glucosidase, C-terminale UE
0314	<i>adhE^a</i>	0,54	0,57			put. Zn-abh. Alkoholdehydrogenase
0322		1,76				5'-Nucleotidase/2',3'-zyklische Phosphodiesterase oder verw. Esterase
0328		0,34	0,46	2,21	1,80	Nitroreductase
0329		0,35	0,55	3,32		periplasm. Komponente, Fe ³⁺ -Siderophoren-ABC-transportsystem
0337	<i>wzz^a</i>	0,52				Zelloberflächenpolysaccharidbiosynthese/Kettenlängendeterminierendes Protein
0338	<i>ptpA2^a</i>				0,51	Proteintyrosinphosphatase
0341			0,50	0,54		put. Pyridoxalphosphat-abh. Enzym
0342			0,35	0,33		Zuckertransferase der Lipopolysaccharidsynthese
0344	<i>wzx^a</i>	0,42	0,49		0,54	put. Translokase, involviert in Export eines Zelloberflächenpolysaccharides

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
0351	<i>udgA1^a</i>	0,55		1,76		put. UDP-Glucose-6-DH
0354				1,83		Acetyltransferase
0356	<i>galU2</i>			1,96		UDP-Glucose-pyrophosphorylase
0358	<i>ramB^a</i>			0,28	0,55	put. Transkriptionsregulator
0359	<i>sdhCD</i>	2,57	3,05			Succinat-DH CD
0360	<i>sdhA</i>	3,20	3,15		0,54	Succinat-DH A
0361	<i>sdhB</i>	2,41	2,98			Succinat-DH B
0362		1,99	1,97			hypothetisches Membranprotein
0378					0,42	Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophorentransporter, sekretierte UE ^a
0379					0,45	Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophorentransporter, Permease-UE ^a
0380					0,48	Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophorentransporter, ATPase-UE ^a
0381					0,57	hypothetisches Membranprotein
0404		2,84				hypothetisches Protein
0427	<i>ccsB</i>	1,82	2,10			Cytochrom C Assembly Protein
0437		1,89				Ketoglutaratsemialdehyd-DH
0438		1,72			2,17	5-Dehydro-4-deoxyglucaratdehydratase
0440		0,55				put. Serinprotease (ClpP-Klasse) ^a
0444			1,93	2,41		hypothetisches Membranprotein
0445	<i>pitA^a</i>		1,82			put. niedrig-affiner Phosphattransporter
0459	<i>rplK</i>				0,54	ribosomales Protein L11
0476	<i>rpsL</i>				0,43	ribosomales Protein S12
0477	<i>rpsG</i>			1,76	0,53	ribosomales Protein S7
0486	<i>rpsJ</i>				0,40	ribosomales Protein S10
0487	<i>rplC</i>				0,39	ribosomales Protein L3
0489	<i>rplW</i>				0,48	ribosomales Protein L23
0491	<i>rpsS</i>				0,41	ribosomales Protein S19
0492	<i>rplV</i>				0,56	ribosomales Protein L22
0493	<i>rpsC</i>				0,50	ribosomales Protein S3
0494	<i>rplP</i>				0,49	ribosomales Protein L16/L10E
0495	<i>rpmC</i>				0,52	ribosomales Protein L29
0496	<i>rpsQ</i>				0,42	ribosomales Protein S17
0499	<i>rplN</i>				0,56	ribosomales Protein L14
0500	<i>rplX</i>				0,51	ribosomales Protein L24
0501	<i>rplE</i>			1,82		ribosomales Protein L5
0512					0,54	hypothetisches Membranprotein
0513					0,57	hypothetisches Protein
0515	<i>rpsH</i>			2,09	0,55	ribosomales Protein S8
0516	<i>rplF</i>			1,82		ribosomales Protein L6
0517	<i>rplR</i>				0,55	ribosomales Protein L18
0519	<i>rpmD</i>				0,46	ribosomales Protein L30/L7E
0520	<i>rplO</i>				0,39	ribosomales Protein L15
0536	<i>infA</i>				0,35	Translationsinitiationsfaktor IF-1
0537	<i>rpsM</i>				0,54	ribosomales Protein S13
0538	<i>rpsK</i>				0,45	ribosomales Protein S11
0540	<i>rpoA</i>				0,54	DNA-gerichtete RNA-Polymerase α -UE

