

Globale Analyse von Stickstoff-Metabolismus und  
Stickstoff-Kontrolle in  
*Corynebacterium glutamicum*

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Anne K. Bendt**

aus Kiel

Köln, Dezember 2002

**Berichterstatter:**

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Reinhard Sterner

Tag der Disputation: 19. Februar 2003

## Global analysis of nitrogen metabolism and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*

The Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* is one of the most important microorganism involved in the industrial production of amino acids such as L-glutamate and L-lysine. Whereas optimal growth conditions are maintained during fermentation processes, stress and starvation are the rule in the natural habitat of this bacterium, the soil. In this study, the reaction of *C. glutamicum* to nitrogen starvation was investigated by global analyses.

Adaptation to nitrogen starvation that occur *via* regulation of gene expression were monitored using whole-genome microarrays. By this approach, various genes were detected as being significantly up-regulated in response to nitrogen starvation. Among them are genes encoding proteins involved in (methyl-)ammonium uptake (*amt*, *amtB*), genes encoding the glutamate-specific ABC transporter (*gluABC*), genes coding for proteins of nitrogen control (*glnD*, *glnE*, *glnK*) as well as genes encoding nitrogen assimilating enzymes such as glutamate dehydrogenase (*gdh*), glutamine synthetase I (*glnA*), GOGAT (*gltBD*) and the urea-degrading enzyme urease (*ureABCDE*).

Adaptation occurring *via* regulation of protein abundance were studied by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). This work focussed on the analysis of cytoplasmic proteins, with more than 1200 of them being analyzable by 2-DE. Interestingly, the abundance of proteins, whose gene expression has been shown to be up-regulated under nitrogen starvation, remained unchanged in the proteome of nitrogen starved cells, indicating only subtle changes in protein synthesis.

To elucidate the role of phosphorylation processes, methods for the detection of phosphorylated proteins were established. By *in vivo* radiolabeling using [<sup>33</sup>P]-phosphoric acid and by immunostaining with phosphoserine-specific antibodies, up to 90 phosphoproteins were detected. Most of them were identified by MALDI-TOF-MS and a phospho-proteome map of *C. glutamicum* could be created. Additionally, the influence of nitrogen deprivation on the phospho-proteome was investigated.

## **Globale Analysen von Stickstoff-Metabolismus und Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum***

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* hat für die industrielle Produktion von Aminosäuren wie L-Glutamat und L-Lysin eine große Bedeutung. Während der Fermentationsprozesse werden optimale Wachstumsbedingungen für das Bakterium geschaffen; im Gegensatz dazu sind im natürlichen Habitat, dem Boden, Stress und Nährstoff-Limitation die Regel. In dieser Arbeit wurde die Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation global analysiert.

Adaptationsmechanismen an Stickstoff-Limitation, die über die Regulation der Genexpression kontrolliert werden, wurden mit Gesamtgenom-Microarrays untersucht. Über diesen Ansatz konnte eine Vielzahl von Genen detektiert werden, deren Expression unter Stickstoff-Limitation signifikant verstärkt war. Unter ihnen befanden sich Gene, deren Genprodukte in die (Methyl-)Ammonium-Aufnahme involviert sind (*amt*, *amtB*), Gene, die für den Glutamat-spezifischen ABC-Transporter kodieren (*gluABC*), Gene, die für Proteine der Stickstoff-Kontrolle kodieren (*glnD*, *glnE*, *glnK*) sowie Gene, die für Stickstoff-assimilierende Enzyme wie der Glutamat-Dehydrogenase (*gdh*), der Glutamin-Synthetase I (*glnA*), die GOGAT (*gltBD*) und die Urease (*ureABCDE*) kodieren.

Adaptationsmechanismen, die über die Regulation der Proteinmenge kontrolliert werden, wurden mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) untersucht. Die Analysen konzentrierten sich dabei auf die cytoplasmatischen Proteine, von denen mehr als 1200 über 2-DE analysierbar sind. Interessanterweise waren die Proteine, deren Genexpression unter Stickstoff-Hunger signifikant induziert war, im Proteom N-gehungelter Zellen nicht verstärkt vorhanden, was auf nur geringfügige Änderungen der Proteinmengen hinweist.

Um die Bedeutung von Phosphorylierungsprozessen zu analysieren, wurden Methoden zur Detektion phosphorylierter Proteine etabliert. Bis zu 90 Phosphoproteine konnten durch *in vivo*-Markierung mit [<sup>33</sup>P] und durch Immunfärbung mit Phosphoserin-spezifischen Antikörpern detektiert werden. Der Großteil von ihnen wurde über MALDI-TOF-MS identifiziert, so dass eine Karte des Phosphoproteoms von *C. glutamicum* erstellt werden konnte. Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluss Stickstoff-Limitation auf das Phosphoproteom hat.

## Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b> .....                                     | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden</b> .....                          | <b>10</b> |
| 2.1        | Chemikalien und Materialien .....                           | 10        |
| <b>2.2</b> | <b>Zellanzucht und <i>in vivo</i>-Markierung</b> .....      | <b>10</b> |
| 2.2.1      | Bakterienstämme .....                                       | 10        |
| 2.2.2      | Nährmedien .....  | 10        |
| 2.2.3      | Kultivierungsbedingungen .....                              | 11        |
| 2.2.4      | Die <i>pulse chase</i> -Markierung .....                    | 12        |
| 2.2.5      | [ <sup>33</sup> P]-Markierung.....                          | 12        |
| <b>2.3</b> | <b>Protein-Methoden</b> .....                               | <b>12</b> |
| 2.3.1      | Proteingewinnung .....                                      | 12        |
| 2.3.2      | Gewinnung des Sekretoms.....                                | 13        |
| 2.3.3      | SDS-PAGE .....  | 14        |
| 2.3.4      | Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) .....             | 14        |
| 2.3.5      | Kolloidale Coomassie-Färbung.....                           | 15        |
| 2.3.6      | Silberfärbung und Entfärbung.....                           | 16        |
| 2.3.7      | Western Blot-Analysen .....                                 | 16        |
| 2.3.7.1    | Anti-Phosphoserin Sampler Kit:.....                         | 17        |
| 2.3.8      | Proteinidentifizierung .....                                | 18        |
| 2.3.8.1    | Identifizierung nach einem <i>in gel</i> -Verdau.....       | 18        |
| 2.3.8.2    | Identifizierung nach einem <i>in membrane</i> -Verdau ..... | 19        |
| 2.3.8.3    | MALDI-TOF-MS .....  | 19        |
| 2.3.8.4    | Datenbanksuche.....   | 20        |
| 2.3.8.5    | Phosphatase-Behandlung der tryptischen Verdaue .....        | 20        |
| <b>2.4</b> | <b>RNA-Methoden</b> .....                                   | <b>21</b> |
| 2.4.1      | RNA-Gewinnung.....  | 21        |
| 2.4.2      | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....                       | 22        |
| 2.4.3      | Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....              | 22        |
| 2.4.4      | Markierung der RNA .....                                    | 23        |
| 2.4.5      | Hybridisierung und Auswertung.....                          | 24        |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse</b> .....                                     | <b>25</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)</b> .....  | <b>25</b> |
| 3.1.1      | Silbergefärbte 2D-Gele .....                                | 26        |

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.1.2      | Die <i>pulse chase</i> -Markierung .....                           | 27        |
| 3.1.3      | Proteinmuster der Mutante $\Delta glnD$ .....                      | 29        |
| <b>3.2</b> | <b>Wachstum mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen .....</b>    | <b>30</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Das Sekretom von <i>C. glutamicum</i>.....</b>                  | <b>30</b> |
| 3.3.1      | Detektion der Glutamin-Synthetase I im Sekretom.....               | 32        |
| <b>3.4</b> | <b>Hitzeschock der Zellen.....</b>                                 | <b>33</b> |
| 3.4.1      | Wachstum unter Hitzeschock .....                                   | 33        |
| 3.4.1.1    | Wachstumskurve unter Hitzeschock.....                              | 33        |
| 3.4.1.2    | Überlebenstest unter Hitzeschock .....                             | 34        |
| 3.4.2      | Das Proteom unter Hitzeschock .....                                | 35        |
| <b>3.5</b> | <b>Das Phosphoproteom von <i>C. glutamicum</i> .....</b>           | <b>37</b> |
| 3.5.1      | Detektion über radioaktive Markierung .....                        | 37        |
| 3.5.2      | Detektion über Immunfärbung .....                                  | 40        |
| 3.5.3      | Identifizierung der phosphorylierten Proteine .....                | 41        |
| 3.5.3.1    | [ <sup>33</sup> P]-markierte Proteine .....                        | 41        |
| 3.5.3.2    | Immunodetektierte Proteine.....                                    | 42        |
| 3.5.4      | Phosphoproteine von <i>C. glutamicum</i> .....                     | 44        |
| 3.5.5      | Phosphorylierungsprozesse während Stickstoff-Limitation .....      | 50        |
| <b>3.6</b> | <b>Ergebnisse der Microarray-Experimente.....</b>                  | <b>51</b> |
| 3.6.1      | Das Transkriptom nach 10 und 30 Minuten Stickstoff-Limitation..... | 53        |
| 3.6.2      | Das Transkriptom nach vier Stunden Stickstoff-Limitation .....     | 57        |
| 3.6.3      | Das Transkriptom nach Hitzeschock .....                            | 62        |
| 3.6.4      | Qualitätskontrolle der Chips.....                                  | 63        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Proteomanalysen.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Das Phosphoproteom von <i>C. glutamicum</i> .....</b>           | <b>69</b> |
| 4.2.1      | Geschätzter Umfang des Phosphoproteoms.....                        | 72        |
| 4.2.2      | Phosphorylierungsprozesse während Stickstoff-Limitation .....      | 72        |
| <b>4.3</b> | <b>Transkriptomanalysen .....</b>                                  | <b>73</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Vergleich der Proteom- und Transkriptomanalysen .....</b>       | <b>77</b> |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>                                       | <b>79</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literatur.....</b>  | <b>80</b> |

## Abkürzungen

|                   |  |
|-------------------|--|
| A. bidest         | bidestilliertes Wasser                     |
| ATCC              | American Type Culture Collection           |
| ATP               | Adenosintriphosphat                        |
| BHI               | Brain Heart Infusion                       |
| bp                | Basenpaare                                 |
| Bq                | Bequerel                                   |
| CAPS              | 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure    |
| cpm               | <i>counts per minute</i>                   |
| EDTA              | Ethylendiaminotetraessigsäure              |
| g                 | Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> ) |
| GDH               | Glutamatdehydrogenase                      |
| GOGAT             | Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase    |
| GS I              | Glutamin-Synthetase I                      |
| K <sub>m</sub>    | Michaelis-Menten-Konstante                 |
| kb                | Kilobasen                                  |
| kDa               | Kilodalton                                 |
| kV                | Kilovolt                                   |
| M                 | molar                                      |
| mg                | Milligramm                                 |
| ml                | Milliliter                                 |
| MOPS              | 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure          |
| µg                | Mikrogramm                                 |
| N                 | Stickstoff                                 |
| nm                | Nanometer                                  |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte bei 600 nm                 |
| PP <sub>i</sub>   | anorganisches Phosphat                     |
| PVDF              | Polyvinylidendifluorid                     |
| RT                | Raumtemperatur (20-22 °C)                  |
| SDS               | Natriumdodecylsulfat                       |
| Tris              | 2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol       |
| U                 | Unit                                       |
| UE                | Untereinheit                               |
| w/v               | <i>weights per volume</i>                  |

## 1 Einleitung

Der aerobe, nicht-sporenbildende Prokaryot *Corynebacterium glutamicum* wurde 1957 als natürlicher Glutamatproduzent aus Bodenproben aus dem Zoo von Tokio isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957, Abe *et al.*, 1967). Inzwischen hat das Bakterium eine bedeutende biotechnologische und wirtschaftliche Relevanz erlangt. Während der Wildtypstamm ATCC 13032 unter Biotin-Limitation L-Glutamat ausscheidet, konnten durch gezielte Stammentwicklung diverse Produktionsstämme konstruiert werden, die weitere Aminosäuren wie L-Lysin, L-Threonin und L-Methionin und in geringerem Maßstab das Vitamin Pantothenat sowie Nukleotide produzieren (Leuchtenberger, 1996). Momentan werden jährlich über eine Million Tonnen Glutamat hergestellt, welches vor allem als Geschmacksverstärker verwendet wird, sowie 600 000 t/a Lysin, das als Futtermitteladditiv in der Tiermast zum Einsatz kommt. Dieses entspricht einem jährlichen Umsatzvolumen von 1,5 Millionen US-Dollar (Überblick, s. Eggeling & Sahm, 1999). Die große wirtschaftliche Bedeutung von *C. glutamicum* wird durch die zahlreichen Sequenzierungsprojekte verdeutlicht, die von der Industrie finanziert wurden, namentlich der Degussa-AG, BASF, ADM (USA) und Kyowa Hakko Kogyo (Japan). Seit kurzem ist die Genomsequenz von *C. glutamicum* öffentlich zugänglich (bspw. über [www.gib.genes.nig.ac.jp](http://www.gib.genes.nig.ac.jp) oder [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); beide basieren auf unterschiedlichen Genomannotationen), wodurch weiterführende Analysen und Proteinidentifizierungen wesentlich erleichtert wurden.

Namensgebend für die Gattung *Corynebacterium* ist deren keulenförmige ("coryneforme") Morphologie. Die Zellen zeigen als weiteres morphologisches Merkmal eine "schnappende" Zellteilung, wobei Zellen vor der eigentlichen Teilung noch seitlich miteinander verbunden bleiben (Abb. 1).

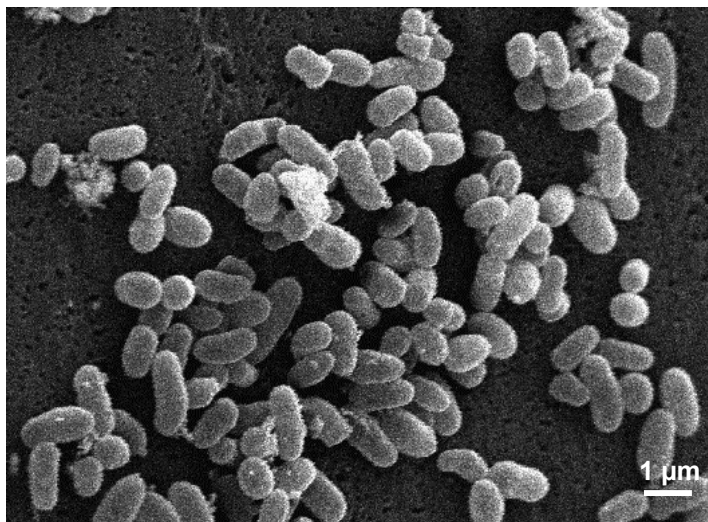


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *C. glutamicum*-Kolonie. Die namensgebende keulenförmige Morphologie der Zellen sowie die "schnappende" Zellteilung sind zu erkennen. Abbildung freundlicherweise von Nina Möker zur Verfügung gestellt.



Phylogenetisch gehört *C. glutamicum* zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit einem hohen G+C-Gehalt der DNA. Innerhalb dieser bilden die Corynebakterien gemeinsam mit den Nocardien und den Mycobakterien die Gruppe der *Mycolata* genannten Mycolsäurehaltigen Actinomyceten (Überblick, s. Eggeling & Sahm, 2001). *C. glutamicum* ist demnach eng mit den Krankheitserregern *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium tuberculosis* verwandt (Pascual *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu diesen humanpathogenen Vertretern wurde *C. glutamicum* dagegen als apathogener Organismus eingestuft. Verglichen mit den pathogenen Actinomyceten ist *C. glutamicum* genetisch gut zugänglich. Ein umfangreiches Spektrum molekulargenetischer Techniken wurde etabliert, welche es ermöglichen, *C. glutamicum* als Modellorganismus für die pathogenen Mycolsäurehaltigen Actinomyceten zu untersuchen.

Auch mit dem Ziel der Stammoptimierung von Produktionsstämmen wurde der Stoffwechsel von *C. glutamicum* bereits umfangreich charakterisiert, so dass insbesondere über den Kohlenstoff-Metabolismus und die Aminosäure-Biosynthese detaillierte Kenntnisse vorliegen. Die Regulationsmechanismen der Aufnahme und Assimilation von Stickstoff-Quellen dagegen werden erst seit wenigen Jahren erforscht, obwohl Stickstoff ein essentielles Element für den gesamten Stoffwechsel ist, insbesondere für die Biosynthese von Proteinen und Nukleinsäuren. Nur wenige Mikroorganismen sind in der Lage, molekularen Stickstoff der Erdatmosphäre zu fixieren; die meisten decken ihren Stickstoff-Bedarf durch die Aufnahme Stickstoff-haltiger Verbindungen. Diese können einfache anorganische Ionen wie Ammonium oder Nitrat sein oder komplexe organische Substanzen wie Aminosäuren, Harnstoff oder Nukleoside. Wie die meisten Bakterien ist auch *C. glutamicum* in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Stickstoff-Quellen aufzunehmen und in den zellulären Stickstoff-Metabolismus einzuleiten, darunter Ammonium, Glutamat, Glutamin und Harnstoff. Diese Verbindungen liegen im natürlichen Habitat, dem Boden, durch Zersetzungsprozesse von tierischem und pflanzlichem Material vor.

Die bevorzugte Stickstoff-Quelle von *C. glutamicum* ist Ammonium. Durch vorherige Arbeiten konnte ein Modell der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum* erstellt werden (Abb. 2), durch das die Regulation von Aufnahme und Assimilation dieser Stickstoff-Quelle beschrieben wird (Jakoby *et al.*, 1999, Jakoby *et al.*, 2000, Meier-Wagner *et al.*, 2000, Nolden *et al.*, 2001a, Beckers *et al.*, 2001). Ammonium gelangt bei guter Stickstoff-Versorgung in Form von Ammoniak, mit dem es im Gleichgewicht steht, durch Diffusion in die Zelle, wo es durch die Reaktion der Glutamat-Dehydrogenase unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents an 2-Ketoglutarat addiert wird und in der Folge Glutamat entsteht. Bei sinkender Ammonium-Konzentration dagegen kann nicht mehr ausreichend Ammoniak in die

Zelle diffundieren. Über welchen Mechanismus *C. glutamicum* den resultierenden Stickstoff-Mangel wahrnimmt, ist noch unklar. Lars Nolden postulierte die Existenz eines oder mehrerer Sensor(en), welche(r) ein externes oder internes Signal für den Stickstoff-Mangel empfängt (Nolden, 2001c). Nachfolgend wird eine Regulationskaskade initiiert, in der das Mangel-Signal an die Uridylyltransferase (UTase, kodiert durch *glnD*) übertragen wird. Die UTase leitet das Signal weiter, indem sie das Signaltransduktionsprotein GlnK (kodiert durch *glnK*) uridylyliert. Durch die Uridylylierung beeinflusst GlnK die Aktivität der Adenylyltransferase (ATase, kodiert durch *glnE*), so dass dieses Enzym die Glutamin-Synthetase I (kodiert durch *glnA*) aktiviert. Die Glutamin-Synthetase I kann nun unter Verbrauch eines ATP Ammonium auf Glutamat übertragen, wodurch Glutamin entsteht, welches über die Glutamat-Synthase/GOGAT (kodiert durch *gltBD*) unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents zum Teil in Glutamat umgewandelt wird.