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
0541	<i>rplQ</i>				0,47	ribosomales Protein L17
0556	<i>rplM</i>			1,89		ribosomales Protein L13
0557	<i>rpsI</i>			2,10	0,52	ribosomales Protein S9
0572	<i>groES</i>	1,93	2,45			Cochaperonin GroES
0573	<i>groEL</i>	1,77	2,05			Chaperonin GroEL
0580		0,47	0,46			put. Metabolitentransporter, DMT-Superfamilie ^a
0583				0,48		hypothetisches Protein
0584		2,12		0,32		hypothetisches Membranprotein
0598	<i>crtB2^a</i>		0,54			Phytoensynthetase
0599				0,50		put. Exporter, RND Superfamilie
0600	<i>crtE^a</i>			0,49		Geranylgeranylpyrophosphatsynthase
0602				0,46		Lipocalin
0603				0,41		put. Nucleosiddiphosphat-Zuckerepimerase
0604	<i>phr^a</i>			1,97		Deoxyribodipyrimidinphotolyase
0612			0,56			hypothetisches Protein
0618		0,43		3,45		Fe ³⁺ -Siderophoren-ABC-Transportsystem, periplasm. Komponente
0621				1,91		hypothetisches Membranprotein
0622		0,31	0,49	2,47		Flotillin-ähnliches Protein
0623				0,32		hypothetisches Protein
0624	<i>metX</i>			0,55		Homoserin-O-acetyltransferase
0626	<i>cstA^a</i>			2,88		Kohlenstoffhungerprotein
0646					0,53	Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophorentransporter, Permease-UE ^a
0648		0,56				Multi-Transmembrandomänehaltiges Protein
0661			1,77	1,99		hypothetisches Protein
0666	<i>prpC1^a</i>			0,56		(Methyl) Citratsynthase
0667				0,30	0,54	hypothetisches Protein
0668				0,51		put. Transkriptionsregulator
0670					0,50	Acyl-CoA-Carboxylase
0675					0,56	Nucleotidbindeprotein
0676					0,47	hypothetisches Protein
0677	<i>dtsR2^a</i>		0,46		0,52	Acetyl/propionyl-CoA-Carboxylase, β-UE
0678	<i>dtsR1^a</i>		0,35	0,23	0,37	Acetyl/propionyl-CoA-Carboxylase, α-UE
0687	<i>ntaA^a</i>	1,85				Nitrilotriacetatmonooxygenase
0689			0,53			DH/Oxidoreductase
0699					0,57	hypothetisches Protein
0710		0,54				Nucleosiddiphosphat-Zuckerpyrophosphorylase
0711	<i>whiB2^a</i>				0,50	Transkriptionsfaktor WhiB
0717		2,11				hypothetisches Protein
0724					1,88	hypothetisches Protein
0726	<i>secA</i>	0,55				Präproteintranslocase-UE SecA
0730	<i>aroA</i>	0,56				5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-synthase
0734	<i>whiB1^a</i>	1,75				Transkriptionsfaktor WhiB

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
0754			1,89	3,26	0,43	Pyridoxinbiosyntheseenzym
0755			1,87	3,52	0,36	put. Glutaminamidotransferase
0773		0,49		2,60		Siderophoreninteraktionsprotein
0774		0,42		2,91	2,06	Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophoren ABC-Transporter, sekretierte UE ^a
0776		0,45		2,23		Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophoren ABC-Transporter, periplasmatische UE ^a
0777		0,53				Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophoren ABC-Transporter, Permease-UE ^a
0786					0,52	Kälteschockprotein
0788		2,45	2,06			Glutamincyclotransferase
0790					1,80	Permease
0791				1,87	1,89	rRNA-Methylase
0794	<i>serC</i>				1,88	Phosphoserinaminotransferase
0798				0,45	0,23	uncharakt. Membranprotein
0799				0,50	0,31	Na ⁺ /Prolin-, Na ⁺ /Panthothenatsymporter
0800		3,01	3,44		1,80	hypothetisches Protein
0801		0,55		2,91		hypothetisches Protein
0802			0,37	0,32	0,34	Fettsäuresynthase
0817	<i>pgi</i>			1,83		Glucose-6-phosphatisomerase
0819				0,57		Chorismatmutase
0824			1,76			Metalloendopeptidase-ähnl. Membranprotein
0826	<i>purN</i>			2,14		Phosphoribosylglycinamidformyltransferase PurN
0831	<i>rpsR</i>				0,55	ribosomales Protein S18
0832	<i>rpsN</i>				0,55	ribosomales Protein S14
0833	<i>rpmG</i>				0,50	ribosomales Protein L33
0834	<i>rpmB</i>				0,45	ribosomales Protein L28
0837	<i>rpmE</i>				0,48	ribosomales Protein L31
0841				0,52	2,44	trypsin-ähnl. Serinprotease
0843	<i>mscL</i>			1,81		Mechanosensitiver Kanal MscL
0851					1,85	put. Membranprotein
0856	<i>betP</i>	0,20	0,26	2,13	0,45	Cholin-Glycinbetaintransporter
0872	<i>rpf2^a</i>	3,67	2,30	0,52		Rpf2-Precursor
0878				0,55		hypothetisches Protein
0879		2,18		0,28		hypothetisches Protein
0885	<i>cmt3^a</i>			1,77		Corynomycolyltransferase
0888	<i>menG^a</i>	2,56	2,12			Demethylmenaquinonmethyltransferase
0893	<i>urtA^b</i>	20,93	20,73		10,41	Harnstofftransporter, periplasm. UE
0894	<i>urtB^b</i>	36,73	33,01		11,65	Harnstofftransporter, Permease-UE
0895	<i>urtC^b</i>	47,71	48,79		12,31	Harnstofftransporter, Permease-UE
0896	<i>urtD^b</i>	19,61	14,19		8,11	Harnstofftransporter, ATPase-UE
0897	<i>urtE^b</i>	38,93	36,25		9,60	Harnstofftransporter, ATPase-UE
0898	<i>pth2</i>	9,29	6,72		5,45	Peptidyl-tRNA-Hydrolase
0899					1,84	Dioxygenase
0901	<i>pth1</i>			0,46		Peptidyl-tRNA-Hydrolase
0903		2,93				put. Lactoylglutathionlyase
0909		0,56				ABC-Transporter, ATPase Komponente

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
0910		0,50	0,51			hypothetisches Protein
0911	<i>cgtS10</i>		0,53			2-Komponentensystem, SHK
0916	<i>ggtB^a</i>				0,50	γ -Glutamyltranspeptidase
0918		2,78	2,11			hypothetisches Protein
0920		2,20	1,67	0,53		hypothetisches Protein
0921					0,44	hypothetisches Protein
0932		0,42	0,51		0,55	hypothetisches Protein
0944				0,56		hypothetisches Membranprotein
0950	<i>aroF</i>	0,26	0,15	0,26	0,49	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonat-aldolase
0951	<i>uppS1</i>	0,50	0,41	0,58		Undecaprenylpyrophosphatsynthase
0952			0,57			hypothetisches Protein
0954	<i>glyA</i>				2,04	Glycinhydroxymethyltransferase
0957					1,78	hypothetisches Protein
0971			2,03	1,93		NADPH-abh. FMN-Reduktase
0985				3,22		hypothetisches Protein
0986				2,48		Na ⁺ -abh. Transporter, SNF Familie
0987	<i>cmt5</i>			2,09		Corynomycolyltransferase
0988		0,57				put. GTPase
0996			0,55			hypothetisches Protein
1022		1,77				Cysteinsulfinatdesulfinas-verw. Enzym
1024	<i>nadA^a</i>	2,11		0,55		Quinolinatsynthase
1025		3,51	2,63	0,51		ADP-Ribosepyrophosphatase
1030				0,48		hypothetisches Protein
1031	<i>benK3^a</i>			0,57		put. Benzoattransportprotein
1033			0,38			hypothetisches Protein
1034			0,53			ABC-Kobalttransporter, ATPase UE ^a
1035		0,52	0,40			ABC-Kobalttransportsystem, Permease-UE CbiQ ^a
1036		0,56	0,47			put. Adenylatkinase
1037	<i>chaA^a</i>	0,54	0,50			Ca ²⁺ /H ⁺ -Antiporter
1043					2,18	hypothetisches Protein
1044					1,75	Ketopantoatreductase
1051		0,55				hypothetisches Protein
1055			0,55			hypothetisches Protein
1061	<i>dapD</i>	2,10	2,83		2,88	Tetrahydrodipicolinat-N-succinyltransferase
1073	<i>glgC^a</i>	0,54				ADP-Glucosepyrophosphorylase
1075	<i>sigE</i>			0,29	1,89	DNA-gerichtete RNA-Polymerase-spezifische σ -UE SigE
1076		2,05				hypothetisches Protein
1090					2,04	hypothetisches Protein
1094	<i>metE^a</i>			0,53	2,02	Homocysteinmethyltransferase
1095		0,42			2,80	hypothetisches Membranprotein
1096					0,52	put. Flavoprotein, involviert in K ⁺ -Transport
1098		1,56			2,29	put. Esterase, α - β Hydrolase Superfamilie
1099		2,96	2,55		2,44	put. Hydrolase
1100		25,04	23,83	0,48	4,52	non-ribosomales Peptidsynthetisemodul

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
1101	<i>cydC</i>	2,62	2,67			ABC-Typ Multidrug/Protein/Lipidtransport-system, ATPase UE
1107			1,75	1,97		hypothetisches Protein
1116	<i>putP</i>		0,57	0,54	0,37	put. Na ⁺ /proline, Na ⁺ /Panthothenat-symporter
1119		0,57				DNA-Reparaturexonuclease
1120			0,51			ATPase, in involviert DNA-Reparatur
1131		0,37	0,47	1,95		put. Hydrolase oder Acyltransferase
1132	<i>argS</i>	0,52	0,56			Arginyl-tRNA-Synthetase
1133	<i>lysA</i>	0,46	0,50			Diaminopimelatdecarboxylase
1137	<i>thrB</i>		0,52			Homoserinkinase
1146		2,59	2,65			hypothetisches Protein
1147		2,14	2,35			hypothetisches Protein
1150	<i>moaA^a</i>			0,48		Molybdenkofaktor-Biosyntheseenzym A
1151	<i>fadD4^a</i>		0,55			Acyl-CoA Synthetase
1161	<i>atpF</i>			2,06		F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase b-UE
1162	<i>atpH</i>			2,32		F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase δ-UE
1163	<i>atpA</i>			2,02		F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase α-UE
1164	<i>atpG</i>			1,85		F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase γ-UE
1165	<i>atpD</i>			1,76		F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase β-UE
1166	<i>atpC</i>			1,82		F ₀ F ₁ -typ ATP-Synthase ε-UE
1169					0,44	hypothetisches Protein
1182	<i>fixA</i>	0,54				Elektronentransferflavoprotein β-UE
1185					0,51	hypothetisches Membranprotein
1197					1,74	hypothetisches Protein
1210			1,97	2,43		put. Na ⁺ -abh. Transporter
1211	<i>gatB^a</i>		1,70	2,70		put. Glu-tRNA-Gln-Amidotransferase B UE
1221	<i>yggB^a</i>			0,57		Mechanosensitiver Kanal
1222	<i>ilvB</i>			1,74		Acetolactatsynthase, große UE
1223	<i>ilvN</i>			2,46		Acetolactatsynthase, kleine UE
1224	<i>ilvC</i>			1,82		Ketolsäurereductoisomerase
1235	<i>serA</i>				2,46	Phosphoglycerat-DH
1251		0,45	0,26	0,42		hypothetisches Protein
1252			0,36	0,23		hypothetisches Protein
1253	<i>thiC</i>		0,41	0,20	1,86	Thiaminbiosyntheseprotein ThiC
1254		0,30	0,14	0,25		hypothetisches Protein
1280		0,56				hypothetisches Protein
1288		1,95			0,53	hypothetisches Protein
1289		2,34	1,97	0,48		hypothetisches Protein
1290			0,57		0,20	hypothetisches Protein
1291					0,17	hypothetisches Protein
1298					0,53	hypothetisches Membranprotein
1299	<i>polA</i>	0,55				DNA-Polymerase I
1305	<i>ptsG</i>	2,85	2,21	0,52	0,43	PTS IIC-Komponente, Glc/Maltose/N-Acetylglucosamin-spez.
1317			1,77			put. Transkriptionsregulator
1323		0,35	0,39		0,54	hypothetisches Membranprotein