Für diesen Weg verbraucht die Zelle pro Mol Ammonium ein Mol ATP. Um einer Energieverschwendung vorzubeugen, ist es günstig, die Proteine der Regulationskaskade und der Ammoniumassimilation abhängig vom Stickstoff-Status der Zelle strikt zu regulieren. Neben der geschilderten Regulation auf Aktivitätsebene findet daher zusätzlich eine Regulation auf Ebene der Genexpression statt. Die Expression der Gene, die für die genannten Proteine der Regulationskaskade (*glnD*, *glnK*) und der Ammoniumassimilation (*glnA*, *gltBD*-Operon) kodieren, ist unter guter Stickstoff-Versorgung der Zelle reprimiert. Verantwortlich für diese negative Kontrolle ist das AmtR-Protein. Über ein spezifisches Bindemotiv in der Promotorregion der betreffenden Gene bindet der AmtR-Regulator unter guter Stickstoff-Versorgung an die DNA und verhindert die Genexpression. Unter Stickstoff-Limitation interagiert wahrscheinlich uridylyliertes GlnK mit dem Repressor, was zu der Derepression AmtR-regulierter Gene führt. Zusätzlich zu den bereits genannten Genen kontrolliert AmtR die Genexpression von zwei Aufnahmesystemen, dem hochaffinen (Methyl)Ammoniumtransporter Amt (kodiert durch *amt*) und dem Ammoniumtransporter AmtB (kodiert durch *amtB*). Unter guter Stickstoff-Versorgung reprimiert AmtR deren Genexpression, unter Stickstoff-Limitation findet Expression und Synthese dieser Aufnahmesysteme statt, wodurch Ammonium in die Zelle transportiert und anschließend über den geschilderten Glutamin-Synthetase I/GOGAT-Weg assimiliert wird. Neben den Genen *glnA* und *amt* sowie dem *gltBD*-Operon und dem *amtB-glnK-glnD*-Operon kontrolliert AmtR die Expression von mindestens zwei weiteren Genen, ORF 454 (*cg2b21\_002*) und ORF 1731 (*cg1j9\_075*), denen bisher keine Funktion zugeschrieben werden konnte (Nolden, 2001c). Die genannten Gene, die unter der gemeinsamen Kontrolle des globalen Regulators AmtR stehen, werden als AmtR-Regulon bezeichnet. Wie viele Gene insgesamt von diesem

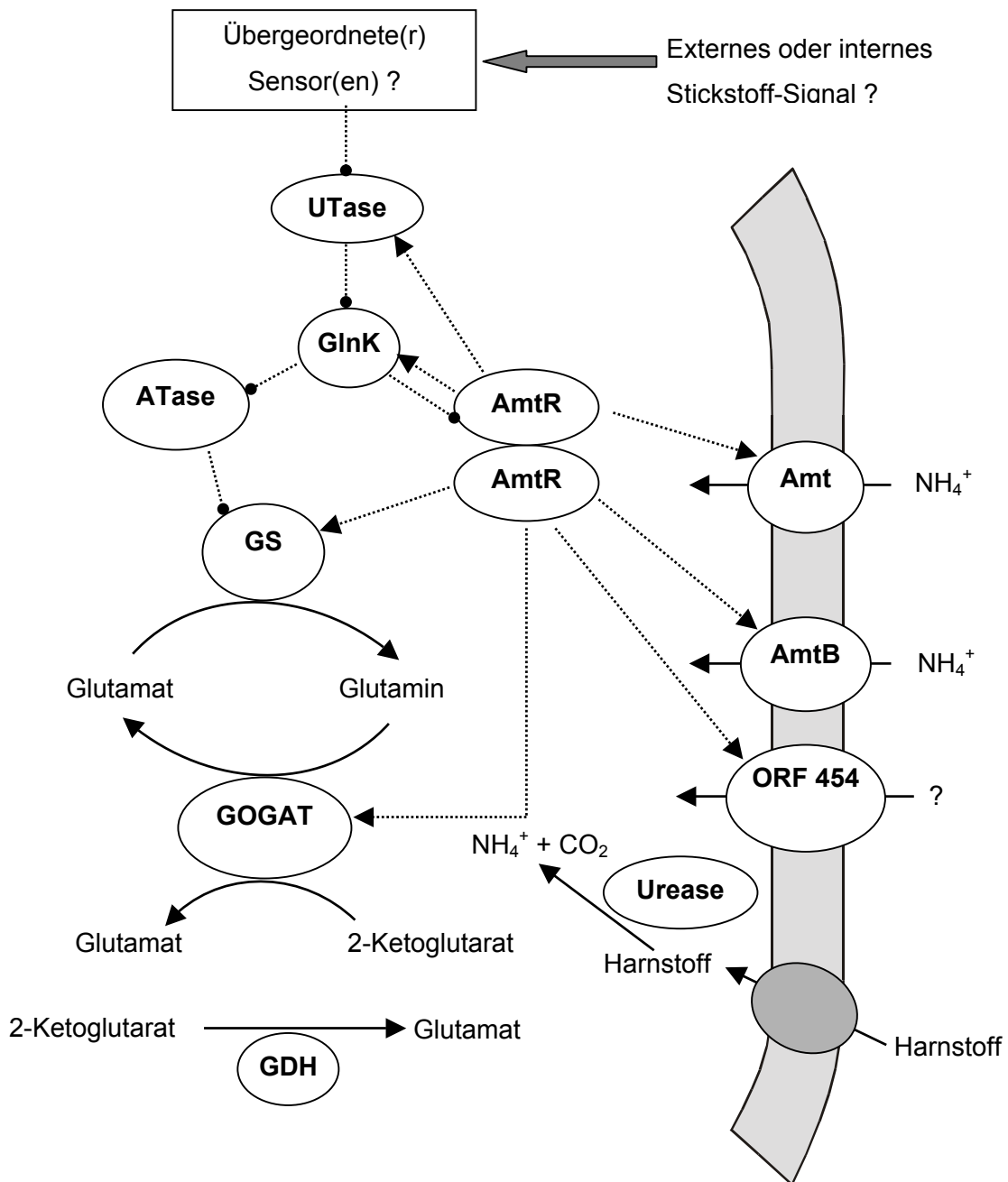


Abb. 2: Modell der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum*. Der globale Regulator der Stickstoff-Kontrolle ist AmtR. Stickstoff-Mangel wird wahrscheinlich von einem oder mehreren übergeordneten Sensor(en) wahrgenommen und über die UTase an GlnK weitergeleitet. Uridylyliertes GlnK modifiziert anschließend die Aktivität der ATase, so dass dieses Enzym die GS I aktivieren kann. Zusätzlich interagiert GlnK wahrscheinlich mit AmtR, was zu einer Derepression AmtR-regulierter Gene unter N-Limitation führt. Demnach findet eine Regulation über Expressionskontrolle sowie über Proteinaktivitätsmodifizierung statt. GDH, Glutamatdehydrogenase; GOGAT, Glutamatsynthase; ORF 454, Membranprotein unbekannter Funktion. Modell nach Lars Nolden (2001c).

globalen Regulator kontrolliert werden, ist noch nicht bekannt und Inhalt aktueller Studien (Gabi Beckers, Uni Köln; pers. Mitteilung).

Neben der bevorzugten Stickstoff-Quelle Ammonium kann *C. glutamicum* weitere Stickstoff-haltige Verbindungen aufnehmen und assimilieren. Während noch keine Aufnahmesysteme für die N-Quellen Allantoin, Arginin und Ornithin identifiziert werden konnten, wurden für Glutamat, welches als Kohlenstoff- und als Stickstoff-Quelle fungiert, zwei spezifische Aufnahmesysteme gefunden. Der von dem *gluABCD*-Operon kodierte ABC-Transporter steht unter Kohlenstoff-Katabolitenrepression; demnach ist die hauptsächliche Funktion dieses Proteins die Aufnahme von Glutamat als Kohlenstoff-Quelle (Krämer & Lambert, 1990, Krämer *et al.*, 1990, Kronemeyer *et al.*, 1995). Eine verstärkte Expressionsinduktion der entsprechenden Gene unter Stickstoff-Limitation wurde bisher nicht detektiert. Neben dem ABC-Transporter verfügt *C. glutamicum* über eine Permease, die bisher nur biochemisch charakterisiert wurde und deren Regulationsmechanismen unbekannt sind (Burkovski *et al.*, 1996, Trötschel *et al.*, 2002). Weiterhin identifizierten Siewe und Mitarbeiter (1995) einen sekundären Transporter für Glutamin, welcher konstitutiv exprimiert wird. Die Stickstoff-Quelle Harnstoff gelangt bei hohen Harnstoff-Konzentrationen durch Diffusion in die Zelle, bei geringen Konzentrationen (< 50 mM) wird Harnstoff über ein spezifisches sekundäres Transportsystem aufgenommen, dessen Gen(e) noch nicht identifiziert wurde(n) (Siewe *et al.*, 1998). Die Harnstoff-spaltende Urease ist in *C. glutamicum* unabhängig von der Stickstoff-Versorgung zwar stets aktiv, unter Stickstoff-Mangel wurde jedoch eine eindeutige Aktivitätszunahme gemessen (Siewe *et al.*, 1998, Nolden *et al.*, 2000). Eine N-abhängige Expressionsinduktion der entsprechenden Urease-Gene wurde jedoch nicht detektiert (Nolden, 2001c).

Die vorgestellten Daten verdeutlichen, dass bereits zahlreiche Gene und Proteine bekannt sind, die in Prozesse der Stickstoff-Assimilation und deren Kontrolle involviert sind und deren Expression und Synthese abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert werden. Ein globales Verständnis des regulatorischen Netzwerks fehlt aber bisher. Erste Untersuchungen zur Proteinsynthese unter Stickstoff-Limitation zeigen eine starke Präsenz glykolytischer Proteine; zusätzlich konnte ein Anstieg der Zellatmung gemessen werden. Diese Beobachtungen wurden mit einem erhöhten Energiebedarf der Zelle unter Stickstoff-Limitation erklärt (Schmid *et al.*, 2000). Die Daten geben Hinweise auf eine gemeinsame Kontrolle des Kohlenstoff- und des Stickstoff-Metabolismus, welcher physiologisch sinnvoll ist, um eine ausreichende Energieversorgung insbesondere während der Energie-verbrauchenden Schritte des Stickstoff-Metabolismus zu gewährleisten. Aus den

geschilderten Gründen ist es wahrscheinlich, dass neben den bereits beschriebenen weitere, bisher unbekannte Gene und Proteine existieren, die abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle exprimiert und synthetisiert werden. Diese können über eine globale Analyse der zellulären Reaktion auf den Stimulus Stickstoff-Limitation detektiert werden. Anhand einer globalen Analyse ist es möglich, sämtliche unter einem definierten Stimulus im Vergleich zur Kontrolle induzierten oder reprimierten Gene zu detektieren und dadurch Stress-spezifische Stimulons zu definieren (Antelmann *et al.*, 1997). Eine globale Analyse der Genexpression kann mit Microarrays durchgeführt werden; für eine globale Analyse der Proteine bietet sich die zweidimensionale Gelelektrophorese an. Beide Methoden sind hoch-sensitive Analysetechniken, mit der tausende von Genen oder Proteinen gleichzeitig untersucht werden können.

Die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) ist die einzige Technik, mit der bis zu 2000 Proteine einer Zelle gleichzeitig getrennt und dargestellt werden können (O'Farrell, 1975, Görg *et al.*, 1995, Görg *et al.*, 2002). Dadurch ist eine Momentaufnahme der unter definierten experimentellen Bedingungen in der Zelle vorhandenen Proteine, des "Proteoms" (Wasinger *et al.*, 1995), möglich. Seit das Genom von *C. glutamicum* vollständig sequenziert wurde und die Sequenz öffentlich zugänglich ist, können zur anschließenden Identifizierung der zweidimensional getrennten Proteine massenspektrometrische Analysen wie MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry*) oder ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*) mit nachfolgender Datenbankanalyse verwendet werden. Diese haben gegenüber der zuvor verwendeten N-terminalen Sequenzierung den Vorteil einer deutlich höheren Sensitivität, so dass Proteinkonzentrationen im femtomolaren Bereich für eine eindeutige Identifizierung ausreichend sind. Mit der Kombination von 2-DE und massenspektrometrischer Analyse konnten bereits umfangreiche Proteomanalysen durchgeführt und dadurch zelluläre Adaptationstrategien an unterschiedliche Stimuli aufgeklärt werden. So zum Beispiel die Stressantwort von *Lactobacillus spec.* auf Säurestress (Lim *et al.*, 2000) und die Antwort von *Bacillus subtilis* auf Stimuli wie Hitzeschock, Glukose-Hunger, Salzstress und Phosphat-Limitation (Hecker & Völker, 2001).

Für die zweidimensionale Proteomanalyse von *C. glutamicum* wurden in den letzten Jahren Protokolle etabliert (Hermann *et al.*, 1998, Hermann *et al.*, 2000, Hermann *et al.*, 2001, Schmid *et al.*, 2000, Schaffer *et al.*, 2001). Diese stellen der 2-DE eine Trennung der zellulären Proteine in physiologisch relevante Fraktionen voran, wodurch anschließend einzelne Sub-Proteome zweidimensional dargestellt werden können. So kann durch Detergenz-Behandlung der intakten Zellen das Sub-Proteom der Zellwand-assoziierten

Proteine gewonnen werden, sowie die Sub-Proteome der cytoplasmatischen Proteine und der Membranproteine durch differentielle Zentrifugationsschritte der aufgeschlossenen Zellen. Die erstellte Sub-Proteomkarte der Zellwand-assoziierten Proteine zeigt zwischen 100 und 200 Proteinspots, das Sub-Proteom der cytoplasmatischen Proteine über 1200 Proteinspots und das Sub-Proteom der Membranfraktion ungefähr 800 Proteinspots. Proteine mit mehr als zwei Transmembranhelices konnten allerdings bisher nicht identifiziert werden (Schaffer *et al.*, 2001), da die zweidimensionale Trennung der hydrophoben Membranproteine selbst mit diversen Detergenzien nur eingeschränkt möglich ist (Santoni *et al.*, 2000). Ebenso fehlen bisher Proteom-Karten der sekretierten ("Sekretom") und der basischen Proteine. Die mit den bereits etablierten Protokollen erstellten Proteom-Karten der drei unterschiedlichen Sub-Proteome von *C. glutamicum* repräsentieren insgesamt mehr als 2000 Proteine. Ausgehend von einer Genomgröße von 3,3 Mbp (Barthe *et al.*, 1996, [www.gib.genes.nig.ac.jp](http://www.gib.genes.nig.ac.jp)), was einer kodierenden Kapazität von etwa 3300 Proteinen (Schaffer *et al.*, 2001) entspricht, repräsentieren die 2000 Proteine mehr als die Hälfte des geschätzten Proteoms; selbst wenn man davon ausgeht, dass die Sub-Proteome zum Teil redundant sind und dass einige Proteine aufgrund posttranslationaler Prozesse mehrere Proteinspots bilden (Hermann *et al.*, 2001). Die hohe Anzahl analysierbarer Proteine verdeutlicht das enorme Potential der 2D-Elektrophorese für eine globale Studie des Proteoms.

Für eine globale Analyse der Genexpression hat sich in den letzten Jahren die Anwendung von Microarrays etabliert. Microarrays, auch DNA-Chips oder Biochips genannt, ermöglichen die "Transcriptomics" genannte gleichzeitige Analyse sämtlicher Gene einer Zelle (Velculescu *et al.*, 1997). Sie bestehen aus einem Trägermaterial, auf dem die einzelnen Gene des Untersuchungsobjekts in Form von PCR-Produkten oder Oligonukleotiden immobilisiert wurden (Lucchini *et al.*, 2001). Mit diesen werden Fluoreszenz-markierte cDNAs hybridisiert, welche durch reverse Transkription von Gesamt-RNA definierter Wachstumsbedingungen hergestellt wurde. Durch das sogenannte *dual fluorescent labeling* ist es möglich, das Transkriptom unter zwei verschiedenen Bedingungen direkt miteinander zu vergleichen; dafür werden die cDNAs mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert und gleichzeitig mit dem Microarray hybridisiert. So können relative Expressionswerte ermittelt werden (Schena *et al.*, 1995). Das Potential von Microarrays liegt in der Möglichkeit, Hinweise auf die Funktion noch nicht charakterisierter Gene geben zu können, da die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die kodierten Proteine von Genen mit ähnlichen Expressionsmustern auch ähnliche zelluläre Funktionen haben (Lucchini *et al.*, 2001). Die Co-Expressionsinduktion eines Gens

unbekannter Funktion mit Genen eines bereits gut charakterisierten Regulons unter einer definierten Wachstumsbedingung deutet also darauf hin, dass das Genprodukt des unbekanntes Gens ebenso eine Funktion für die Adaptation an diese Stressbedingung hat (Hecker & Engelmann, 2000). Gleichzeitig bieten Microarray-Experimente analog zur globalen Proteomanalyse die Möglichkeit, neue und unerwartete Verknüpfungen zwischen Stoffwechselwegen aufzuzeigen. Neben der Grundlagenforschung finden sich Anwendungsmöglichkeiten von Microarrays in der Industrie, wo sie als Sensoren für eine *online*-Prozesskontrolle von Fermentationsprozessen eingesetzt werden können. In der pharmazeutischen Forschung werden Microarrays für Wirkstoff-Screenings und die Diagnose von Nebeneffekten von Pharmazeutika verwendet (Rosamond & Allsop, 2000).

Microarray-basierte Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* wurden kürzlich beschrieben: Loos und Mitarbeiter konstruierten einen Chip mit PCR-Produkten von 52 Genen, deren Genprodukte in den Zentralmetabolismus involviert sind, und analysierten das Transkriptom während Lysin-Produktion (Loos *et al.*, 2001). Weiterhin untersuchte eine japanische Arbeitsgruppe den Acetat-Metabolismus mit einem Chip, der 120 Gene enthielt, deren Genprodukte in den Zentralmetabolismus und die Aminosäure-Biosynthese involviert sind (Hayashi *et al.*, 2002). Einen Microarray, der 2804 annotierte ORFs von *C. glutamicum* repräsentiert, verwendeten Muffler und Mitarbeiter, um ebenfalls den Acetat-Metabolismus zu analysieren. Zusätzlich nutzte diese Arbeitsgruppe einen Chip, auf dem nicht PCR-Produkte bestimmter Gene immobilisiert waren, sondern eine *shotgun*-Bibliothek des Genoms von *C. glutamicum*, für ein Hitzeschock-Experiment (Muffler *et al.*, 2002). Eine genomweite Analyse der 3745 annotierten ORFs von *C. glutamicum* wurde bisher nicht beschrieben.

Die bisherigen Analysen zur Stickstoff-Assimilation und deren Kontrolle zeigten, dass die Aktivität von zwei Proteinen, der Glutamin-Synthetase I und des Signaltransduktionsproteins GlnK, über deren kovalente Modifizierung reguliert wird (Nolden *et al.*, 2001a, Nolden *et al.*, 2001b). Diese Art der Regulation hat den Vorteil, dass die Zelle sehr schnell auf einen Stimulus reagieren kann, wogegen die Neusynthese eines Proteins ein zeitaufwendiger Schritt ist. Die wohl wichtigste posttranslationale Modifizierung von Proteinen ist deren Phosphorylierung (Schlosser *et al.*, 2002). Protein-Kinasen und Phosphatasen, die Phosphatgruppen an Proteine addieren bzw. entfernen, können dadurch Enzymaktivität, Protein-Protein-Interaktionen sowie die Tertiärstruktur regulieren (Chen *et al.*, 2002). Phosphorylierungsprozesse nehmen eine Schlüsselrolle in zellulären Mechanismen der Detektion, der Weiterleitung und der Integration von intra- und extrazellulären Signalen ein (Shi *et al.*, 1998). Wie die Arbeitsgruppe von Séror beschrieb, sind

Signaltransduktionskaskaden, die Phosphorylierungen an Histidin- und Aspartat-Resten beinhalten, bei Bakterien weit verbreitet; doch auch Serin, Threonin und Tyrosin sind wichtige Targets für reversible Phosphorylierungsprozesse; sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten (Obuchowski *et al.*, 2000). Detaillierte Kenntnisse zur Regulation des Stoffwechsels über die Phosphorylierung von Schlüsselenzymen liegen z. B. aus dem Kohlenstoffwechsel vor. Für *C. glutamicum* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Enolase in ihrer phosphorylierten Form die glykolytische Reaktion katalysiert, in ihrer dephosphorylierten Form dagegen die Reaktion der Gluconeogenese (M. Farwick, unveröffentlichte Daten). Ein Beispiel aus der Stickstoff-Kontrolle ist das Zwei-Komponenten-System NtrB/NtrC der Enterobakterien, über welches die Expression von Genen der Stickstoff-Kontrolle positiv reguliert wird (Zimmer *et al.*, 2000). Welche Rolle Phosphorylierungsprozesse während der zellulären Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation spielen, ist bisher nicht bekannt.

### **Zielsetzung dieser Arbeit**

Für *C. glutamicum* wurden bereits einzelne Gene und Proteine charakterisiert, deren Expression und Synthese abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert werden. Ziel dieser Arbeit war die globale Analyse der zellulären Reaktion auf Stickstoff-Limitation und die Detektion weiterer, bisher unbekannter Komponenten des Stickstoff-Stimulons. Dafür wurden spezifisch unter Stickstoff-Limitation auftretende Änderungen im Transkriptom über DNA-Microarrays und Änderungen im Proteom über zweidimensionale Gelelektrophorese detektiert. Im Rahmen der Proteomanalyse sollte zudem eine Methode entwickelt werden, mit der Proteinphosphorylierungen analysiert werden können, da diese oftmals eine zentrale Rolle im zellulären Reaktionsgeschehen spielen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Materialien

Alle im Text erwähnten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht näher bezeichnet, von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), ICN (Aurora, USA), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Roche (Basel), Roth (Karlsruhe), Schleicher & Schell (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Quiagen (Hilden) bezogen. [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>33</sup>P]-Phosphorsäure wurden von Hartmann Analytik, Braunschweig, bezogen. Chemikalien für die 2D-Elektrophorese wurden in der *plus one*-Qualität verwendet. Für massenspektrometrische Analysen wurden möglichst Chemikalien in *HPLC grade*-Qualität eingesetzt.