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
1324	<i>infC</i>				0,38	Translationsinitiationsfaktor IF3
1326	<i>rplT</i>				0,43	ribosomales Protein L20
1337		0,53		1,98		hypothetisches Protein
1339					0,45	hypothetisches Protein
1340	<i>argC</i>	0,35	0,26	0,54		Acetylglutamatsemialdehyd-DH
1341	<i>argJ</i>	0,33	0,24	0,46		Glutamat-N-Acetyltransferase
1342	<i>argB</i>		0,13			N-Acetylglutamatkinase
1343	<i>argD</i>	0,29	0,18	0,43		PLP-abh. Aminotransferase
1344	<i>argF</i>	0,30	0,20	0,46		Ornithincarbamoyltransferase
1345	<i>argR</i>	0,30	0,23	0,42		Argininrepressor
1346	<i>argG</i>	0,26	0,23			Argininosuccinatsynthase
1347	<i>argH</i>	0,35	0,33			Argininosuccinatlyase
1351				0,52		hypothetisches Protein
1361		0,55				hypothetisches Protein
1362	<i>pyrG^a</i>				2,67	CTP-Synthetase
1366	<i>parA2^a</i>		0,53			ATPase, involviert in Chromosomenteilung
1368					0,26	Acetyltransferase
1369	<i>sseA2^a</i>	0,57			0,51	Rhodanese-verw. Sulfurtransferase
1372	<i>cmk^a</i>				0,55	Cytidylatkinase
1374					1,76	uncharakt. niedrig-Komplexitätsprotein
1375					2,74	put. DNA-Gyraseinhibitor ^a
1383				1,79	2,38	Hydrolase, α/β Superfamilie
1389					1,97	hypothetisches Membranprotein
1393		2,19	1,92		0,54	Membranprotein, enthält CBS-Domäne
1396	<i>gnd^a</i>			2,31		6-Phosphogluconat-DH, Familie 1
1411				1,82		Permease, <i>Major facilitator</i> -Superfamilie
1412	<i>gpt^a</i>				0,50	put. Phosphoribosyltransferase
1415		1,97	2,21			hypothetisches Protein
1418		0,22	0,16			hypothetisches Protein
1434	<i>tatX^a</i>		1,75			sec-unabh. Proteintranslocase-Protein
1442	<i>pepC</i>				1,83	Aspartylaminopeptidase
1446	<i>aspA</i>		0,56	0,53		Aspartatammonialyase
1450	<i>metH^a</i>			0,34		Homocysteinmethyltransferase
1470	<i>argK</i>				0,57	put. periplasm. Proteinkinase ArgK
1482	<i>acn</i>			3,92	3,05	Aconitase A
1483				1,86		Transkriptionsregulator
1512	<i>tkt</i>			1,88		Transketolase
1517			2,83	3,42	3,18	hypothetisches Protein
1519	<i>soxA</i>	46,06	51,76		11,67	Sarcosinoxidase SoxA
1520	<i>ocd</i>	37,99	34,54		10,45	put. Ornithincyclodecarboxylase Ocd
1521	<i>amtA</i>	49,89	50,29		8,98	Ammoniumtransporter Amt
1526	<i>gap</i>	1,84		0,55		Glyceraldehyd-3-phosphat-DH
1527				0,54		put. Transkriptionsregulator, WhiA-homolog ^a
1528				0,53		hypothetisches Protein
1529				0,56		put. P-Loop-enthaltende Kinase
1541	<i>metK</i>			0,52		S-Adenosylmethionin-Synthetase

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
1552				0,57		put. Nucleosiddiphosphat-Zucker-epimerase, SulA family
1560	<i>aroK</i>				0,52	Shikimatkinase
1568		0,55				put. periplasm. Solut-Bindeprotein
1580		0,46		2,26	1,91	Koenzym F420-abh. N5,N10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Reduktase
1589					1,88	hypothetisches Membranprotein
1610			1,89	1,88		put. Membranprotein
1611					0,50	hypothetisches Protein
1619		0,51		2,18		hypothetisches Protein
1622					0,45	hypothetisches Protein
1623		0,42		2,44		ABC-Transporter, ATPase Komponente
1625					1,79	hypothetisches Protein
1628					0,46	hypothetisches Protein
1631		0,52	0,52	2,31		hypothetisches Protein
1632		0,53		1,89		hypothetisches Protein
1646		2,39	2,19			hypothetisches Protein
1647		2,57	2,59			hypothetisches Protein
1649					1,77	hypothetisches Protein
1656					0,17	hypothetisches Protein
1665				2,14		hypothetisches Protein
1676					0,48	hypothetisches Protein
1755			0,56			hypothetisches Protein
1756		0,39	0,44		0,55	hypothetisches Protein
1757		2,17				hypothetisches Membranprotein
1816		2,74				hypothetisches Protein
1837				2,45	1,81	hypothetisches Membranprotein
1838		0,55		1,78		hypothetisches Membranprotein
1844	<i>sigB</i>			0,40		DNA-gerichtete RNA-Polymerase-spezifische σ -UE SigB
1847		0,57				hypothetisches Protein
1849		0,48	0,49			put. Helicase
1856		0,53	0,43			Transkriptionsregulator des Zuckermetabolismus
1858	<i>ptsl</i>				0,56	Phosphoenolpyruvatproteinkinase
1874	<i>miaB^a</i>		1,76			tRNA-Methylthiotransferase
1875	<i>gluA</i>	2,82	2,78		0,36	Glutamattransport ATP-Bindeprotein
1876	<i>gluB</i>	2,56	1,95			Glutamatbindeprotein GluB-Precursor
1877	<i>gluC</i>	2,61	2,16		0,50	Glutamattransport-Permeaseprotein GluC
1878	<i>gluD</i>	2,87	2,18		0,44	Glutamattransport-Permeaseprotein GluD
1887		2,02		0,37		put. Transkriptionsregulator
1888				0,57		Kompetenz- und Mitomycin-induziertes Protein
1890					0,53	hypothetisches Protein
1894					1,74	hypothetisches Protein
1897		0,41	0,50			put. alternative Thymidylatsynthase
1900	<i>gpsI</i>				0,49	Polyribonucleotidnucleotidyltransferase
1901	<i>rpsO</i>				0,47	ribosomales Protein S15
1902	<i>iunH2^a</i>	0,57				Inosine-uridinnucleosid-N-ribohydrolase

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
1905	<i>pptA2^a</i>		0,57			Phosphopanthetheinyltransferase, UE der Siderophorensynthetase
1910	<i>infB</i>				0,48	Translationsinitiationsfaktor IF-2
1911					0,54	put. Nucleinsäure-Bindeprotein
1912	<i>nusA^a</i>			1,82		Transkriptionsterminator
1915		2,89	3,77		0,51	ABC-Peptid-Transporter, sekretierte UE ^a
1917		2,20	2,80			ABC-Peptid-Transporter, Permease-UE ^a
1918		1,87	2,38			ABC-Peptid-Transporter, ATPase UE ^a
1925				0,51		hypothetisches Protein
1932	<i>map2</i>				1,79	Methioninaminopeptidase
1941		1,75	1,77			hypothetisches Membranprotein
1946	<i>cgsA^a</i>				0,55	Phosphatidatcytidyltransferase
1959				1,74		Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophorentransporter, sekretierte UE ^a
1960	<i>rplS</i>				0,48	ribosomales Protein L19
1961	<i>thiE^a</i>		0,57			Thiaminphosphatpyrophosphorylase
1962	<i>thiO^a</i>		0,56			Glycine/D-Aminosäureoxidase
1963	<i>thiS^a</i>	0,50	0,42			Schwefeltransferprotein
1964	<i>thiG^a</i>	0,56	0,48			Thiaminbiosyntheseenzym
1968		1,77				Di- und Tricarboxylattransporter
1973					1,75	hypothetisches Protein
1976	<i>rpsP</i>				0,55	ribosomales Protein S16
1977				1,76	0,52	Ankyrin-Repeat-haltiges Protein
1981	<i>glnD</i>	17,11	24,32		4,54	Uridilyltransferase
1982	<i>glnK</i>	31,78	36,12		12,47	P _{II} -typ Signaltransduktionsprotein GlnK
1983	<i>amtB</i>	25,47	32,17		10,28	niedrig-affines Ammoniumaufnahme-protein AmtB
1987		2,44		0,31		Acylphosphatases
1993	<i>mutM1^a</i>	0,42	0,47			Formamidopyrimidin-DNA Glycosylase
1994	<i>rnc</i>	0,56	0,53			dsRNA-spez. Ribonuclease III
1995		0,57	0,46			hypothetisches Protein
2001				0,50		hypothetisches Protein
2005					1,95	hypothetisches Membranprotein
2025				0,53		Transkriptionsregulator
2027				0,35		SAM-abh. Methyltransferase
2047				1,74		hypothetisches Membranprotein
2048		0,49		1,82		Methioninsynthase II
2051		1,97		0,50		ABC-Typ Aminosäuretransporter, sekretierte UE ^a
2081	<i>mraY^a</i>				0,57	UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid-phosphotransferase
2084	<i>ftsI</i>	0,54	0,49			Zellteilungsprotein FtsI
2085			0,55			hypothetisches Protein
2086	<i>mraW^e</i>		0,46			put. SAM-abh. Methyltransferase, involviert in Zellwandbiogenese
2088		2,10		0,47		hypothetisches Membranprotein
2098	<i>aroG</i>	0,47		2,09		Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonat-Aldolase
2101	<i>cmt4^a</i>			1,81		Corynomycolyltransferase