### 2.2 Zellanzucht und *in vivo*-Markierung

#### 2.2.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden der *C. glutamicum*-Wildtypstamm ATCC 13032 (Abe *et al.*, 1967) und die von ihm abgeleitete  $\Delta$ *glnD*-Deletionsmutante LN-D (Nolden, 2001c) verwendet.

#### 2.2.2 Nährmedien

Als Vollmedium wurde BHI-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) verwendet. Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco) zugesetzt. Als definiertes Minimalmedium wurde das Stickstoff-Überschussmedium CgC bzw. das Stickstoff-freie CgCoN-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993) eingesetzt.

##### CgC-Medium:

42 g MOPS, 20 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g Harnstoff, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH (NaOH) 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 200 µg Biotin, 1 ml Spurensalze, 50 ml 50% (w/v) Glucose.

CgCoN-Medium:

42 g MOPS, 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH (NaOH) 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 10 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 200  $\mu\text{g}$  Biotin, 1 ml Spurensalze, 50 ml 50% (w/v) Glucose.

Spurensalze:

28,5 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 16,5 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 6,4 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 764 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 128 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 44 mg  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 64 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 48 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 50 mg  $\text{SrCl}_2$ , 50 mg  $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 28 mg  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , pH ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1. Die Sterilisation erfolgte durch Filtration.

### 2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Stämme wurden bei 30°C angezogen. Es wurde ein standardisiertes Impfschema verwendet, um möglichst reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten. Hierfür wurden 20 ml BHI-Medium (Difco, Detroit, MI, USA) morgens mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Tag unter Schütteln inkubiert. Nach 8-10 Stunden wurden mit dieser Vorkultur 100 ml CgC-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert, wodurch eine optimale Anpassung der Bakterien an das Minimalmedium erzielt wurde. Mit der  $\text{üN}$ -Kultur wurden 100 ml CgC-Medium auf eine  $\text{OD}_{600}$  0,5-1 angeimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (ca.  $\text{OD}_{600}$  3-6) schüttelnd inkubiert. Zur Induktion der Stickstoff-Limitationsbedingung wurde die Zellkultur geteilt, vorsichtig pelletiert (6 min, 30°C, 4000 rpm), je die Hälfte in vorgewärmtes CgCoN-Medium bzw. CgC-Medium resuspendiert und zwischen 10 min und 4 h inkubiert. Für die Hitzeschock-Experimente wurde die eine Hälfte der Kultur in 50°C warmes Medium resuspendiert und im Wasserbadschüttler bei 50°C für 20-30 min inkubiert. Für anschließende Proteingewinnung wurden die Zellen zur Gänze unter Kühlung auf 4°C geerntet und die Pellet direkt zur Proteingewinnung verwendet oder bei -80°C verwahrt. Für die Gewinnung der RNA wurden je 7,5 ml-Aliquots im selben Volumen halbgefrorenem *Killing Buffer* geerntet und entweder direkt zur RNA-Isolierung verwendet oder bei -80°C verwahrt.

*Killing Buffer:*

20 mM Tris, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{NaN}_3$ , pH (HCl) 7,5.

### 2.2.4 Die *pulse chase*-Markierung

Für die Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin wurden die Zellen wie zuvor beschrieben kultiviert und in vorgewärmtes Medium mit und ohne Stickstoff-Quelle resuspendiert. 10 min nach Beginn der Limitation wurde ein *pulse* von 10 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin (spezifische Aktivität 370 mBq ml<sup>-1</sup>; Hartmann Analytik, Braunschweig) gegeben. Nach einer *in vivo*-Markierung zwischen 30 min und 4 h wurde ein *chase* von 0,1 mM Methionin (Endkonzentration) gegeben und die Zellen für weitere 10 min schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden unter Kühlung auf 4°C geerntet und die Pellets direkt zur Proteingewinnung verwendet oder bei -80°C verwahrt. Die Radioaktivität der Proben wurde durch Szintillationsmessungen mit einem Beckman *Scintillation Counter* LS 6500 bestimmt (Beckman Inc., Fullerton, CA, USA).

### 2.2.5 [<sup>33</sup>P]-Markierung

Für die *in vivo*-Markierung wurde [<sup>33</sup>P]-markierte Phosphorsäure (spezifische Aktivität >111 TBq/mmol) verwendet. Um die spezifische Radioaktivität im Ansatz zu erhöhen, wurde die Phosphatkonzentration des Mediums auf 0,1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> reduziert. Für die Markierung wurden die Zellen wie zuvor beschrieben kultiviert und in jeweils 15 ml vorgewärmtes Phosphat-reduziertes Medium mit und ohne Stickstoff-Quelle resuspendiert. Nach der Zugabe von 8 MBq [<sup>33</sup>P]-Phosphorsäure wurden die Zellen für 45 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Kühlung auf 4°C geerntet und die Pellets nach Möglichkeit nicht eingefroren, sondern direkt zur Proteingewinnung und 2-DE verwendet. Die Radioaktivität der Proben wurde durch Szintillationsmessungen bestimmt.

## 2.3 Protein-Methoden

### 2.3.1 Proteingewinnung

Die Proteinarbeiten erfolgten unter ständiger Kühlung auf 4°C. Die Zellpellets wurden 2 x mit eiskaltem TE-Puffer gewaschen und ad 1 ml in TE-Puffer resuspendiert. Zum Schutz vor Proteinase wurden jeweils 100 µl Protease-Inhibitor *Complete* zugeben. Für die Phosphoproteom-Proben wurden zusätzlich 5 µg/ml DNase I und 100 µM (Endkonzentration) Phosphatase-Inhibitor Natrium-Vanadat zugegeben. Der Zellaufschluss nicht-radioaktiver Zellen erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im *FastPrep*-Gerät (FP120, QBiogene, Heidelberg), wobei die Zellen 3 x 30 s bei 6,5 m/s in Aufschlussgefäßen mit

Glasperlen (Durchmesser 0,2–0,3 mm) geschüttelt wurden. Zwischen den Intervallen wurden die Aufschlussgefäße für 5 min auf Eis gekühlt. [<sup>35</sup>S]- und [<sup>33</sup>P]-markierte Zellen wurden in einem Wasserbad-ummantelten Ultraschallgerät (Haakon K20, Dr. Hielscher GmbH, Teltow) durch 10minütigem Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht-aufgeschlossenen Zellen wurden sedimentiert (Centrifuge 2417R, 13.000 x g, 25 min). Der Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (65.000 x g, 20 min) in Membranfraktion und lösliche (cytoplasmatische) Proteine getrennt. Die Proteinkonzentration wurde mit RotiNanoquant (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zur Herstellung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Die gewonnenen Proteine wurden entweder direkt zur 2D-Elektrophorese verwendet oder als Aliquots à 100 µg Protein bei –20°C verwahrt. Für Analysen des Phosphoproteoms wurden die Proteine nicht eingefroren, sondern direkt weiterverarbeitet.

#### TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA-Na, pH (HCl) 7,5.

### **2.3.2 Gewinnung des Sekretoms**

Das Sekretom einer Zelle beinhaltet die extrazellulären Proteine. Diese wurden basierend auf einer von Steffen Schaffer, FZ Jülich (pers. Mitteilung) entwickelten Methode aus dem Zellüberstand einer *C. glutamicum*-Kultur gewonnen. Dafür wurden Zellen der stationären Wachstumsphase (200 ml gefiltertes CgC-Medium) durch 1 x 10 min, 1 x 30 min Zentrifugation unter Kühlung pelletiert. Die Proteine im Zellüberstand wurden nach Zugabe von Proteinase-Inhibitor mit Hilfe einer Amicon PM 10 Ultrafiltrations-Einheit bei 1-2 Bar, 5°C, in 50 ml-Schritten auf 1 ml eingengt (Porengröße des Filters durchlässig für Proteine kleiner als 10 Da), anschließend in einer Millipore *Ultrafree Centrifugal Filter* bei 4°C auf 500 µl aufkonzentriert, 1 x mit eiskaltem TE-Puffer gewaschen und auf 400 µl eingengt. Die erhaltene Proteinkonzentration betrug 20 µg/µl, was einer Ausgangskonzentration von 40 µg/ml im Überstand entspricht.

### 2.3.3 SDS-PAGE

Proteinproben wurden in 10 oder 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden sie mit kolloidalem Coomassie gefärbt oder für Western Blot-Analysen verwendet.

### 2.3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Die Methode der 2D-Gelelektrophorese erzielt eine Trennung der zuvor denaturierten, gelösten und reduzierten Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien. Zuerst erfolgt eine Isoelektrofokussierung im pH-Gradientengel, bei der jedes Protein an seinem isoelektrischen Punkt fokussiert. Anschließend werden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel nach Molekulargewicht getrennt. In dieser Arbeit erfolgte die isoelektrische Fokussierung in 18 cm IPG-Streifen des pH-Bereichs pH 4-7 (*Immobiline®DryStrips*, Amersham Biosciences). Die Proteine wurden zwecks *in gel application* direkt zu der Rehydratisierungslösung gegeben. Für eine anschließende kolloidale Coomassie-Färbung wurden 100 µg Protein verwendet, für Western Blot-Analysen mit pSer-Antikörpern 300 µg Protein und für anschließende Autoradiographie wurden 300 cpm Protein eingesetzt. Die Proteinprobe wurden ad 350 µl Rehydratisierungslösung resuspendiert und in die sorgfältig gereinigte Kammer pipettiert. Nach Entfernen der Schutzfolie wurde der *DryStrip* mit der Gelseite zuunterst auf die Lösung gelegt, ohne dass Flüssigkeit auf die Rückseite des Strips gelangte. Anschließend wurde mit 1-2 ml Silikonöl (*DryStrip Cover Fluid*, Amersham Biosciences) überschichtet, um ein Auskristallisieren des Harnstoffes zu verhindern; dann wurde die Kammer bedeckt. Die Fokussierung erfolgte bei 20°C in einem *IPGphor™ Isoelectric Focussing System* (Amersham Biosciences) nach folgendem Programm: 6 h 30V, 6 h 60V, 1 h 500V, 1 h 1000V, 1 h 8000V, 9 h 8000V, so dass 68000 Vh erreicht wurden. Die fokussierten Streifen wurden direkt für die zweite Dimension verwendet oder bei -80°C maximal für einen Monat verwahrt.

Die fokussierten Streifen wurden vor der zweiten Dimension zur Reduktion der Proteine 15 min in Äquibrierlösung, die 1% DTT enthielt, inkubiert. Um überschüssiges DTT zu entfernen und die reduzierten Cysteinreste durch Alkylierung zu stabilisieren, wurden die Probenstreifen anschließend 15 min in Äquibrierlösung mit 4% Iodacetamid geschüttelt. Die Streifen wurden kurz auf angefeuchtem Filterpapier getrocknet und nachfolgend auf die vorbereiteten Gele (*ExcelGel Gradient XL 12-14*, Amersham Biosciences) gelegt. Die zweite Dimension lief 1 h bei 20 mA, nach Entnahme der Probenstreifen und Verlegung des Pufferstreifens für weitere 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h bei 40 mA. Nach der Elektrophorese wurden 2D-Gele nicht-

radioaktiver Proben entweder gefärbt (kolloidale Coomassie- oder Silber-Färbung) oder für eine Western Blot-Analyse verwendet. 2D-Gele radioaktiver Proben wurden nach kolloidaler Coomassie-Färbung mit einem *Gel Remover* (Amersham Biosciences) von der Trägerfolie getrennt und auf Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) Vacuum-getrocknet (1 h 60°C). Anschließend wurden sie für 3-30 d mit *ImagingPlates* (FujiFilm, Tokio) exponiert und nachfolgend mit einem BAS 1800 (Raytest, Straubenhardt) bei einer Auflösung von 50 µm gescannt.

#### Rehydratisierungslösung:

6 M Harnstoff (*plus one*-Qualität), 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 0,5% Pharmalyte 3-10, einige Körner Bromphenolblau, ad 6 ml A. bidest; ergibt 10 ml Lösung. Die Lösung wird à 1 ml aliquotiert und kann bei -20°C mindestens 3 Monate verwahrt werden. Vor Gebrauch werden 0,4% DTT dazugeben.

#### Äquilibrierlösung:

50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 134 ml A.bidest; ergibt 400 ml, pH (HCl) 6,8.

### **2.3.5 Kolloidale Coomassie-Färbung**

Eine besonders intensive Färbung konnte durch dreimaliges Färben der Gele mit kolloidalem Coomassie erzielt werden. Die Färbemethode wurde nach Neuhoff (1988) und Angaben von Reiner Westermeier, Amersham Biosciences (pers. Mitteilung) modifiziert.

#### Stocklösung A:

10% w/v Ammoniumsulfat und 2% w/v Phosphorsäure in 100 ml A. bidest lösen.

#### Stocklösung B:

5% Coomassie Brilliant Blue G-250 in A. bidest lösen.

#### Färbelösung:

2 ml Stocklösung B mit 80 ml Stocklösung A mischen; 20 ml Methanol dazufügen. Die Färbelösung nicht filtrieren!

Fixierlösung:

20% Ammoniumsulfat in A. bidest lösen.

Neutralisierungslösung:

0,1 M Tris, pH (Phosphorsäure) 6,5.

Färbeprozedur:

Das Gel wurde kurz in Milli-Q Wasser gewaschen und üN oder einen Tag gefärbt. Danach wurde das Gel für 1 bis 3 min in Neutralisierungslösung inkubiert, anschließend mit 25% Methanol für weniger als 1 min gewaschen. Das Gel wurde üN oder 1 d in Fixierlösung fixiert. Für eine intensivere Färbung wurden die Schritte 1 bis 4 wiederholt.

### **2.3.6 Silberfärbung und Entfärbung**

Die Silberfärbung der 2D-Gele erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1985). Für eine Entfärbung wurden gleiche Mengen Natriumthiosulfat und Kaliumhexacyanoferrat sowie A. bidest auf das Gel gegeben. Beim vorsichtigen Schütteln lösen sich die Reagenzien, das Gel entfärbt sich und wird gelb. Durch Schwenken in A. bidest, welches mehrmals gewechselt wird, wird das Gel langsam farblos und kann anschließend ohne Fixierschritt erneut gefärbt werden.

### **2.3.7 Western Blot-Analysen**

Nach Beendigung der zweiten Dimension wurde das Silikonöl von der Plastikträgerfolie entfernt und die Randbereiche des Gels, in denen keine Proteine fokussieren, entfernt. Auf einer Seite des Gels sollte die Trägerfolie überstehen, um es in den *Gel Remover* (Amersham Biosciences) einspannen zu können. Das Gel wurde mind. 15 min in Anodenpuffer äquilibriert. Auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran (*Immobilion-P*, Porengröße 0,45 µm; Millipore) wurde für 15 s mit Methanol benetzt und anschließend mind. 5 min in Anodenpuffer äquilibriert. Inzwischen wurden sechs zurechtgeschnittene Filterpapiere (Whatman 3 mm-Papier; Schleicher & Schüll, Dassel) mit Anodenpuffer getränkt und luftblasenfrei in die *semi dry*-Blotapparatur (Amersham Biosciences) gelegt. Das 2D-Gel wurde mit Hilfe des *Gel Removers* von der Trägerfolie getrennt, die PVDF-Membran aufgelegt und beides zusammen auf die Filterpapiere plziert, so dass die

Membran unter dem Gel lag. Nun wurde die Trägerfolie vom Gel abgenommen und eventuelle Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt. Obenauf wurden sechs mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere luftblasenfrei plaziert. Der Deckel der Blotapparatur wurde geschlossen und mit ca. 2 kg beschwert. Der Blot erfolgte für 1,5 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Nach dem Blotten wurde die Membran schüttelnd für 2 h bei RT geblockt. Danach wurde die Membran in eine feste Folie gelegt, Antikörper-Lösung zugegeben, die Folie zugeschweißt und üN bei 4°C schüttelnd inkubiert (alternativ 1 h RT). Zur Kontrolle wurde das geblottete Gel Coomassie-gefärbt. Die Antikörper-Konzentration sollte laut Biomol-Angaben 0,1-1 µg betragen. Am folgenden Tag wurde die Membran 4 x 15 min gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre IgM-AK in einer 1:10 000-Verdünnung dazugegeben (10 µl AK in 5 ml Blocking/ 95 ml Waschlösung) und für 30 min bis 1 h schüttelnd bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Membran mit Chemilumineszenz-Lösung 5 min inkubiert (SuperSignal<sup>®</sup> West Pico, Pierce). Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in eine Plastikfolie gelegt und mit Röntgenfilm (Kodak X-OMAT) zwischen 30 s und 5 min exponiert.

#### **2.3.7.1 Anti-Phosphoserin Sampler Kit:**

Der Anti-Phosphoserin Sampler Kit 4608 (Biomol, Hamburg) wurde verwendet. Er enthält fünf IgG-Klone à 25 µg; diese wurden in jeweils 1 ml A. bidest gelöst. Pro Membran wurden 50 ml Antikörper-Lösung benötigt. Hierfür wurden 48,75 ml Blocking mit jeweils 250 µl von jedem Klon versetzt. Diese Lösung konnte mehrfach verwendet werden und war mit 10 mM Na<sub>3</sub>Endkonzentration mind. 1 Monat bei 4°C haltbar.

#### Anodenpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol, ad 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O; pH (HCl) 8,5.

#### Kathodenpuffer:

Anodenpuffer mit 0,1% SDS.

#### 2 x PBS:

274 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ad 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O; pH (HCl) 7,2.



Blocking:

1% BSA (Fraktion V), 1% PVP, 1% PEG 3500, 0,2% Tween 20, gelöst in 2 x PBS.

Waschpuffer:

10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, ad 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O; pH (HCl) 7,4.

Stripping Buffer:

100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris; pH (HCl) 6,7.

## 2.3.8 Proteinidentifizierung

### 2.3.8.1 Identifizierung nach einem *in gel*-Verdau

Sämtliche Lösungen wurden nach Möglichkeit sterilfiltriert oder in höchstem Reinheitsgrad verwendet, um Staubfreiheit zu gewährleisten. Aus 2D-Gelen ausgeschnittene Proteinspots wurden 2 x 5 min und 1 x 30 min mit 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gewaschen. Danach wurden sie durch 2malige Inkubation für 30 min in 50% 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/50% Acetonitril entfärbt. Zum Schrumpfen der Gelstücke wurden 100 µl 100% Acetonitril zugegeben und 5 min inkubiert. Schwach sichtbare Spots wurden zusätzlich reduziert (10 µl 10 mM DTT für 30 min bei 55°C) und alkyliert (10 µl 55 mM Iodacetamid für 30 min bei RT im Dunklen). Anschließend wurden die Gelstücke ca. 30 min Vacuum-getrocknet (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg). Für den tryptischen Verdau wurden 2,5-5 µl einer frisch angesetzten Trypsin-Lösung (10 µg/ml Trypsin, *sequence grade*, Promega, Madison, USA) zugegeben, bis keine weitere Lösung mehr aufgenommen wurde. Dann wurden die Gelstücke mit 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> überschichtet und üN bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand abgenommen und verwahrt. Extraktion der Peptide erfolgte durch Zugabe von 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/50% Acetonitril und Inkubation für 1 h mit 4-5 Ultraschallbehandlungen. Anschließend wurden die Überstände vereinigt und im Eppendorf-Concentrator auf ein Endvolumen von 10 µl eingengt.

### 2.3.8.2 Identifizierung nach einem *in membrane*-Verdau

Zur zweifelsfreien Identifizierung der über Immunfärbung detektierten Proteine sollten diese nach Western-Blot und Detektion direkt aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und ein *in membrane*-Verdau durchgeführt werden. Da für eine solche Methodik keine Literatur vorliegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit aus diversen Quellen (u. a. Schrattenholz, 2001, Cottrell und Sutton, 1996) folgendes Protokoll erstellt: nach der Detektion wurden die PVDF-Membranen 30 min bei 50°C in *Stripping*-Puffer inkubiert, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen 2 x 10 min in A. bidest gewaschen, getrocknet und bei -20°C verwahrt. Für den Verdau wurden die Proteinspots sowie ein Protein-freies Stück zur Kontrolle aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und in Stücke von 1 mm<sup>2</sup> zerteilt. Diese wurden mit 50% Methanol angefeuchtet, dann 30 min mit 50% 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/50% Acetonitril gewaschen, anschließend mit 150 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> überschichtet und wie zuvor beschrieben reduziert und alkyliert. Nach der Vacuum-Trocknung wurden 30 µl einer frisch zubereiteten Trypsin-Lösung zugegeben. Das Enzym wurde in *Digestion Solution* angesetzt, welche neben 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und 10% Methanol 1% Octyl-Glucopyranosid enthielt, um die Ablösung der hydrophoben Peptide von und aus der PVDF-Membran zu erleichtern. Der tryptische Verdau erfolgte üN bei 37°C. Am folgenden Tag wurde der Überstand abgenommen und verwahrt. Die Extraktion der Peptide erfolgte durch Zugabe von 50 µl *Digestion Solution* und Inkubation für 1 h mit 4-5 Ultraschallbehandlungen. Eine zweite Extraktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl 50% Acetonitril/0,1% TFA und Inkubation für 20 min. Anschließend wurden die drei Überstände vereinigt und im Eppendorf-Concentrator auf ein Endvolumen von 10 µl eingengt.

### 2.3.8.3 MALDI-TOF-MS

Für die MALDI-TOF-MS-Analyse (*matrix-assisted laser desorption/ ionisation mass spectrometry*) wurden die Peptide mit Hilfe von *reversed phase* C<sub>18</sub> Pipettenspitzen (ZipTip, Millipore, Bedford, USA) entsalzt und aufkonzentriert. Von diesen Säulen wurden sie mit je 1 µl Matrix (5 mg/ml rekristallisierte α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50% Acetonitril/0,1% TFA) eluiert und direkt auf das gründlich mit 1%iger TFA gereinigte MALDI-Target appliziert. MS-Spektren wurden nach einem Protokoll von Schaffer *et al.* (2001) mit einem Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) aufgenommen. Pro Peptidprobe wurden mindestens drei Spektren à 100 Laserimpulsen akkumuliert.

#### 2.3.8.4 Datenbanksuche

Die monoisotopischen Massen eines Peptid-Fingerprints wurden für eine Datenbanksuche mit der Genomsequenz von *C. glutamicum* verwendet. Diese erfolgte mit der GPMW Software, Version 4,0 (Lighthouse Data, Odense, Dänemark). Die Suchparameter wurden wie folgt festgelegt: tryptischer Verdau mit maximal einer nicht-gefundenen Schnittstelle, Carbamidomethylierung von Cystein, mögliche Oxidation von Methionin und mögliche Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin. Die Massenabweichung durfte maximal 100 ppm betragen.

#### 2.3.8.5 Phosphatase-Behandlung der tryptischen Verdaue

Ein direkter Beweis dafür, dass ein identifiziertes Protein ein Phosphoprotein ist, ist der Nachweis des phosphorylierten Peptids. Hierfür wurden von Larsen *et al.* (2001) eine Methode des Spektrenvergleichs vor und nach einer Phosphatase-Behandlung der tryptischen Verdaue beschrieben, bei der die Dephosphorylierung des Peptidgemisches direkt auf dem MALDI-Target stattfindet. Dafür wurden in dieser Arbeit die tryptisch verdauten Proteinssots über Zip-Tip-Säulen gereinigt und aufkonzentriert, mit jeweils 1 µl Matrix (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-Zimtsäure in Acetonitril/ 0,1% TFA) direkt auf das MALDI-Target eluiert und die MALDI-TOF-MS-Analysen durchgeführt. Nach der MALDI-Analyse wurden die Peptid-Matrix-Gemische durch Zugabe von je 1,5 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , in denen 0,05 U/µl alkalische Phosphatase enthalten waren, gelöst, wodurch anschließend die Dephosphorylierung für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C stattfinden konnte. Zum Rekrystallisieren der Matrix wurden die dephosphorylierten Gemische durch Zugabe von je 0,5 µl 5%iger TFA angesäuert und direkt vor der MALDI-Analyse vorsichtig mit je 10 µl 0,1%iger TFA gewaschen.

## 2.4 RNA-Methoden

Alle RNA-Arbeiten wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt und es wurden durchgehend Handschuhe getragen. Arbeitsmaterialien und Lösungen wurden, soweit möglich, zur Eliminierung von RNase-Kontaminationen für 40 min bei 121°C autoklaviert.

### 2.4.1 RNA-Gewinnung

Für die Transkriptomanalysen nach Stickstoff-Limitation wurde eine exponentiell wachsende Bakterienkultur bei einer  $OD_{600}$  von 4 vorsichtig pelletiert und je die Hälfte in frisches CgC- bzw. CgCoN-Medium resuspendiert. Von der CgCoN-Kultur wurden nach 10 min, 30 min bzw. 4 h mehrere 7,5 ml-Aliquots in dem selben Volumen halb-gefrorenem *Killing*-Puffer pelletiert, durch dessen zugesetztes Natrium-Azid die Zellatmung gestoppt wird. Für die Transkriptomanalysen nach Hitzeschock wurde eine exponentiell wachsende Bakterienkultur bei einer  $OD_{600}$  von 4 vorsichtig pelletiert und in 50°C heißes Medium resuspendiert. Nach siebenminütigem Hitzeschock wurden Aliquots wie beschrieben entnommen. Die Aliquots wurden unter Kühlung pelletiert, die Zellpellets in Flüssigstickstoff schockgefroren, direkt weiterverwendet oder bei -80°C verwahrt. Die mRNA von Prokaryoten hat im Gegensatz zu Eukaryoten keine polyA-Tails, über die eine Aufreinigung möglich wäre. Deshalb erfolgte eine Präparation der Gesamt-RNA, wofür der *Fast RNA Kit Blue* (Bio 101 Inc., Carlsbad, USA) verwendet wurde, welcher auf einer Phenol/Chloroform-Extraktion der RNA beruht. Der Zellaufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im *FastPrep*-Gerät (FP120, QBiogene, Heidelberg), wobei die Zellen 2 x 30 s bei 6,5 m/s in Phenol/Chloroform-enthaltenden Aufschlussgefäßen mit Glasperlen (Durchmesser 0,2–0,3 mm) geschüttelt wurden. Zwischen den Intervallen wurden die Aufschlussgefäße für 5 min auf Eis gekühlt. Die weitere Präparation erfolgte nach Angaben des Kit-Herstellers. Die isolierte RNA wurde 2 x mit jeweils 10 Units DNase I (Amersham Biosciences) pro 100 µg Nukleinsäure 20 min bei 37°C inkubiert, um Kontamination mit chromosomaler DNA zu entfernen. Anhand einer Kontroll-PCR wurde überprüft, ob die RNA nach zweifacher DNase I-Behandlung DNA-frei war. Durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese wurde die Qualität der RNA hinsichtlich etwaiger Degradation überprüft.

### 2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Überprüfung, ob die RNA-Präparationen nicht mit chromosomaler DNA kontaminiert war, wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Es wurde der Mastermix von Quiagen (Hilden) verwendet, welcher Polymerase, einen entsprechenden Puffer und Nukleotidmix enthält. Die Primer wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Es wurden Primer gewählt, mit denen kleine Fragmente generiert werden konnten und die unter Standardbedingungen sehr gut funktionierten. Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden zusammenpipettiert:

10 µl Mastermix

je 1 µl Primer

2,5 µl *template* (RNA oder Zellen)

Wasser ad 20 µl.

Als *template* der Positiv-Kontrolle diente eine 10 min bei 95°C gekochte Suspension von *C. glutamicum*-Zellen in Wasser. Die PCR wurde in Thermocyclern (Modell 9700, Perkin-Elmer, Weiterstadt oder Mastercycler® gradient, Eppendorff GmbH, Hamburg) durchgeführt. Das Standard-Amplifikationsprogramm umfasste folgende Schritte:

2 min Initialdenaturierung bei 94°C, anschließend 30 Zyklen (30 s 94°C, 30 s *annealing*-Temperatur der Primer, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments bei 72°C), anschließend 10 min bei 72°C, zum Schluss wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

### 2.4.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der erfolgreichen Präparation und um eine etwaige Degradation der RNA auszuschließen, wurde eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden Agarose-Gel durchgeführt. Hierfür wurde 1 g Agarose in 74 ml Wasser gelöst, mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer versetzt und 16 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung zugegeben. Nach Erstarren des Gels wurden 2,5 µl der RNA mit 20 µl Gelladepuffer vermischt, 10 min auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt, als Puffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet.

10 x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH (NaOH) 7,0.

Gelladepuffer:

250 µl 100% Formamid, deionisiert, 83 µl 37% Formaldehyd, 50 µl 10X MOPS-Puffer, 10 µl 2,5% Bromphenolblau, 50 µl 100% Glycerin, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml), ad 500 µl RNase-freies Wasser.

20 x SSC:

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

**2.4.4 Markierung der RNA**

DNA-freie, nicht abgebaute RNA wurde in cDNA umgeschrieben und durch gleichzeitigen Einbau von Fluoreszenz-markierten dUTPs markiert. Es wurden Zweifarb-Experimente unter kompetitiver Hybridisierung durchgeführt, d. h. die cDNA der Kontrollbedingung hybridisierte gleichzeitig mit der cDNA der Stressbedingung auf dem Chip. Dafür wurden beide RNAs mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, namentlich FluoroLink Cy5-dUTP bzw. Cy3-dUTP (Amersham Biosciences). Für die Markierung wurden jeweils 50 µg RNA auf 20 µl im Eppendorf Vacuum-Konzentrator eingengt. Hierzu wurden jeweils 10 µl Random-Primer (1 µg/µl, 50:50 aus Hexamer und Oktamer) gegeben. Die Nukleinsäuren wurden 10 min bei 70°C denaturiert und dann auf Eiswasser abgekühlt. Anschließend wurden 3 µl Cy5-dUTP bzw. Cy3-dUTP sowie 18 µl eines zuvor hergestellten Enzym-Nukleotid-Mix zugegeben.

Enzym-Nukleotid-Mix:

1 µl Nukleotidmix (25 mM dATP, dCTP, dGTP, 5 mM dTTP), 10 µl 5 x Erststrangpuffer (Gibco), 5 µl 100 mM DTT, 2 µl Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/µl, Gibco).

Das Gemisch aus RNA, Primer und Enzym-Nukleotid-Mix wurde 10 min bei RT, anschließend 110 min bei 42°C inkubiert, wobei die reverse Transkription stattfand. Danach wurden 2,5 µl 20 mM EDTA sowie 2,5 µl 500 mM NaOH zugegeben und das Gemisch wurde 10 min bei 70°C inkubiert. Eine Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl 500 mM HCl. Die synthetisierten cDNAs wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits aufgereinigt

(*NucleoSpin*-Säulen, Clontech, oder *High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche). Die eluierten cDNAs wurden mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol und 1/10 Volumen NaOAc 1 h oder üN bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt.

#### **2.4.5 Hybridisierung und Auswertung**

Die gefällten cDNAs wurden 20 min bei 14.000 x g pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 12  $\mu\text{l}$  RNA-freiem A. bidest aufgenommen. Anschließend wurden die Cy5- und Cy3-markierten cDNAs der beiden Bedingungen, welche gemeinsam hybridisieren sollten, vereinigt. Nach Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Heringssperma (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde das Gemisch 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 55  $\mu\text{l}$   $50^{\circ}\text{C}$  warmer Hybridisierungslösung (Clontech) gemischt. Hiervon wurden 65  $\mu\text{l}$  luftblasenfrei auf einem Microarray pipettiert, ein staubfreies Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum (Marabuwerke GmbH, Tamm) luftdicht abgeschlossen. Die Hybridisierung erfolgte üN (ca. 16 h) im *Vysis Hybrite* (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) bei  $50^{\circ}\text{C}$ . Nach der Hybridisierung wurde das Fixogum entfernt und die Microarrays 5 min in 2 x SSC, 0,5% SDS gewässert, um das Ablösen der Deckgläschen zu erleichtern. Anschließend wurden die Microarrays jeweils 10 min gewaschen in 2 x SSC, 0,2% SDS; 1 x SSC, 0,1% SDS; 1 x SSC, 0,1% SDS; 0,5 x SSC. Nach sehr kurzem Waschen in 0,05 x SSC sowie A. bidest wurden die Microarrays mit  $\text{N}_2$  trockengeblasen. Das Scannen beider Farbkanäle der Microarrays erfolgte mit einem *GS/Lumonics ScanArray 4000*. Die erhaltenen Bilder wurden mit Hilfe der *QuantArray* Software (Packard BioScience, CT, USA) übereinandergelegt. Zur grafischen Darstellung und weiterer Analyse wurde die Software *GeneSpring 3.2.12* (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) verwendet.

### 3 Ergebnisse

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation über RNA-Analysen und biochemische Methoden untersucht. Dabei konnten einzelne Komponenten des Stickstoff-Metabolismus und seiner Kontrolle detektiert werden (Jakoby *et al.*, 1999, Nolden *et al.*, 2001a). Aufbauend auf diesen Daten war ein Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, über einen globalen Ansatz weitere Proteine zu detektieren, deren Menge abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert wird.

#### 3.1 Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese, kurz 2-DE, ermöglicht es, einen Großteil der zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorhandenen Proteine darzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zweidimensional getrennten Proteilmuster von Zellen unter Stickstoff-Limitation und unter Stickstoff-Überschuss verglichen, um diejenigen Proteine zu detektieren, die abhängig vom Stickstoff-Status der Zelle vorhanden werden.

Zunächst wurde die von Thomas Hermann etablierte Methode zur 2-DE modifiziert (Hermann *et al.*, 1998). Der Zellaufschluss erfolgte statt durch *French Press*-Aufschluss in großen Volumina nun durch Ultraschallbehandlung von 1 ml Aliquots. Durch die kleineren Volumina des Aufschlusses konnte der Aceton-Fällungsschritt vermieden werden, wodurch die Löslichkeit der gewonnenen Proteine verbessert wurde und daher vor allem im Bereich pH 6,5-7 mehr Proteinspots detektiert werden konnten. Diese Optimierung hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Probengewinnung schneller und schonender verlief, wodurch die Reproduzierbarkeit stieg und die Proteine weitgehend vor Degradation geschützt waren (nicht gezeigt).

Um Proteine im 2D-Gel darstellen zu können, müssen ihre Größen und isoelektrischen Punkte (IEP) innerhalb des analysierten Bereiches liegen. Das wurde für die bisher bekannten N-abhängigen Proteine wie die Membranproteine Amt und AmtB sowie die cytoplasmatischen Proteine UTase, GS I, GlnK, ATase sowie die drei Untereinheiten der Urease UreA, UreB und UreC und des Urease-akzessorischen Proteins UreE überprüft, indem deren Aminosäure-Sequenzen mit der WWW-zugänglichen ExPasy-Software (*Compute pI/Mw tool*) analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass diese Proteine innerhalb des in dieser Arbeit analysierten Bereiches von pH 4-7 und 5-100 kDa liegen (Tab. 1), außer der 116,4 kDa großen ATase. Abgesehen von den in dieser Arbeit nicht analysierten



Membranproteinen Amt und AmtB, müssten die bisher bekannten Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle somit über die zweidimensionale Gelelektrophorese im Proteom Stickstoff-gehungerter Zellen detektierbar sein.

Tab. 1: Größe (kDa), isoelektrischer Punkt (IEP) und Lokalisation der bisher bekannten Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle. Es ist zu sehen, dass abgesehen von der ATase die Größen und isoelektrischen Punkte der Proteine in dem in dieser Arbeit über 2-DE analysierten Bereich von pH 4-7 sowie 5-100 kDa liegen.

| Protein                         | ORF <sup>a</sup> | Gen         | kDa   | IEP  | Lokalisation |
|---------------------------------|------------------|-------------|-------|------|--------------|
| Ammoniumtransporter (Amt)       | 2480             | <i>amt</i>  | 47,7  | 5,51 | Membran      |
| Ammoniumtransporter (AmtB)      | 2176             | <i>amtB</i> | 45,4  | 5,13 | Membran      |
| Uridyltransferase (UTase)       | 2173             | <i>glnD</i> | 76,0  | 6,67 | Cytoplasma   |
| Glutamin-Synthetase I (GS I)    | 3236             | <i>glnA</i> | 53,2  | 4,90 | Cytoplasma   |
| Signaltransduktionsprotein GlnK | 2175             | <i>glnK</i> | 12,1  | 5,01 | Cytoplasma   |
| Adenylyltransferase (ATase)     | 3222             | <i>glnE</i> | 116,4 | 5,94 | Cytoplasma   |
| Urease ( $\gamma$ -UE)          | 466              | <i>ureA</i> | 11,1  | 5,29 | Cytoplasma   |
| Urease ( $\beta$ -UE)           | 467              | <i>ureB</i> | 17,6  | 4,48 | Cytoplasma   |
| Urease ( $\alpha$ -UE)          | 468              | <i>ureC</i> | 61,4  | 5,14 | Cytoplasma   |
| Urease (akzessorisches Protein) | 469              | <i>ureE</i> | 17,5  | 5,35 | Cytoplasma   |

<sup>a</sup> ORF-Bezeichnung nach der Biomax-Genomannotation (Degussa-AG)

### 3.1.1 Silbergefärbte 2D-Gele

Durch Experimente auf RNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass die Expression von Genen des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle nach 30 minütigem Wachstum in N-freiem Medium stark induziert ist (Nolden *et al.*, 2001c). Um diese N-abhängigen Proteine zu detektieren, wurden daher exponentiell wachsende Zellen aus CgC-Medium bei einer OD<sub>600</sub> von 4 in das Stickstoff-freie CgCoN-Medium umgesetzt und zwischen 30 min und 4 h gehungert. Danach wurden die Zellen auf Eis geerntet, die cytoplasmatischen Proteine gewonnen, zweidimensional zwischen pH 4-7 und 5-100 kDa getrennt und zur Detektion Silber-gefärbt. Unerwarteterweise wies das Proteinmuster von Stickstoff-gehungenerten Zellen keine deutlichen Unterschiede zur Kontrolle auf; weder nach 30minütiger noch nach vier

stündiger Limitation. Unter anderem (s. Diskussion) wurde vermutet, dass die für Stickstoff-Mangelbedingungen charakteristischen Proteine in so geringen Konzentrationen in der Zelle vorliegen, dass sie mit der Silber-Färbemethode nicht detektierbar sind. Um diese gering abundanten Proteine der N-Kontrolle sichtbar zu machen, wurde daher im folgenden die Methode der radioaktiven *pulse chase*-Markierung angewandt. Diese Methode ist zum einen sensitiver, zum anderen werden durch sie nur die neu synthetisierten Proteine detektiert.

### 3.1.2 Die *pulse chase*-Markierung

Für eine *pulse chase*-Markierung wird direkt nach Einsetzen des Stresses [<sup>35</sup>S]-markiertes Methionin zu den Zellen gegeben. Diese seltene und energetisch aufwendig zu synthetisierende Aminosäure wird gut von den Zellen aufgenommen und als Startaminosäure in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Dadurch sind nur diejenigen Proteine, die ab dem Zeitpunkt der Zugabe synthetisiert werden, radioaktiv markiert und können durch Autoradiographie detektiert werden.

In dieser Arbeit wurden Zellen wie zuvor beschrieben in dem N-freien CgCoN-Medium resuspendiert, [<sup>35</sup>S]-markiertes Methionin wurde zugegeben und die Zellen wurden für 30 Minuten inkubiert. Nach Probengewinnung, 2-DE und Autoradiographie wurde das Proteinmuster N-gehungerter Zellen mit der N-Überschusskontrolle verglichen. Auch mit dieser sensitiven Methode waren nur geringe Unterschiede in den Proteinmustern sichtbar. Diejenigen Proteinspots, die in mindestens drei voneinander unabhängig angefertigten Gelen einer deutlichen Regulation unterlagen, wurden aus Gelen ausgeschnitten und über MALDI-TOF-MS (2.3.8) identifiziert. Drei Proteine wurden unter N-Limitation neu oder verstärkt synthetisiert, zwei Proteine wurden vermindert synthetisiert. Bei den drei Proteinen handelte es sich um Thioredoxin, Tetrahydrodipicolinat-Succinylase DapD (Gelausschnitt nicht gezeigt) und ein Protein ohne Datenbankeintrag (Abb. 3, Tab. 2). Das eine vermindert synthetisierte Protein wurde als das L12-Protein der ribosomalen 50S-Untereinheit identifiziert. Das zweite vermindert synthetisierte Protein wurde als die Homocystein-Synthase CysD identifiziert (Gelausschnitt nicht gezeigt).