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
2104	<i>plsC^a</i>		1,96			1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphat-Acyltransferase
2108		3,39	1,87	0,57		Zellwand-assoziierte Hydrolase
2110	<i>qcrA1</i>	2,27	2,55			Rieske-Fe-S-Protein
2111	<i>qcrC</i>		2,14			Cytochrom C
2112	<i>ctaE</i>	2,71	2,49			Cytochrom C-Oxidase-UE III
2117		1,85		0,49		hypothetisches Protein
2122					1,79	put. Kurzketten-DH
2123	<i>ilvE</i>				1,75	Aminosäure-Aminotransferase
2124	<i>pepB</i>	0,46	0,50			Leucylaminopeptidase
2133	<i>glnA</i>	5,47	5,07		5,48	Glutaminsynthetase I
2138		0,48	0,57			put. Translationinitiationinhibitor
2141				1,75		Permease, Major facilitator-Superfamile
2144					0,32	Permease, Major facilitator-Superfamile ^a
2145					0,29	hypothetisches Protein
2146	<i>hmuO^a</i>				0,27	Hämoxygenase
2150					2,01	put. Pyridoxinbiosyntheseenzym
2152	<i>galK²</i>	0,52				Galactokinase
2168				1,86	0,43	ABC-Transporter, ATPase Komponente
2169					0,49	ABC-Transporter, Permeasekomponente
2170					0,53	sekretiertes Substratbindeprotein eines ABC-Transporters
2177		1,76				hypothetisches Protein
2184			1,89			hypothetisches Protein
2186			0,55			hypothetisches Protein
2188	<i>dnaG^a</i>		0,58			DNA-Primase
2197					1,77	hypothetisches Protein
2198	<i>glyS</i>	0,55				Klasse II Glycyl-tRNA-Synthetase
2199		1,95	1,80	0,56		put. Transkriptionsregulator
2200	<i>fur^a</i>	2,12		0,53		Eisenaufnahme-Regulationsprotein
2219	<i>dcp</i>		0,57			Peptidyl-Dipeptidase A Protein
2224				2,20		hypothetisches Protein
2233	<i>glcD^a</i>				2,50	put. Glycolatoxidase, FAD-gebundene UE
2247	<i>aceB</i>	0,37		0,28	0,35	Malatsynthase
2248	<i>aceA</i>	0,51	0,29	0,46	0,30	Isocitratlyase
2252					2,07	hypothetisches Protein
2261	<i>rpsT</i>			2,06	0,47	ribosomales Protein S20
2274	<i>proB</i>				0,51	Glutamat-5-kinase
2277	<i>dkgA^a</i>			0,34		2,5-Diketo-D-gluconsäurereduktase
2279	<i>rpmA</i>				0,52	ribosomales Protein L27
2298				1,93		Transkriptionsregulator
2302	<i>vanK^a</i>			1,77	0,62	put. Vanillatransporter
2329	<i>tig</i>			1,92		Triggerfaktor, in Zellteilung involvierte PPlase
2336				0,56		hypothetisches Protein
2342		0,46	0,37			hypothetisches Protein
2360	<i>metB</i>			0,55		Cystathionin- γ -synthase
2372					0,51	hypothetisches Membranprotein
2373					0,48	ABC-Zuckertransporter