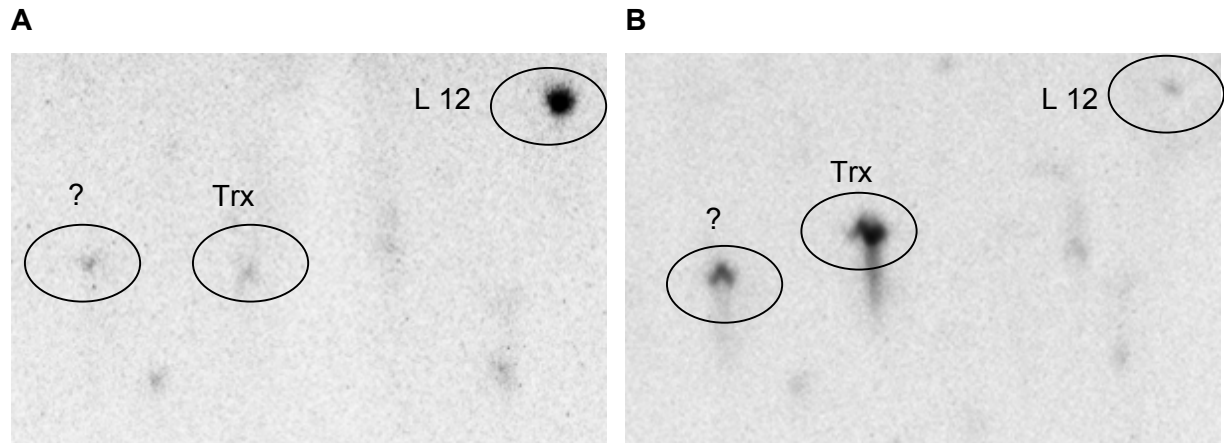


Abb. 3: Ausschnitt aus zwei 2D-Gelen im Bereich pH 4,7-5 und ca. 10 kDa. Dargestellt ist das [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierte Proteinmuster von Zellen unter N-Überschuss (A) und nach 30 minütigem Wachstum in N-freiem Medium (B). Unter N-Hunger war eine verstärkte Proteinkonzentration von Thioredoxin (Trx) und eines Proteins ohne Datenbankeintrag (?) zu sehen. Dagegen war das L12-Protein der ribosomalen 50S-Untereinheit (L12) unter N-Hunger stark vermindert vorhanden.

Tab. 2: Proteine, die in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung im Proteom detektiert wurden.

| Gen         | Protein                           | Proteinkonzentration unter N-Limitation | Funktion des Proteins    |
|-------------|-----------------------------------|---|--------------------------|
| <i>trx</i>  | Thioredoxin                       | verstärkt                               | generelles Stressprotein |
| -           | Protein o. Datenbankeintrag       | verstärkt                               | unbekannt                |
| <i>dapD</i> | Tetrahydrodipicolinat-Succinylase | verstärkt                               | Diaminopimelat-Synthese  |
| <i>rplL</i> | L12-Protein (50S-UE)              | vermindert                              | Proteinsynthese          |
| <i>cysD</i> | Homocystein-Synthase              | vermindert                              | Cystein-Biosynthese      |

### 3.1.3 Proteinmuster der Mutante $\Delta glnD$

Ein essentieller Bestandteil der Stickstoff-Kontrolle ist die Uridylyltransferase UTase, kodiert durch *glnD*. Die von Lars Nolden konstruierte  $\Delta glnD$ -Deletionsmutante LN-D zeigt unter N-Limitation einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp: es findet keine verstärkte Transkription der bereits bekannten N-abhängigen Gene *amt*, *amtB*, *gltB* und *glnK* statt, und die Transkription von *glnA* ist vermindert. Diese Deregulation sollte auch im 2D-getrennten Proteinmuster sichtbar sein, d. h. das Proteinmuster der N-gehungenen Deletionsmutante müsste dem des Wildtyps unter N-Überschuss entsprechen. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden jeweils drei unabhängige Gele [ $^{35}$ S]-Methionin-markierter Proteine von der  $\Delta glnD$ -Deletionsmutante unter N-Überschuss sowie nach 30 minütiger N-Limitation angefertigt und diese mit 2D-Gelen des Wildtyps verglichen. Dabei zeigte sich, dass die fünf Proteine (s. Abb. 3, Tab. 2), die im Wildtyp einer N-abhängigen Kontrolle unterlagen, in der  $\Delta glnD$ -Mutante nicht mehr derartig reguliert wurden. In diesen Gelbereichen sah das Proteinmuster der  $\Delta glnD$ -Mutante sowohl unter N-Überschuss als auch nach 30 minütiger N-Limitation aus wie das des Wildtyps unter N-Überschuss (Abb. 4, s. Nolden *et al.*, 2001b).

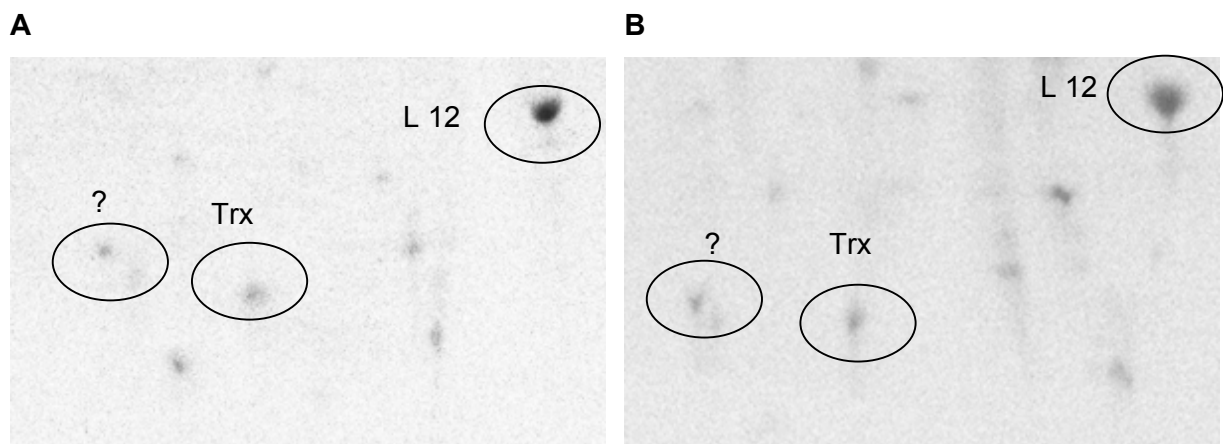


Abb. 4: Ausschnitt aus zwei 2D-Gelen im Bereich pI 4,7-5 und ca. 10 kDa. Dargestellt ist das [ $^{35}$ S]-Methionin-markierte Proteinmuster der  $\Delta glnD$ -Mutante unter N-Überschuss (A) und nach 30 minütigem Wachstum in N-freiem Medium (B). Das Proteinmuster der Mutante glich auch unter N-Hunger dem des Wildtyps unter N-Überschuss (s. Abb. 3).

### 3.2 Wachstum mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen

Die bisherigen Arbeiten hatten gezeigt, dass *C. glutamicum* nur geringfügig auf Stickstoff-Limitation reagiert. *C. glutamicum*-Zellen, die in das Stickstoff-freie CgCoN-Medium umgesetzt wurden, wuchsen mit annähernd gleichen Wachstumsraten wie Zellen in CgC-Medium, bis sie nach 2-3 Verdopplungen das Wachstum einstellten. Auf Proteomebene waren nur wenige Änderungen im Proteinmuster N-gehungerner Zellen detektierbar. Unter anderem (s. Diskussion) wäre eine Erklärung hierfür, dass die Versuchsbedingungen der N-Limitation nicht optimal waren. Statt der Kultivierung in absolut Stickstoff-freiem Medium wurden daher geringe Anteile der N-Quelle Ammonium zugesetzt, um dadurch ein längeres Wachstum unter Stickstoff-Mangelbedingungen zu erzielen. Um eine Ammoniumkonzentration zu ermitteln, die langsames Zellwachstum bei gleichzeitiger Limitation ermöglicht, wurden dem N-freiem Medium verschiedene Ammoniummengen zugesetzt und Wachstumsversuche durchgeführt. Die jeweils auf eine OD<sub>600</sub> von 3 überimpften Zellen zeigten unter den verschiedenen Konzentrationen über den analysierten Zeitraum von vier Stunden nahezu identisches Wachstum (nicht gezeigt).

Das bedeutet, dass die unterschiedlichen Ammoniumkonzentrationen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen im Untersuchungszeitraum haben. Offenbar registrieren die Zellen zwar den Stickstoff-Mangel (vgl. RNA-Arbeiten), sind aber noch zu 2-3 Verdopplungen fähig, während derer sie ihre internen N-Quellen aufbrauchen. Um fortgesetztes Wachstum unter Stickstoff-Mangel zu erzielen, müsste *C. glutamicum* nicht im Schüttelkolben, sondern unter kontinuierlichen N-limitierten Fermentationsbedingungen kultiviert werden (s. Diskussion).

### 3.3 Das Sekretom von *C. glutamicum*

Das Sekretom eines Mikroorganismus umfasst sämtliche Proteine, die in das Medium sezerniert werden. Für die eng mit *C. glutamicum* verwandte Art *Mycobacterium tuberculosis* wurde von Harth *et al.* (1994) neben der Exkretion mehrerer Substratbindepoteine von ABC-Transportern auch die Sekretion der Glutamin-Synthetase I (GS I) als Pathogenitätsfaktor beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, welchen quantitativen Umfang das Sekretom von *C. glutamicum* einnimmt. Nachfolgend wurden die sekretierten Proteine gewonnen und zweidimensional getrennt, wodurch das Sub-Proteom des

Sekretoms dargestellt werden konnte. Anschließend wurde untersucht, ob auch *C. glutamicum* die GS I in das umgebende Medium sezerniert.

In einem entsprechenden Versuchsansatz wurden parallel zum Wachstum über einen Zeitraum von 10 Stunden Proben genommen, mit dem Protease-Inhibitor PMSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt und die Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand bestimmt. Es wurde beobachtet, dass die Menge extrazellulärer Proteine proportional zum Zellwachstum konstant stieg (Abb. 5; siehe auch Hermann *et al.*, 2001).

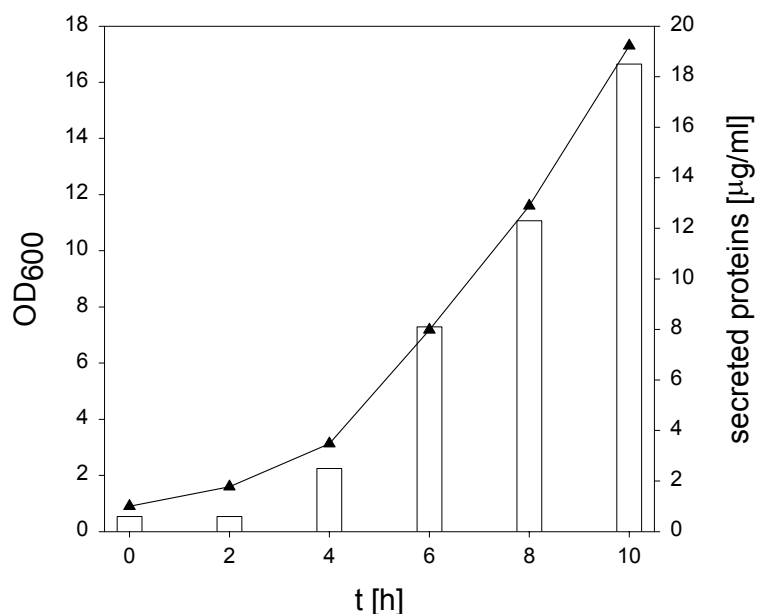


Abb. 5: Zellwachstum und Sekretom über einen Zeitraum von 10 Stunden. Die Dreiecke stellen das Zellwachstum in OD<sub>600</sub> dar, die Balken die Proteinkonzentration im Zellüberstand, dem Sekretom, in µg/ml.

Für eine genauere Analyse des Sekretoms wurden die Proteine, die sich in der stationären Wachstumsphase im Überstand befanden, durch mehrfache Zentrifugationsschritte und nachfolgender Ultrafiltration gewonnen (2.3.2). Von den erhaltenen Sekretom-Proben wurden 2D-Gele angefertigt. Durch Silberfärbung konnten mehr als 40 Proteine dieses Sub-Proteoms dargestellt werden (nicht gezeigt). Schaffer und Mitarbeiter identifizierten 12 dieser Proteine (Hermann *et al.*, 2001), deren Funktionen bisher nicht näher charakterisiert wurden.

### 3.3.1 Detektion der Glutamin-Synthetase I im Sekretom

Die Proteine der Sekretom-Fraktion wurden über SDS-PAGE getrennt. Durch nachfolgende Western Blot-Analysen wurde überprüft, ob die Sekretom-Präparation frei von zellulären Proteinkontaminationen war. Anschließend wurde untersucht, ob *C. glutamicum*, ebenso wie *M. tuberculosis*, die Glutamin-Synthetase I (GS I) ins Medium sezerniert. Als Kontrolle wurde jeweils Zellextrakt von Ultraschall-behandelten Zellen verwendet. Zur Überprüfung, ob die Sekretom-Präparation frei von zellulären Proteinkontaminationen war, wurde ein Antikörper gegen das corynebakterielle Glutamat-Bindeprotein Glu-BP eingesetzt. Dieses Membran-assoziierte Protein konnte im Zellextrakt, nicht aber in der Sekretom-Fraktion detektiert werden. Dadurch wurde gezeigt, dass die Sekretom-Präparation nicht mit zellulären Bestandteilen lysierter Zellen kontaminiert war. Für die Analyse der Glutamin-Synthetase I lag durch die Arbeiten von Jana Meier-Wagner (Meier-Wagner, 2000) ein GS I-spezifischer polyklonaler Antikörper vor. Die Western Blot-Analyse mit diesem Antikörper ergab, dass die Glutamin-Synthetase I sowohl intrazellulär im Zellextrakt als auch im extrazellulären Sekretom vorhanden war (Abb. 6). Im Zellextrakt trat die GS I in einer einzelnen Bande der erwarteten Größe um 60 kDa auf. Im Sekretom war neben der 60 kDa-Bande eine zweite, kleinere Bande bei ca. 45 kDa detektierbar. Diese ist vermutlich auf einen proteolytischen Abbau des Enzyms zurückzuführen. Demnach gibt *C. glutamicum* ebenso wie *M. tuberculosis* die Glutamin-Synthetase I ins Medium ab.

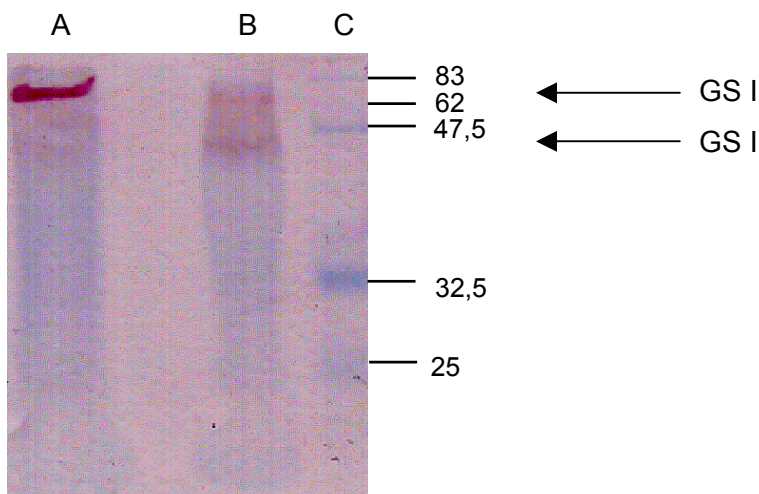


Abb. 6: Western Blot-Analyse zur Detektion der Glutamin-Synthetase I (GS I) im Sekretom. Über SDS-PAGE wurden Zellextrakt (Spur A), Sekretompräparation (Spur B) und Größenstandard (Spur C; 7708, New England Biolabs) getrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit einem GS I-spezifischen Antikörper analysiert. Während die GS I im Zellextrakt in einer einzelnen Bande der erwarteten Größe um 60 kDa detektiert wurde, konnte in der Sekretom-Fraktion eine zusätzliche, kleinere Bande von ca. 45 kDa detektiert werden.

### 3.4 Hitzeschock der Zellen

Auf Stickstoff-Limitation reagierte *C. glutamicum* nur mit geringen Änderungen im Proteinmuster. Daher stellte sich die Frage, ob der Stimulus N-Limitation für *C. glutamicum* einen generellen Stress darstellt. Diese Vermutung wurde überprüft, indem die Reaktion von *C. glutamicum* auf die Stressbedingung eines Hitzeschocks untersucht wurde. Die Hitzeschock-Antwort gilt als Modellsystem für die Analyse globaler Änderungen der Genexpression (Stewart *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Hitzeschocks auf das Wachstum (3.4.1), auf das 2D-getrennte Proteom (3.4.2) und auf das Transkriptom (3.6.3) untersucht. Analog zu Muffler *et al.* (2002) wurde für den Hitzeschock eine Temperatur von 50°C gewählt.

#### 3.4.1 Wachstum unter Hitzeschock

##### 3.4.1.1 Wachstumskurve unter Hitzeschock

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten unter Hitzeschock untersucht. Dafür wurden exponentiell wachsende Zellen in 50°C heißes Medium umgesetzt und im Wasserbadschüttler inkubiert. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten verfolgt. Dabei zeigte sich, dass *C. glutamicum* bereits wenige Minuten nach Einsetzen des Hitzeschocks mit stagnierendem Wachstum reagierte (Abb. 7).

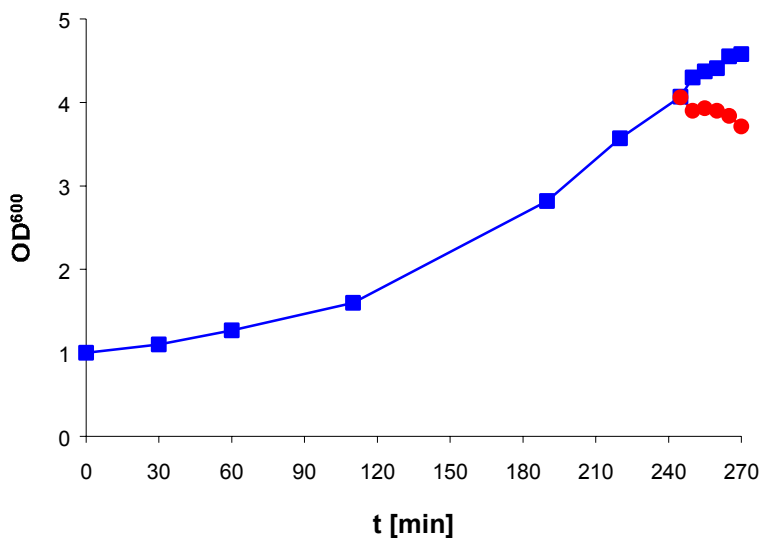


Abb. 7: Wachstum vor und nach einem Hitzeschock der Zellen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Umsetzens der einen Hälfte der Zellkultur auf 50°C. Quadrat-Symbole symbolisieren Zellwachstum bei 30°C, Kreis-Symbole Wachstum bei 50°C.



### 3.4.1.2 Überlebenstest unter Hitzeschock

Eine wichtige Voraussetzung für weiterführende Proteomanalysen unter Hitzeschock ist das Überleben der Zellen, damit sie zur Proteinsynthese fähig sind. Die Überlebensfähigkeit von *C. glutamicum* wurde über einen Tüpfeltest bestimmt. Dafür wurden direkt nach Einsetzen des Hitzeschocks ( $t_0$ ) sowie nach 10 ( $t_{10}$ ), 20 ( $t_{20}$ ) und 30 ( $t_{30}$ ) Minuten Proben genommen und deren Lebensfähigkeit mit der 30°C-Kontrolle verglichen (Abb. 8). Deutlich ist zu sehen, dass die Überlebensfähigkeit mit zunehmenden Hitzeschock zwar kontinuierlich abnimmt, doch eine signifikante Anzahl von Zellen selbst eine 30 minütige Inkubation bei 50°C überlebt.

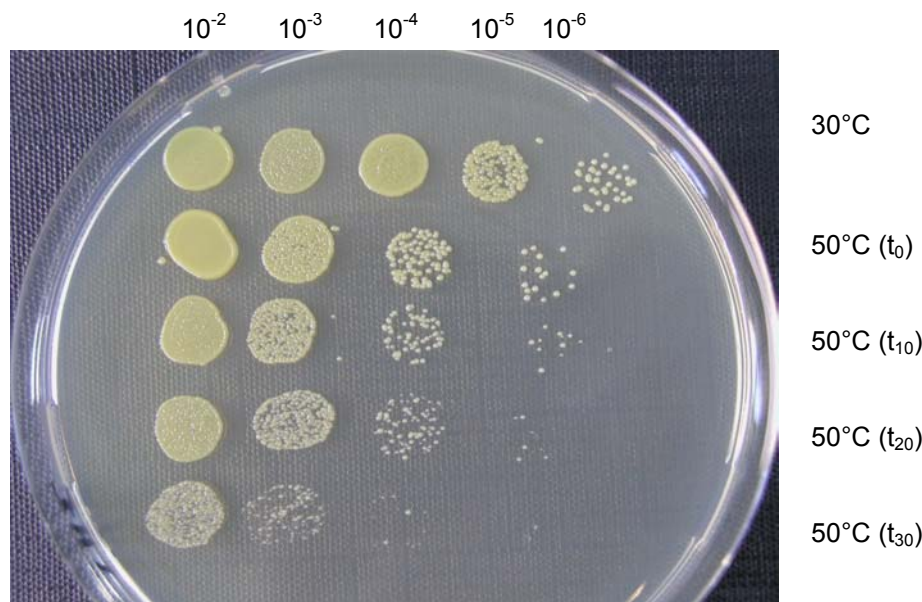


Abb. 8: Überlebenstest vor und nach einem Hitzeschock der Zellen. In Reihe 1 sind Verdünnungen der Kontrollkultur (30°C) aufgetropft, in Reihe 2 Verdünnungen direkt nach Resuspendieren der Zellen in 50°C heißem Medium ( $t_0$ ), in Reihe 3, 4 und 5 Verdünnungen nach jeweils 10, 20 und 30 minütigen Hitzeschock ( $t_{10-30}$ ). Jeweils 10  $\mu$ l der Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  wurden auf Agarplatten aufgetropft und  $\bar{u}N$  bei 30°C inkubiert.

### 3.4.2 Das Proteom unter Hitzeschock

Auf Hitzeschock reagieren Zellen mit genomweiter Änderungen der Genexpression und der Proteinsynthese (Hecker und Völker, 2001). Um die Hitzeschock-spezifische Proteinsynthese von *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden die Zellen für 20 Minuten einem Hitzeschock von 50°C ausgesetzt. Wie durch den Überlebenstest (3.4.1.2) gezeigt werden konnte, waren nach dieser Schockdauer noch eine signifikante Anzahl von Zellen lebendig und sollten daher zur Proteinsynthese fähig sein. Die gewonnenen Proteine wurden 2D-getrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt (Abb. 9). Es wurde erwartet, dass nach einem Hitzeschock die generellen Stressproteine (GSP) und insbesondere die Hitzeschockproteine (HSP) sehr stark vertreten sein würden. Dieses konnte für die zu den HSP gezählten Chaperone gezeigt werden, die vor dem Hitzeschock kaum detektierbar waren (GroES) bzw. deren Konzentration nach dem Hitzeschock mindestens verdoppelt bis verdreifacht (GroEL2) bzw. ungefähr 10fach gesteigert (DnaK) war. Stark vermindert vorhanden waren unter Hitzeschock solche Proteine, die für das zelluläre Wachstum notwendig sind, namentlich die Translationselongations-Faktoren EF-Tu (modifizierte Form ca. dreifach geringer konzentriert), EF-Ts (ca. fünffach geringer konzentriert) und EF-P (nicht mehr detektierbar) sowie das L12-Protein der ribosomalen 50S-Untereinheit (ca. drei- bis vierfach geringer konzentriert); neben weiteren nicht näher charakterisierten Proteinen.

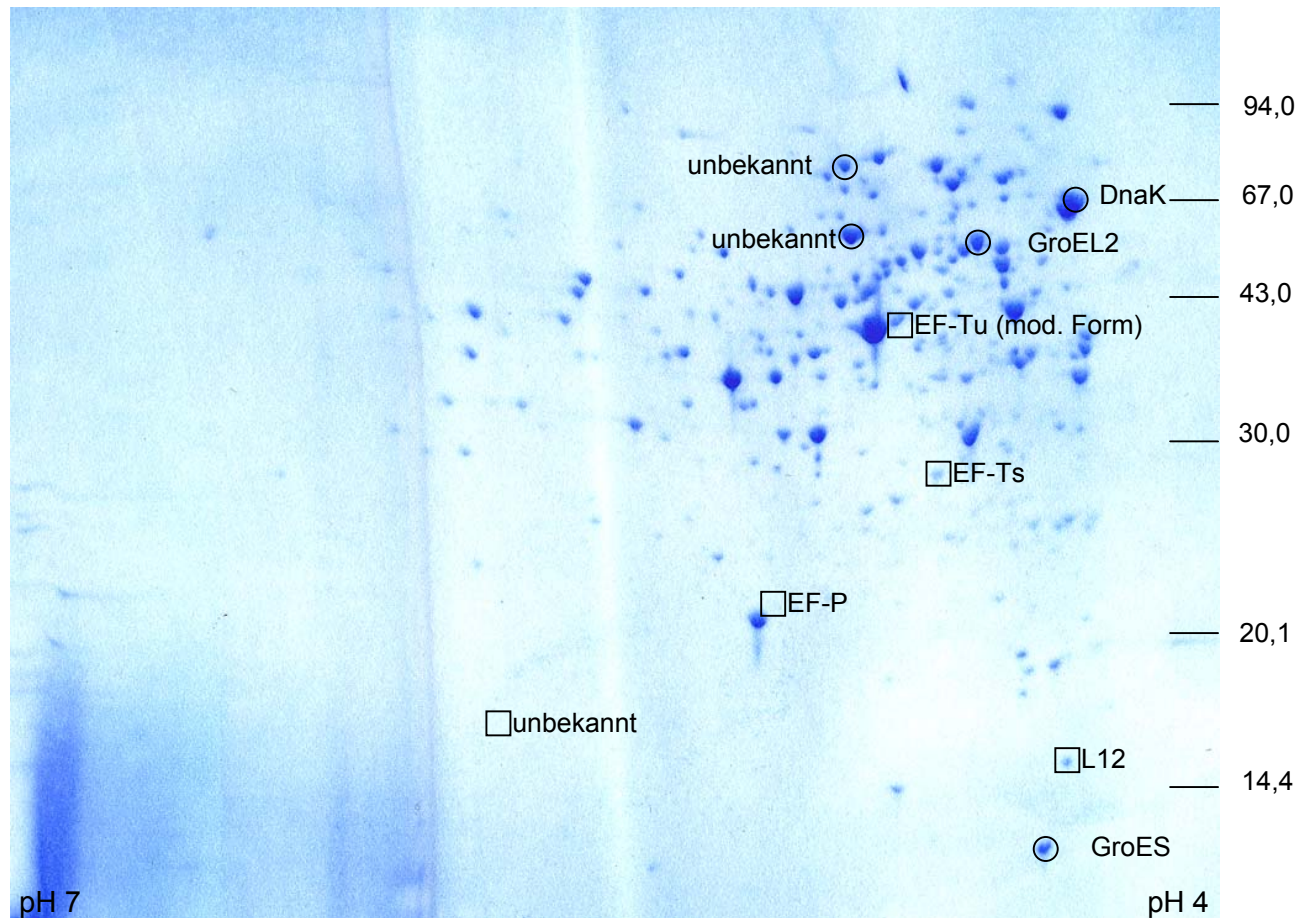


Abb. 9: Mit kolloidalem Coomassie gefärbtes 2D-Gel nach einem 20 minütigen Hitzeschock der Zellen von 50°C. Ein Kreis markiert Proteine, die entweder nur oder deutlich stärker nach Hitzeschock vorhanden waren. Ein Kasten markiert Proteine, die nach Hitzeschock signifikant schwächer oder gar nicht mehr vorhanden waren. Die apparenten Proteingrößen in kDa sind auf der rechten Seite angegeben, die ungefähren pH-Bereiche an der Gelunterseite.

Die Arbeiten zur Hitzeschock-Antwort von *C. glutamicum* lassen sich wie folgt zusammenfassen: auf einen Hitzeschock von 50°C reagierte das Bakterium mit stagnierendem Wachstum und einer stark eingeschränkten Überlebensfähigkeit. Entsprechend zeigte sich auf Proteomebene eine globale Umstellung der Proteinsynthese. Während die bekannten Hitzeschock-Proteine entweder nur oder drastisch verstärkt nach einem Hitzeschock vorhanden waren, wurden für das zelluläre Wachstum wichtige Proteine nicht mehr oder signifikant schwächer im 2D-getrennten Proteom detektiert. Demnach konnte eine deutliche Reaktion von *C. glutamicum* auf den Hitzeschock über 2D-Elektrophorese detektiert werden.

### 3.5 Das Phosphoproteom von *C. glutamicum*

Durch die bisherigen Arbeiten zur Proteomanalyse konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* nur mit geringen Änderungen im Proteom auf Stickstoff-Limitation reagiert (Schmid *et al.*, 2000). Daher wurde u. a. vermutet, dass *C. glutamicum* auf den N-Mangel nicht mit einer verstärkten Neusynthese von Proteinen reagiert, sondern stattdessen die Aktivität bereits vorhandener Proteine reguliert. Aktivitätsregulation von Proteinen erfolgt oft über deren co- oder posttranslationale Modifikation. Die wichtigste regulatorische Modifikation von Proteinen ist dabei deren reversible Phosphorylierung oder Dephosphorylierung (Schlosser *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Methode entwickelt, um phosphorylierte Proteine, im folgenden auch das Phosphoproteom genannt, zu detektieren. Anschließend wurde untersucht, ob Phosphorylierungsprozesse eine Rolle während der Adaptation an Stickstoff-Limitation spielen.

#### 3.5.1 Detektion über radioaktive Markierung

Eine gängige Methode zur Detektion phosphorylierter Proteine ist deren Markierung mit [<sup>32</sup>P], einem starken  $\beta$ -Strahler. Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Methodenetablierung war eine Markierung mit dem weniger energiereichen Isotop [<sup>33</sup>P], welches verschiedene Vorteile bietet (s. Diskussion).

Über Aufnahmetests mit [<sup>33</sup>P]-Phosphorsäure wurde ermittelt, dass 8 MBq [<sup>33</sup>P]-Phosphorsäure pro 15 ml Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von 4 optimal für die *in vivo*-Markierung sind. Dementsprechend wurden exponentiell wachsende Zellen bei einer OD<sub>600</sub> von 4 für 45 Minuten *in vivo* markiert. Diese lange Markierungsdauer war notwendig, um eine ausreichende Aufnahme des radioaktiven Phosphats durch die Zellen zu erreichen. Um die spezifische Radioaktivität zu erhöhen, wurde die Phosphatkonzentration des Mediums auf 0,1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> reduziert. Nach der metabolischen Markierung wurden die Proteine unter Zusatz des Phosphatase-Inhibitors Natrium-Vanadat gewonnen und zweidimensional getrennt. Anschließend wurde das 2D-Gel auf Whatman-Papier getrocknet und mit Fuji Imaging Plates für 3–30 Tage exponiert. Danach konnte das Phosphoproteom durch Autoradiographie visualisiert werden. Die Detektion der Proteine wurde anfänglich durch eine starke Hintergrundschwärzung erschwert. Eine Erklärung hierfür war, dass während der Markierungsphase auch der zellinterne Nukleotid-Pool das radioaktive Phosphat inkorporierte. Bei dem Hintergrund handelte es sich demnach um DNA, die während der Markierungsphase synthetisiert und dadurch ebenfalls markiert wurde. Durch

eine DNase I-Behandlung der Proteinproben (5 µg/ml DNase I für 1 h bei 4°C) konnte der Hintergrund beseitigt werden (Abb. 10). Daher wurden im folgenden 5 µg/ml DNase I bereits während des Zellaufschlusses zugegeben.

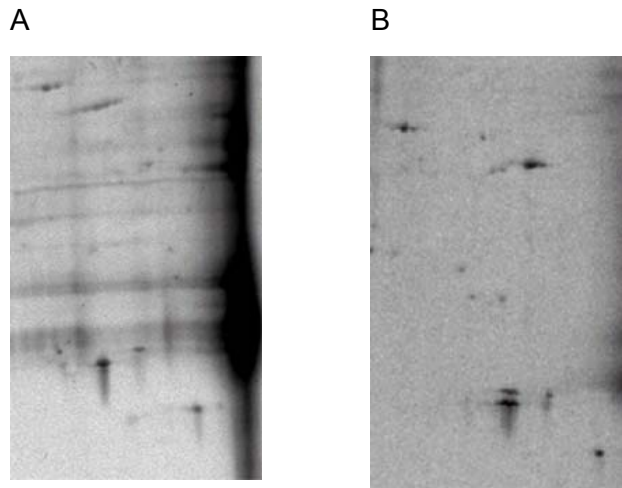


Abb. 10: Ausschnitt aus 2D-Gelen vor (A) und nach (B) einer DNase I-Behandlung der Proteinproben. Die starke Hintergrundschwärzung, durch die eine Proteindetektion erschwert wird, konnte durch DNase I-Behandlung der Proben (5 µg/ml für 1 h bei 4°C) beseitigt werden.

Mit der beschriebenen *in vivo*-Markierung und nachfolgender Autoradiographie konnten 59 phosphorylierte Proteine visualisiert werden (Abb. 11).

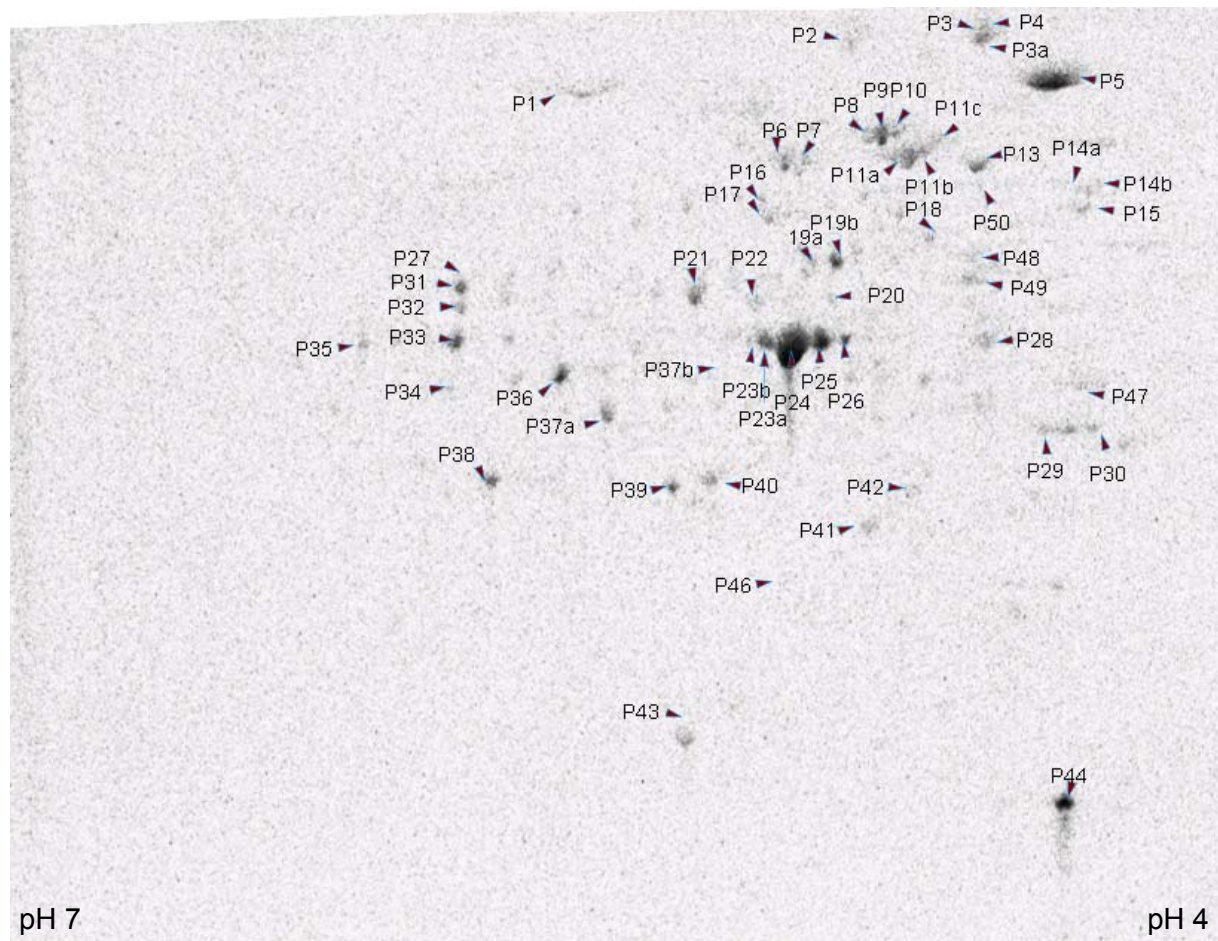


Abb. 11: Autoradiographie [ $^{33}\text{P}$ ]-markierter Proteine. Ca. 200  $\mu\text{g}$  der *in vivo* markierten cytoplasmatischen Proteinfraction (spezifische Radioaktivität 1500 cpm/ $\mu\text{g}$ ) wurden über 2-DE im Bereich pH 4-7 und 5-100 kDa getrennt. Es sind 59 phosphorylierte Proteinspots zu erkennen. Die identifizierten Proteine sind in Tab. 2 (Seite 47 ff) aufgeführt.

### 3.5.2 Detektion über Immunfärbung

Neben dem Ziel, das Phosphoproteom möglichst vollständig und quantitativ zu erfassen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Detektion potentieller Phosphorylierungsprozesse während der zellulären Adaptation an Stickstoff-Limitation (s. 3.5.5). Die Methode der radioaktiven Markierung erforderte eine relativ lange Markierungsdauer von 45 Minuten. Um putative Phosphorylierungsprozesse zu detektieren, die in den ersten Minuten nach Einsetzen der N-Limitation erfolgen, wurde daher eine Methode zur Immunfärbung des Phosphoproteoms angewandt. Da bei dieser Methode keine Aufnahme des Substrats durch die Zellen erfolgen muss, können auch sehr kurze Zeitfenster untersucht werden. Im Rahmen einer Kooperation mit der Degussa-AG wurden Antikörper gegen Phosphoserin (pSer), Phosphothreonin (pThr) und Phosphotyrosin (pTyr) untersucht. Obwohl Tyrosin-phosphorylierte Proteine in Bakterien gefunden wurden (Kennelly und Potts, 1999) und die Genomsequenz von *C. glutamicum* eine Tyrosin-spezifische Phosphatase kodiert (Steffen Schaffer, FZ Jülich; unveröffentlichte Daten), konnten die Mitarbeiter der Degussa-AG keine Phosphoproteine mit pTyr-spezifischen Antikörpern detektieren. Mit pThr-spezifischen Antikörpern wurden ca. 20 Phosphoproteine visualisiert (Thomas Hermann, Degussa-AG; pers. Mitteilung). Die meisten Phosphoproteine wurden mit einem Anti-pSer-Sampler Kit detektiert, welcher monoklonale IgM-Antikörper von fünf Maus-Klonen enthält, die spezifisch für verschiedene Epitope von pSer-enthaltenen Sequenzmotiven sind. In dieser Arbeit konnten mit diesen Antikörpern ungefähr 90 Phosphoproteine der cytoplasmatischen Proteinfraction detektiert werden (Abb. 12). Kreuzreaktionen sind nach Kaufmann und Mitarbeitern (2001) bei pSer- und pThr-Antikörpern nicht zu erwarten. Aus zeitlichen Gründen wurde keine Immundetektion mit pThr-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

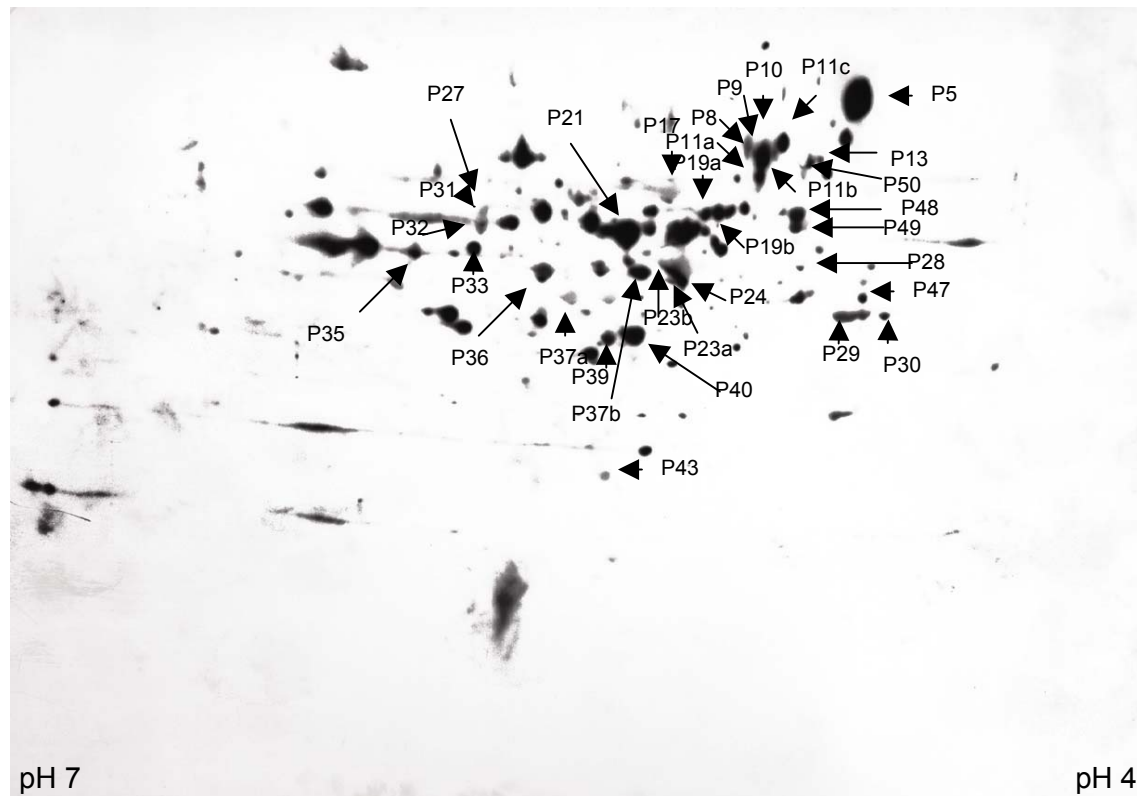


Abb. 12: Immunfärbung mit pSer-spezifischen Antikörpern. 300 µg der cytoplasmatischen Proteinfraction wurden über 2-DE im Bereich pH 4-7 und 5-100 kDa getrennt. Es sind ungefähr 90 phosphorylierte Proteine zu erkennen. Diejenigen unter ihnen, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten, sind gekennzeichnet und in Tab. 2 (Seite 47 ff) aufgeführt.