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
2376					0,37	hypothetisches Protein
2377	<i>msiK1^a</i>	1,83	1,74		0,44	ABC-Zuckertransporter, ATPase Komponente
2384	<i>hyi^a</i>				1,81	Hydroxypyruvatisomerase
2388	<i>lppS^a</i>				0,41	sekretiertes Lipoprotein
2399	<i>gntV^a</i>		2,52	4,47		Gluconatkinase
2437	<i>ctaD</i>	2,64	2,85			Häm/Kupfer-typ Cytochrome/Quinoloxidase, UE 1
2450		3,94	3,64		4,49	hypothetisches Protein
2451		4,28	3,95		4,23	hypothetisches Protein
2457	<i>tnp21a</i>	11,48	17,00	1,81	7,85	Transposase
2458	<i>psp4</i>				0,52	put. sekretiertes Protein
2463				11,47	1,77	Na ⁺ /H ⁺ -Dicarboxylatsymporter
2465				0,44		in Lipoproteinexport involvierter ABC-Transporter, ATPase UE
2473	<i>cysK</i>	2,69	2,60		0,44	O-Acetylserine (Thiol)-Lyase
2476	<i>sucD^a</i>				0,27	Succinyl-CoA-Synthetase α-UE
2477	<i>sucC^a</i>				0,50	Succinyl-CoA-Synthetase β-UE
2480	<i>actA^a</i>			0,44		Butyryl-CoA-Acetat-CoA-Transferase
2498		1,89				put. Membranprotein
2518	<i>cgtR3</i>	1,88		0,56	1,81	put. 2-Komponentensystem, RR
2520				0,55	2,06	hypothetisches Protein
2521	<i>poxB^d</i>			0,55	2,32	Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase
2528	<i>ddh</i>	0,55	0,41	0,47		D-2-Hydroxyisocaproate -DH
2537	<i>otsB</i>				1,89	Trehalose-6-Phosphatase
2553	<i>ptsS</i>			1,90	0,35	PTS IIC Komponente
2569	<i>ispF^a</i>				0,57	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphatcytidyltransferase
2574		2,05	2,13			hypothetisches Protein
2579	<i>cynT^a</i>			1,99		Carbonanhydrase
2582	<i>butA</i>				2,73	L-2.3-Butandiol-DH
2584		2,77	2,85			hypothetisches Protein
2591		0,52				hypothetisches Protein
2604	<i>hpt^a</i>				1,98	Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase
2612					1,86	hypothetisches Protein
2615				0,55	1,86	uncharakt. NAD(FAD)-abh.-DH
2621	<i>groEL</i>		1,97	1,90		Chaperonin GroEL
2632			0,57	0,38		Acetyl-CoA-acetyltransferase
2650		0,53				ABC-Transporter, Permease-UE
2651		0,55	0,55			ABC-Transporter, ATPase UE
2652					1,80	NTP-Pyrophosphohydrolase
2653				0,47		hypothetisches Membranprotein
2657	<i>pta^a</i>				0,44	Phosphotransacetylase
2664			2,20			hypothetisches Protein
2665	<i>tnp8b</i>				0,51	put. Transposase
2673	<i>fda</i>	1,84	2,01			Fructosebisphosphataldolase

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
2682	<i>clpB</i>			0,55		ATPase mit Chaperonaktivität, ATP-Binde-UE
2684		1,74	3,03	2,27	3,40	put. Transkriptionsregulator
2685					1,83	put. Co/Zn/Cd-Kationentransporter
2686					2,38	put. Flavoprotein, involviert in K ⁺ -Transport
2698			0,37	0,25		NAD-abh. Aldehyd-DH
2709	<i>adhA</i>	0,54	0,43		0,20	Zn-abh. Alkohol -DH
2713				0,35	0,42	put. Permease
2714				0,44	0,34	hypothetisches Protein
2715	<i>cysN</i>			0,41	0,43	Sulfatadenylattransferase, UE 1
2716	<i>cysD</i>			0,48	0,40	Sulfatadenylattransferase, UE 2
2717	<i>cysH</i>			0,51	0,55	Phosphoadenosinphosphosulfat-reductase
2718	<i>cysI</i>			0,56	0,42	put. Nitritreductase
2719	<i>cysJ</i>				0,36	put. Ferredoxin/Ferredoxin-NADP-Reductase
2723				0,56		hypothetisches Protein
2737		0,23	0,27			put. Membranprotease-UE
2739	<i>tagA1^a</i>	0,28	0,33			3-Methyladenin-DNA-Glycosylase
2750	<i>udgA2</i>	0,55	0,50			put. UDP-Glucose-6-DH
2752					0,57	hypothetisches Protein
2753					1,80	hypothetisches Protein
2765	<i>pck</i>			0,33		Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (GTP)
2776		0,40	0,50			hypothetisches Protein
2787				0,48	0,16	put. Flavoprotein, beteiligt an K ⁺ -Transport
2789		0,31	0,51	2,66		hypothetisches Protein
2803		2,45	2,21		1,82	hypothetisches Protein
2805			1,78			hypothetisches Protein
2806		0,57		1,75		hypothetisches Protein
2807	<i>glpQ1^a</i>				2,02	Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase
2808	<i>gntP</i>		1,91	4,38		put. Gluconatpermease
2818		2,10				hypothetisches Protein
2826	<i>sod</i>				1,76	Superoxiddismutase
2841		0,44	0,39			hypothetisches Membranprotein
2857				0,57		hypothetisches Protein
2865				1,75		put. Multikupferoxidase
2867		1,77		0,57		put. NADPH:Quinonreductase
2875				1,88		Kupferchaperon
2886			0,57			Transkriptionsregulator
2887		0,54	0,56			Universelles Stressprotein UspA oder verw. Nukleotidbindeprotein ^a
2888			1,80			hypothetisches Membranprotein
2894		0,57		2,05		Myo-inositol-1-phosphat synthase
2895		0,49	0,50	2,06		hypothetisches Protein
2898	<i>mutM2^a</i>			1,84		Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
2902				0,53		put. Quinonoxidoreduktase ^a