### 3.5.3 Identifizierung der phosphorylierten Proteine

#### 3.5.3.1 [<sup>33</sup>P]-markierte Proteine

Für die Identifizierung der [<sup>33</sup>P]-markierten Proteine über MALDI-TOF-MS wurden die Proteinspots aus 2D-Gelen ausgeschnitten. Da die Autoradiographie und das 2D-Gel den selben Maßstab hatten, konnten die detektierten Proteine durch Übereinanderlegen von digitalisierter Autoradiographie und kolloidalem Coomassie-gefärbten 2D-Gel eindeutig lokalisiert werden. Damit konnten selbst die Proteine ausgeschnitten werden, die zwar über Autoradiographie als phosphoryliert detektiert wurden, aber über die weniger sensitive kolloidale Coomassie-Färbung im 2D-Gel nicht detektierbar waren. Die phosphorylierten Proteine wurden direkt aus den auf Whatman-Papier getrockneten radioaktiven Gelen und aus frischen Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten. Anschließend erfolgten ein *in gel*-



Verdau (2.3.8.1), das Aufreinigen der Peptide über ZipTip-Behandlung, MALDI-TOF-MS (2.3.8.3) und Datenbanksuche (2.3.8.4) zur Identifizierung der Proteine.

Von den 59 über [<sup>33</sup>P]-Markierung detektierten Proteinspots konnten 54 über MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Sie stellen 40 unterschiedliche Proteine dar (Tab. 2, Seite 47 ff). Für fünf der visualisierten Proteinspots konnte kein entsprechender Spot im Coomassie-gefärbten Mastergel detektiert werden, wodurch die erheblich höhere Sensitivität der radioaktiven Markierung im Vergleich zur kolloidalen Coomassie-Färbung verdeutlicht wird. Von den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine wurde eine Karte des Phosphoproteoms erstellt (Abb. 14, Seite 47).

### 3.5.3.2 Immunodetektierte Proteine

Nach der radioaktiven Detektion konnten die phosphorylierten Proteine eindeutig im Coomassie-gefärbten 2D-Gel lokalisiert und ausgeschnitten werden. Bei der Immunfärbung dagegen wurden die Gele während des Western Blots von ihrer Haltgebenden Trägerfolie abgelöst und auf eine PVDF-Membran geblottet. Dabei fand eine Verzerrung des Proteinmusters statt. Zur eindeutigen Identifizierung der über Immunfärbung detektierten Proteine sollten diese daher nach Western Blot und Detektion direkt aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und mit den einzelnen Spots ein *in membrane*-Verdau durchgeführt werden. Für eine solche Methodik lag keine Literatur vor. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit aus diversen Quellen (Schrattenholz, 2001; Cottrell & Sutton, 1996) das unter 2.3.8.2 ausführlicher beschriebene Protokoll erstellt. Zunächst wurden die PVDF-Membranen dafür nach der Detektion "gestrippt", um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Proteinspots aus der Membran ausgeschnitten und mehrfachen Waschschrritten unterworfen. Der tryptische Verdau wurde in einem Puffer durchgeführt, der das MALDI-kompatible Detergens Octyl-Glucopyranosid enthielt, welches das Lösen der Peptide aus der hydrophoben Membran ermöglichen sollte. Die MALDI-TOF-MS erfolgte wie bereits beschrieben. Sämtliche aufgenommene Spektren gehörten zu BSA, welches zum Absättigen (*Blocking*) der Membran nach dem Western Blot verwendet wurde. Nachdem hierfür eine Lösung ohne BSA verwendet wurde, konnten keine Peptidspektren mehr aufgenommen werden. Mögliche Ursachen hierfür wären zum einen störende Komponenten in der Peptid-Lösung, die auch noch nach der ZipTip-Aufreinigung vorhanden waren, wie z. B. PVP aus der *Blocking*-Lösung oder das zugesetzte Octyl-Glucopyranosid. Die wahrscheinlichste Erklärung ist aber eine zu geringe Peptidkonzentration, hervorgerufen dadurch, dass die 300 µg 2-D getrennter Proteine auch nach 1,5 Stunden Western Blot nicht quantitativ in die

Membran transferiert wurden (verdeutlicht durch ein immer noch gut anzufärbendes 2D-Muster auf dem bereits geblotteten Gel), außerdem dadurch, dass während der *Stripping*-Prozedur neben den Antikörpern auch 2-D getrennte Proteine entfernt wurden. Die Hauptursache ist wohl, dass sich die Peptide selbst bei Zusatz von 1% Octyl-Glucopyranosid nicht mehr von der Membran lösen ließen.

Somit war ein direktes Identifizieren der detektierten Phosphoproteine auf der Membran nicht möglich. Die Standardmethode zur Proteinidentifizierung nach Immunodetektion ist eine indirekte Identifizierung der Proteine, indem die immunodetektierten Proteinspots ihren entsprechenden Proteinen in einem gefärbten 2D-Mastergel zugeordnet werden. Aus diesem werden sie anschließend ausgeschnitten und identifiziert (Kaufmann *et al.*, 2001). Diese Zuordnung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Delta2D-Software, Version 2.1 (Decodon, Greifswald). Mit dieser Software wurde ein Falschfarbenbild erstellt, indem die digitalisierten Abbildungen des Coomassie-gefärbten 2D-Mastergels und des immunodetektierten Proteinmusters mit zwei verschiedenen Farben eingefärbt wurden. Anschließend wurden beide Bilder übereinandergelegt und die identischen Proteinspots einander zugeordnet. Die Software entzerrte anhand von manuell vorgegebenen Anhaltspunkten einem Algorithmus folgend das Spotmuster, so dass identische Proteine übereinander lagen. In Gelbereichen, in denen eine Vielzahl von Proteinen fokussierte, war eine absolut zweifelsfreie Proteinerkennung selbst durch die Computer-gestützte Zuordnung nicht möglich. Dies trifft auf die Spots P16, P20, P22, P30 und P42 zu. Außerdem wurden analog zur [<sup>33</sup>P]-Markierung aufgrund von Sensitivitätsunterschieden nicht alle immunodetektierten Proteine in einem Coomassie-behandelten Gel angefärbt, was deren Zuordnung und damit Identifizierung unmöglich machte. Insgesamt konnten über diese Software-gestützte Auswertung 52 der immunodetektierten Proteinspots ihren jeweiligen Proteinen zugeordnet werden. Ein Großteil von ihnen wurden ebenfalls über die radioaktive Markierung detektiert, was die Ergebnisse der Software-gestützten "indirekten" Identifizierung bestätigt.

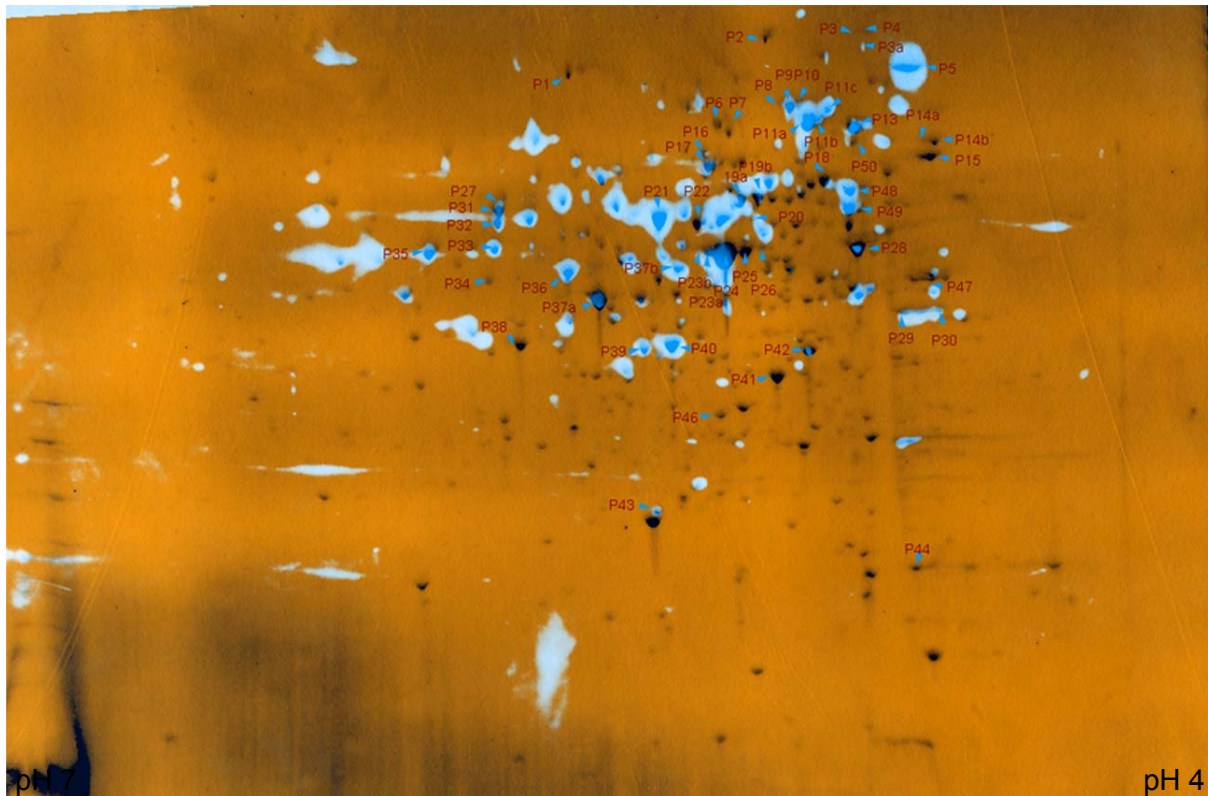


Abb. 13: Falschfarbenbild für die indirekte Identifizierung der immun-detektierten Phosphoproteine. Das Bild wurde mit Hilfe der Delta2D-Software erstellt, indem die digitalisierten Abbildungen des immun-detektierten Proteinmusters (hell eingefärbt) und des Coomassie-gefärbten 2D-Vergleichsgels (dunkel eingefärbt) übereinandergelegt wurden. Identische Proteine wurden einander einem Algorithmus folgend durch die Software zugeordnet. Von den ungefähr 90 immun-detektierten Spots konnten dadurch 52 ihren jeweiligen Proteinen im Coomassie-gefärbten 2D-Gel zugeordnet werden. Für Proteinidentitäten s. Tab. 2 (Seite 47 ff).

### 3.5.4 Phosphoproteine von *C. glutamicum*

Insgesamt wurden ungefähr 60 bzw. ungefähr 90 phosphorylierte Proteine durch radioaktive Markierung bzw. Immunfärbung detektiert. Von diesen wurden 33 Proteine mit beiden Methoden detektiert. 56 der durch radioaktive Markierung und / oder Immunfärbung detektierten Proteinspots konnten durch MALDI-TOF-MS identifiziert werden, sie stellen 42 unterschiedliche Proteine dar. Von den identifizierten Phosphoproteinen wurde eine Karte des Phosphoproteoms von *C. glutamicum* erstellt (Abb. 14, Seite 47). Ein direkter Beweis dafür, dass die identifizierten Proteine Phosphoproteine sind, ist der Nachweis des jeweiligen phosphorylierten Peptids. Dieser ist anhand der durch eine Phosphorylierung auftretenden Massenverschiebung von 80 Da möglich, da für dasselbe Peptidfragment der Peak des

nicht-phosphorylierten Peptids sowie der um 80 Da schwerere Peak des phosphorylierten Peptids detektiert wird. Von Larsen und Mitarbeitern (2001) wurde für diese Phosphopeptid-Detektion eine Methode des Spektren-Vergleiches vor und nach einer Phosphatase-Behandlung beschrieben. Nach der Dephosphorylierung des Peptidgemisches sollten im Spektrum neue Peaks auftreten, die um 80 Da kleiner sind als die entsprechenden Peaks der phosphorylierten Peptide. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit 15 Proteinen ein derartiger Spektren-Vergleich vor und nach einer Phosphatase-Behandlung durchgeführt (2.3.8.5). Es gelang aber nicht, Phosphopeptide zu detektieren. Die Analyse von Phosphopeptiden wird in der Literatur als sehr schwierig beschrieben, weil Phosphopeptide in MS-Spektren nur als sehr kleine Peaks auftreten, die häufig im Bereich des Rauschens liegen. Die Ursache hierfür ist zum einen, dass der Phosphorylierungsgrad von Proteinen normalerweise sehr niedrig ist, d. h. nur ein geringer Anteil des Proteins phosphoryliert ist (Mann *et al.*, 2002). Zusätzlich lassen sich Phosphopeptide schlechter ionisieren als nicht-phosphorylierte Peptide, wodurch ihre Peaks insbesondere in MS-Spektren eines Gesamtproteinverdauens von den nicht-phosphorylierten Peaks überdeckt werden. Außerdem gehen die hydrophilen Phosphopeptide während der Entsalzungsprozedur über *reverse phase* C<sub>18</sub> Pipettenspitzen leicht verloren (Mann *et al.*, 2002).

Da die Phosphopeptide nicht detektiert werden konnten, erfolgte die Validierung der Ergebnisse durch einen Vergleich der experimentellen Daten mit theoretischen Daten. Zunächst wurden die Proteine mit der NetPhos-Software ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos)) analysiert, welche die Aminosäure-Sequenz der Proteine auf potentielle pSer-, pThr- und pTyr-Phosphorylierungsstellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass jedes der in dieser Arbeit identifizierten Proteine zwischen 3 und 32 pSer-, pThr- und pTyr-Phosphorylierungsstellen aufwies (Daten nicht gezeigt). Durch Datenbankrecherchen über PhosphoBase ([www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase](http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase)), BRENDA ([www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de)) sowie PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)) wurde überprüft, ob die in dieser Arbeit identifizierten Proteine bereits als Phosphoproteine beschrieben wurden. Dabei konnte für einen Großteil der identifizierten Proteine eine entsprechende Publikation gefunden werden. In der Karte des Phosphoproteoms (Abb. 14, Seite 47) wird ersichtlich, dass acht verschiedene Phosphoproteine in mehr als einem Spot gefunden wurden, die sich in ihren isoelektrischen Punkten (IEP) und / oder ihrer Größe unterschieden. Mit unterschiedlichen IEP, aber gleichen Größen traten beispielsweise die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G in vier (P23a, P24-26) bzw. drei (P8-10) Spots auf. Ebenso wurden die GTPase (P6, P7), die ACCase (P16, P17) und die Ketol-Acid-Reduktoisomerase (P29, P30) in jeweils zwei Spots mit unterschiedlichen IEP, aber gleichen Größen detektiert. Diese nebeneinanderliegende

Spots annähernd gleicher Größe stellen wahrscheinlich verschiedenen phosphorylierte Formen desselben Proteins dar. Zusätzlich wurden drei Phosphoproteine gefunden, die sich sowohl in ihren IEP als auch in ihren Größen unterschieden, namentlich GAP-DH (P37a, P37b), Acyl-CoA Synthetase (P48, P50) und Pyruvat-Kinase (P31, P35). Bei diesen Proteinen, die sich sowohl in ihren IEP als auch in ihren Größen unterschieden, sind weitere Modifikationen neben der Phosphorylierung möglich. Beispielsweise wurde für die Pyruvat-Kinase ein IEP von pH 5,07 und eine Größe von 67,6 kDa beschrieben, was augenscheinlich dem Protein der Spotnummer P31 entspricht. Der ebenfalls als Pyruvat-Kinase identifizierte Spot P35 dagegen fokussiert ungefähr 0,3 pH-Einheiten in den sauren Bereich verschoben und ist mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa deutlich kleiner. Wahrscheinlich fand eine proteolytische Prozessierung des Proteins statt, wie sie für die Pyruvat-Kinase aus Sojabohnen beschrieben wurde (Guo-Qing Tang, North Carolina State University; pers. Mitteilung). Auch eine artifizielle chemische Modifizierung während der Probengewinnung und 2-DE kann nicht ausgeschlossen werden (Büttner *et al.*, 2001).

Ein Großteil der identifizierten Phosphoproteine sind abundante Enzyme des Zentralstoffwechsels wie der Glykolyse (GAP-DH, Pyruvat-Kinase, Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Enolase, Pyruvat-Decarboxylase), des Citratzyklus (Aconitase, Citrat-Synthase, Isocitrat-DH) und des Fettstoffwechsels (Acyl-CoA-Synthetase, Acyl-CoA-Carboxylase, Succinyl-CoA:CoA-Transferase). Daneben wurden Hitzeschockproteine (DnaK, GroEL2, DnaJ2) sowie in die Proteinsynthese involvierte Proteine (EF-Tu, -P, -Ts und -G) identifiziert. Gering abundante Proteine wie Regulatoren oder Signaltransduktionsproteine wurden dagegen nicht detektiert. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zum Phosphoproteom von *Saccharomyces cerevisiae* überein. Bei diesen Analysen wurde ein *shotgun*-Ansatz verwendet, bei dem das Gesamtproteom tryptisch verdaut wird, die phosphorylierten Peptide anschließend angereichert und massenspektrometrisch analysiert werden. Ficarro und Mitarbeiter identifizierten mit dieser Methode 171 verschiedenen Proteine, vor allem Hitzeschockproteine sowie Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus und der Proteinsynthese (Ficarro *et al.*, 2002). Über die gleiche Methode identifizierten auch Zhou und Mitarbeiter hauptsächlich glykolytische Enzyme sowie ebenfalls hoch-abundante ribosomale Proteine und Hitzeschockproteine (Zhou *et al.*, 2001). Niedrig abundante regulatorische Proteine konnten auch dort nicht detektiert werden.