Fortsetzung Tabelle 7.1:

NCgl-Nr.	Gen-Name	b vs. D _{kl}	b vs. D _{gr}	D _{kl} vs. D _{gr}	+N vs. oN	Annotation
2904	<i>mez</i>			0,22		Malatenzym
2906					2,68	hypothetisches Membranprotein
2907				0,40		hypothetisches Membranprotein
2908	<i>merA^a</i>				1,81	put. FAD-abh. Pyridinnukleotiddisulfid-oxidoreduktase, ähnlich einer Quecksilberreduktase ^a
2933	<i>rmpC^a</i>	0,38		3,16		put. Ribitoltransportprotein
2934	<i>rmpA^a</i>	0,32	0,54	3,18		put. ribitolspez. Enzym II eines PTS-Systems
2940			0,40	0,37	2,00	hypothetisches Protein
2941			0,33	0,36		put. Transkriptionsregulator
2942		0,57	0,42			NADH:Flavinoxidoreduktase
2991	<i>yidC</i>				0,50	put. Präproteintranslocase YidC-UE
2992	<i>rnpA^a</i>				0,40	RNase P-Protein Komponente
2993	<i>rpmH</i>				0,27	ribosomales Protein L34

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer möchte ich mich für das spannende Arbeitsthema, die hervorragende Betreuung und die Übernahme des Hauptreferats herzlich bedanken. Die freundliche Unterstützung und intensive Diskussionen haben immer neue Ideen aufgeworfen und meine Arbeit stets bereichert. Außerdem danke ich ihm für seine Fairness und Geduld zwischen Juni und August!

Herrn Prof. Dr. Thomas Langer danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Meinem Betreuer Dr. Andreas Burkovski ist es durch sein Fachwissen, seinen Humor, seine vielen Ideen und seine Diskussionsbereitschaft immer gelungen, hervorragende Arbeitsbedingungen zu schaffen. Er hat mir durch unzählige Impulse, Tipps und Tricks enorm geholfen und hat mir wertvollen Spielraum zur Gestaltung gelassen. Vielen Dank dafür!

Allen alten Hasen und Neulingen der „Stickstoffgruppe“ – Gabi, Julia, Anne, Lars, Britta, Tim, Alja, Hedda, Anja, Astrid und Eva – danke ich, das sie mit Ratschlägen, spontaner Hilfe in der Not und fachlichen Diskussionen genauso dabei waren wie mit Humor und Blödeleien. Dadurch war das Arbeitsklima immer prima und an Spaß bei der Arbeit hat es mir nie gefehlt. Ihr seid super!!!

Der „Osmogruppe“ danke ich für ihre vielen Kaffeetrinker! Ohne Euch wäre meine Halb-Zwölf-Mensa-und-Cafeteria-Pause nicht komplett.

Einige Kooperationen haben diese Arbeit sehr abwechslungsreich gemacht. Dafür danke ich Mathias Schäfer (Uni Köln) für zahlreiche Stunden am „MALDI“, Andrea Hüser (Uni Bielefeld) für die Unterstützung bei den Microarrays und die tolle Zeit in Bielefeld und Tibor Anderlei (AC Biotec) sowie Christoph Stöckmann (Uni Aachen) für einige schöne Wochen in meiner alten Heimat Aachen und den seelischen Beistand an der grünen Truhe.

Einigen Personen abseits der Biochemie-Insel gilt mein besonderer Dank, weil sie immer für mich da sind und mir wertvollen Rückhalt geben. Allen voran stehen meine Eltern, meine Geschwister und mein Freund Klaus, für deren einmalige Unterstützung ich gar keine passenden Worte finde. Auch viele enge Freunde - ich werde Euch nicht alle namentlich nennen - haben einen wichtigen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Tausend Dank!

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. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Bendt A, Beckers G, Silberbach M, Wittmann A, Burkovski A. (2004). Utilization of creatinine as an alternative nitrogen source in *Corynebacterium glutamicum*. Arch Microbiol **181**: 443-450

Silberbach M, Hüser A, Kalinowski J, Pühler A, Krämer R, Burkovski A. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, zur Publikation eingereicht

Silberbach M, Schäfer M, Hüser A, Kalinowski J, Pühler A, Krämer R, Burkovski A. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques. Appl Env Microbiol, zur Publikation eingereicht

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

Datum: Bonn, September 2004

Unterschrift:

Lebenslauf

Schulbildung

- 1982-1986 Gemeinschafts-Grundschule Büttgen
- 1986-1995 Georg-Büchner-Gymnasium der Stadt Kaarst
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium und Promotion

- 10/1995 – 06/2001 Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
- 09/2000 - 06/2001 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen unter Betreuung von Prof. J. Büchs
Abschluss: Diplom
- 10/2001 - 12/2004 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Betreuung von Prof. Dr. R. Krämer

Praktika

- 07/1995 Praktikum am Medizinischen Institut für Umwelthygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 05/2000 - 07/2000 Praktikum bei der DSM Biotech GmbH, Jülich