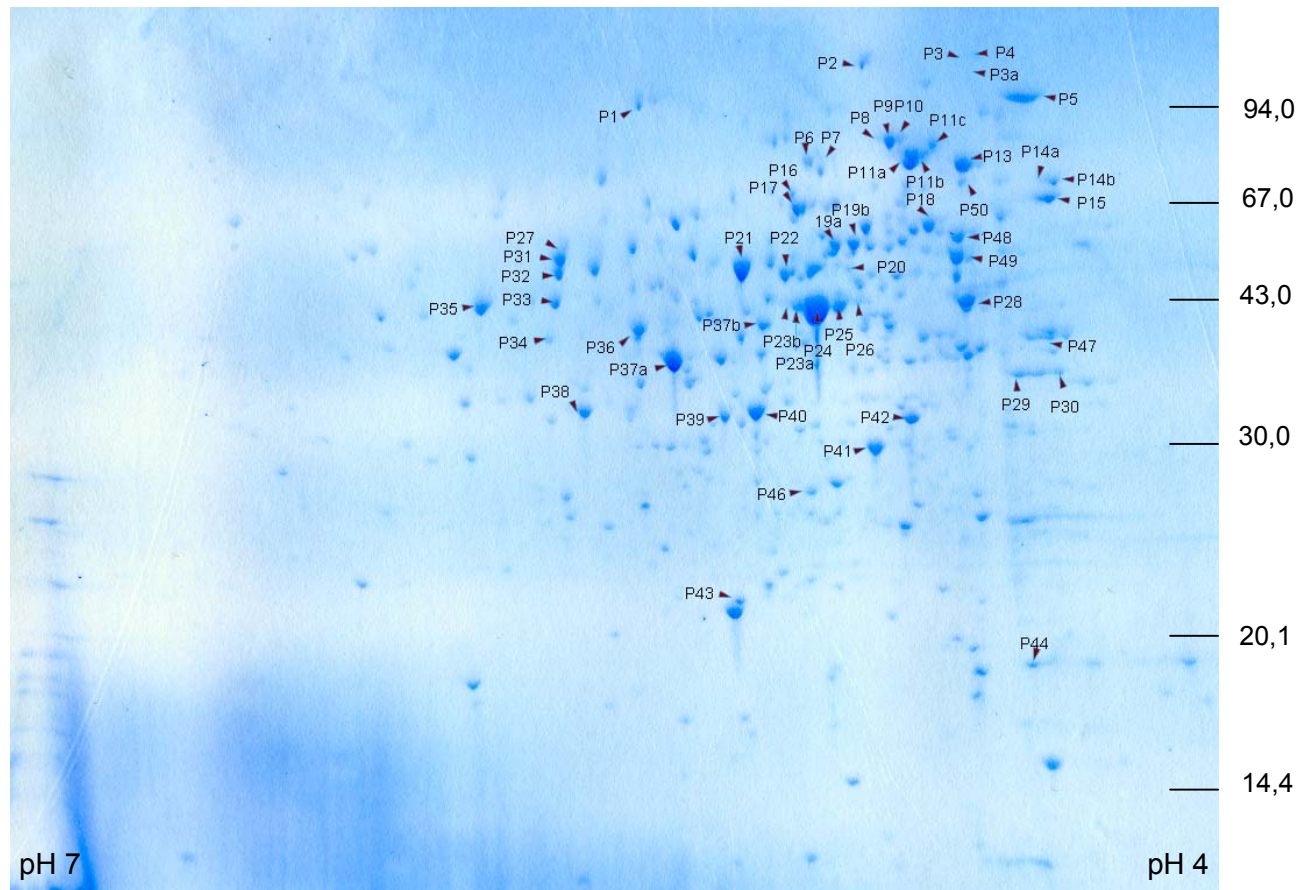


Abb. 14: Erstellte Karte des Phosphoproteoms. 100 µg der cytoplasmatischen Proteinfraktion wurden über 2-DE im Bereich pH 4-7 und 5-100 kDa getrennt und anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die in dieser Arbeit identifizierten Phosphoproteine sind gekennzeichnet (s. Tab. 2 für Details). Die apparenten Proteingrößen in kDa sind auf der rechten Seite, die ungefähren pH-Bereiche an der Gelunterseite angegeben.

Tab. 2: Durch radioaktive Markierung ( $[^{33}\text{P}]$ ) und / oder Immunfärbung (pSer) detektierte und über MALDI-TOF-MS identifizierte Phosphoproteine. Angegeben sind Proteinspot-Nummern, ORF-Bezeichnung, die Namen der Gene und der Proteine, die jeweilige Detektionsmethode und eventuell vorhandene Datenbankeinträge bezüglich einer Phosphorylierung.

| Spot | ORF <sup>a</sup> | Gen         | Protein                    | $[^{33}\text{P}]$ | pSer | Net-Phos <sup>b</sup> | Pho-Base <sup>b</sup> | BRENDA <sup>b</sup> | db <sup>c</sup> |
|------|------------------|-------------|----------------------------|-------------------|------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|
| P1   | 1199             | <i>pyc</i>  | Pyruvat-Carboxylase        | +                 | -    | +                     | -                     | -                   | PubMed          |
| P2   | 983              | <i>rpoB</i> | RNA-Polymerase (β-UE)      | +                 | -    | +                     | +                     | +                   | PubMed          |
| P3   | 2512             | <i>carB</i> | Carbamoylphosphat-Synthase | +                 | -    | +                     | -                     | -                   | PubMed          |

|      |      |               |                                      |   |                |                   |                   |                   |                   |
|------|------|---------------|--------------------------------------|---|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| P3a  | 1902 | -             | Leucin-tRNA-Ligase                   | + | -              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P4   | 2512 | <i>carB</i>   | Carbamoylphosphat-Synthase           | + | -              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P5   | 2425 | <i>acn</i>    | Aconitase                            | + | +              | +                 | +                 | -                 | PubMed            |
| P6   | 1679 | <i>bipA</i>   | GTPase                               | + | -              | +                 | -                 | +                 | PubMed            |
| P7   | 1679 | <i>bipA</i>   | GTPase                               | + | -              | +                 | -                 | +                 | PubMed            |
| P8   | 990  | <i>fusA</i>   | Elongationsfaktor G                  | + | +              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P9   | 990  | <i>fusA</i>   | Elongationsfaktor G                  | + | +              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P10  | 990  | <i>fusA</i>   | Elongationsfaktor G                  | + | +              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P11a | 1722 | <i>metE</i>   | Methionin-Synthase                   | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
|      | 2470 | <i>tkt</i>    | Transketolase                        | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P11b | 2470 | <i>tkt</i>    | Transketolase                        | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P11c | 1722 | <i>metE</i>   | Methionin-Synthase                   | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P13  | 1167 | <i>icd</i>    | Isocitrat-Dehydrogenase              | + | +              | +                 | +                 | -                 | PubMed            |
| P14a | 176  | <i>dnaK</i>   | DnaK                                 | + | -              | +                 | +                 | -                 | PubMed            |
| P14b | 176  | <i>dnaK</i>   | DnaK                                 | + | -              | +                 | +                 | -                 | PubMed            |
| P15  | 2675 | <i>rpsA</i>   | ribosomales Protein S1               | + | -              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P16  | 1211 | <i>accBC</i>  | Acyl-CoA-Carboxylase                 | + | ? <sup>e</sup> | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P17  | 1211 | <i>accBC</i>  | Acyl-CoA-Carboxylase                 | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P18  | 68   | <i>groEL2</i> | GroEL2                               | + | -              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P19a | 2292 | <i>murC</i>   | UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Ligase | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P19b | 3236 | <i>glnA</i>   | Glutamin-Synthetase I                | + | +              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P20  | 1811 | <i>atpA</i>   | ATP-Synthase ( $\alpha$ -Kette)      | + | ? <sup>e</sup> | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P21  | 2881 | <i>cat 1</i>  | Succinyl-CoA: CoA-Transferase        | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P22  | 1587 | <i>fum</i>    | Fumarase                             | + | ? <sup>e</sup> | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P23a | 991  | <i>tuf</i>    | Elongationsfaktor Tu                 | + | +              | +                 | +                 | -                 | PubMed            |
| P23b | 1154 | <i>metY</i>   | O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase      | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P24  | 991  | <i>tuf</i>    | Elongationsfaktor Tu                 | + | +              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P25  | 991  | <i>tuf</i>    | Elongationsfaktor Tu                 | + | -              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P26  | 991  | <i>tuf</i>    | Elongationsfaktor Tu                 | + | -              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P27  | 2828 | <i>poxB</i>   | Pyruvat-Oxidase                      | - | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P28  | 1549 | <i>eno</i>    | Enolase                              | + | +              | +                 | -                 | -                 | PubMed            |
| P29  | 2790 | <i>ilvC</i>   | Ketolacid-Reduktoisomerase           | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
| P30  | 2790 | <i>ilvC</i>   | Ketolacid-Reduktoisomerase           | + | +              | +                 | -                 | -                 | -                 |
|      | 3740 | -             | hyp. Glucose-Kinase                  | + | ? <sup>e</sup> | n.b. <sup>d</sup> | n.b. <sup>d</sup> | n.b. <sup>d</sup> | n.b. <sup>d</sup> |
| P31  | 3683 | <i>pyk</i>    | Pyruvat-Kinase                       | + | +              | +                 | +                 | -                 | PubMed            |

|      |      |              |   |   |                |   |                   |                   |                   |
|------|------|--------------|---|---|----------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| P32  | 825  | <i>lpd</i>   | Lipoamid-DH                                   | + | +              | + | -                 | -                 | -                 |
| P33  | 1572 | <i>glyA</i>  | Gycin-Hydroxymethyl-<br>Transferase           | + | +              | + | -                 | -                 | -                 |
| P34  | 3141 | <i>dnaJ2</i> | DnaJ2   | + | -              | + | -                 | -                 | -                 |
| P35  | 3683 | <i>pyk</i>   | Pyruvat-Kinase                                | + | +              | + | -                 | -                 | PubMed            |
| P36  | 1377 | <i>gltA</i>  | Citrat-Synthase                               | + | +              | + | -                 | -                 | -                 |
| P37a | 2487 | <i>gap</i>   | GAP-DH  | + | +              | + | -                 | -                 | PubMed            |
| P37b | 2487 | <i>gap</i>   | GAP-DH  | - | +              | + | -                 | -                 | PubMed            |
| P38  | 2921 | -            | hyp. 35k-Protein                              | + | -              | + | n.b. <sup>d</sup> | n.b. <sup>d</sup> | n.b. <sup>d</sup> |
| P39  | 306  | <i>ldh</i>   | Lactat-DH                                     | + | +              | + | +                 | -                 | -                 |
| P40  | 141  | <i>fda</i>   | Fructose-Bisphosphat-<br>Aldolase             | + | +              | + | -                 | -                 | PubMed            |
| P41  | 2133 | <i>tfs</i>   | Elongationsfaktor Ts                          | + | -              | + | -                 | -                 | PubMed            |
| P42  | 2890 | <i>cysK</i>  | Cystein-Synthase                              | + | ? <sup>e</sup> | + | -                 | -                 | -                 |
| P43  | 2526 | <i>efp</i>   | Elongationsfaktor P                           | + | +              | + | -                 | -                 | -                 |
| P44  | 47   | <i>ppa</i>   | inorg. Pyrophosphatase                        | + | -              | + | -                 | -                 | PubMed            |
| P47  | 1287 | <i>aroA</i>  | 5-Enolpyruvylshikimat-3-<br>phosphat-Synthase | + | +              | + | -                 | -                 | -                 |
| P48  | 267  | <i>fadD</i>  | Acyl-CoA-Synthetase                           | + | +              |   | -                 | -                 | -                 |
| P49  | 1813 | <i>atpD</i>  | ATP-Synthase ( $\beta$ -Kette)                | + | +              |   | -                 | -                 | -                 |
| P50  | 267  | <i>fadD</i>  | Acyl-CoA-Synthetase                           | + | +              |   | -                 | -                 | -                 |

<sup>a</sup> ORF-Bezeichnung nach der Biomax-Genomannotation (Degussa-AG)

<sup>b</sup> Ein Plus bzw. Minus gibt an, ob mit den jeweiligen Programmen Informationen bezüglich einer Phosphorylierung des Proteins erhalten wurden

<sup>c</sup> Datenbank, in der das jeweilige Protein als phosphoryliert beschrieben wurde

<sup>d</sup> wurde nicht bestimmt

<sup>e</sup> keine eindeutige Zuordnung



### 3.5.5 Phosphorylierungsprozesse während Stickstoff-Limitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse bei der zellulären Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation eine Rolle spielen. Dafür wurde das Phosphoproteom von Zellen, die unter N-Überschuss kultiviert wurden, mit dem Phosphoproteom N-gehungerter Zellen verglichen.

Zunächst wurde das Phosphoproteom über [<sup>33</sup>P]-Markierung analysiert. Dafür wurde *C. glutamicum* wie unter 2.2.5 beschrieben in Phosphat-reduzierten Medien mit und ohne Stickstoff für 45 Minuten *in vivo* markiert. Im Phosphoproteom von Zellen unter den beiden Kulturbedingungen waren keine Unterschiede detektierbar (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise treten die putativen Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse der Adaptation an Stickstoff-Limitation bereits in den ersten Minuten nach Einsetzen der Limitation ein. Diese wären mit der beschriebenen radioaktiven Detektionsmethode aufgrund der notwendigen langen Markierungsdauer nicht zu detektieren. Deswegen wurde zusätzlich eine Methode zur Immunfärbung des Phosphoproteoms angewandt. Mit dieser Methode wurde das Phosphoproteom von Zellen nach siebenminütiger N-Limitation analysiert. Auch mit dieser Methode konnten keine Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse detektiert werden (s. Diskussion).

### 3.6 Ergebnisse der Microarray-Experimente

Anhand von Microarrays (DNA-Chips) kann das gesamte Transkriptom einer Zelle unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert werden. Somit ist es möglich, die für einen bestimmten Stress spezifischen Gene zu detektieren (Lockhart *et al.*, 2000). Um diejenigen Gene zu finden, die einer Stickstoff-abhängigen Kontrolle unterliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Transkriptom nach 10 und 30 Minuten (3.6.1) sowie nach vier Stunden N-Limitation (3.6.2) analysiert und mit dem Transkriptom der unter N-Überschuss kultivierten Kontrolle verglichen. Eine Validierung der erhaltenen Ergebnisse wurde durch die Analyse des Transkriptoms nach Hitzeschock der Zellen erzielt (3.6.3).

Für die Microarray-Experimente wurden Gesamtgenom-Chips der Degussa-AG genutzt. Auf diesen von GeneScan (Freiburg, Deutschland) produzierten Microarrays befanden sich 3081 ORFs (N-Limitationsexperimente) bzw. 3556 ORFs (Hitzeschockexperimente und Kontrolle) von *C. glutamicum* in Form von PCR-Produkten à 500 bp, welche in dreifacher Ausführung auf der Chip-Oberfläche immobilisiert waren. Es wurden Zweifarb-Experimente durchgeführt, d. h. die RNA der Kontrollbedingung und der zu vergleichenden Stressbedingung wurden während ihrer Transkription in cDNA mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert und hybridisierten anschließend gleichzeitig mit dem Chip (2.4.4, 2.4.5). Als Farbstoffe wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die cDNA der Kontrollbedingung wurde anfänglich mit dem Cy5-Farbstoff markiert, die cDNA der Stressbedingung mit Cy3. Da von den beiden Farbstoffen Cy5 besser als Cy3 in die entstehende cDNA eingebaut wird, können verfälschte Signalintensitäten detektiert werden (Loos *et al.*, 2001, Petersohn *et al.*, 2001). Um dieses zu vermeiden, wurden die RNAs in nachfolgenden Experimenten jeweils wechselseitig markiert und die erhaltenen Intensitäten gemittelt. Zur statistischen Absicherung der Chip-Experimente wurde RNA von mindestens zwei unabhängig voneinander kultivierten Zellkulturen präpariert und pro Wachstumsbedingung wurden mindestens drei Chip-Experimente durchgeführt. Die Auswertung der Chip-Experimente erfolgte mit der Software *QuantArray* (Packard BioScience, CT, USA), mit der die Induktions- und Repressionswerte der Proben bestimmt und Mittelwerte der drei unabhängigen Experimente gebildet wurden. Zur grafischen Darstellung und weiterer Analyse wurde die Software *GeneSpring* 3.2.12 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) verwendet. Mit dieser wurden Scatter Plots erstellt (als Beispiel s. Abb. 15), in denen die Fluoreszenzwerte der ORFs und damit indirekt ihre Expressionsverhältnisse aufgetragen wurden. Im abgebildeten Beispiel sind auf der X-Achse die Expressionswerte nach vier Stunden

Stickstoff-Limitation und auf der Y-Achse die Expressionswerte unter der Kontrollbedingung CgC-Medium aufgetragen. Die ORFs, die unter beiden Bedingungen gleich stark exprimiert waren und demnach gleiche Fluoreszenzwerte hatten, liegen auf der Winkelhalbierenden. Die Linien ober- bzw. unterhalb der Winkelhalbierenden markierten Fluoreszenzwert-Unterschiede und demnach Genexpressionsänderungen um einen Faktor von zwei. Als reguliert galten Gene, deren Expression unter der Stressbedingung um mindestens diesen Faktor im Vergleich zur Kontrolle induziert oder reprimiert war (siehe 3.6.4).

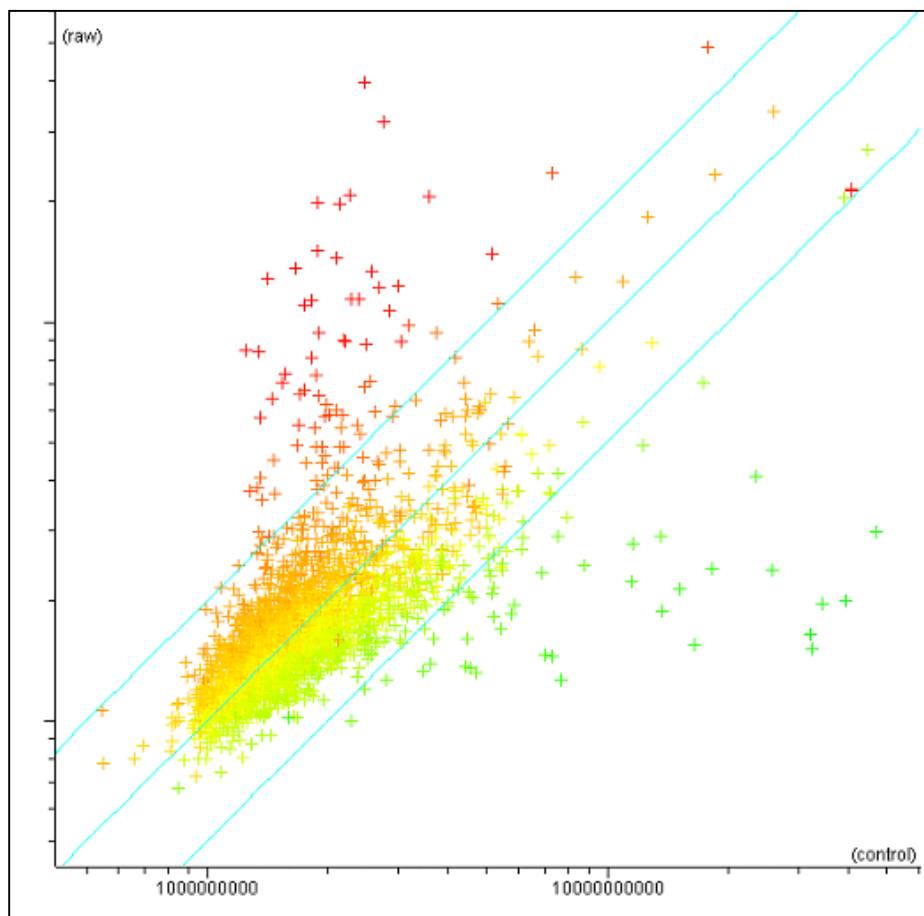


Abb. 15: Graphische *GeneSpring*-Darstellung eines Chip-Experiments am Beispiel von vier Stunden Stickstoff-Limitation. Auf der X-Achse sind die Fluoreszenzwerte der ORFs unter N-Limitation aufgetragen, auf der Y-Achse die Fluoreszenzwerte unter der Kontrollbedingung (N-Überschuss). Die Linien ober- bzw. unterhalb der Winkelhalbierenden markierten Fluoreszenzwert-Unterschiede und demnach Genexpressionsänderungen um einen Faktor von zwei. Die Genexpression von ca. 55 ORFs (grün dargestellt) war nach vier stündiger Limitation mindestens zweifach stärker induziert als in der N-Überschusskontrolle, während die Genexpression von ca. 60 ORFs (rot dargestellt) unter N-Limitation mindestens zweifach reprimiert war.

### 3.6.1 Das Transkriptom nach 10 und 30 Minuten Stickstoff-Limitation

Jeweils vier Chip-Experimente zum Transkriptom nach 10- sowie 30 minütigem Wachstum in Stickstoff-freiem Medium wurden durchgeführt. Als Kontrolle diente für alle Experimente RNA von Zellen, die nach dem Pelletieren für 30 Minuten in CgC-Medium inkubiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von 69 Genen unter N-Limitation mit mindestens einem Faktor von zwei induziert und die Expression von 67 Genen mit mindestens diesem Faktor reprimiert war (Tab. 3, Tab. 4). Unter den induzierten Genen befanden sich sämtliche bereits als N-abhängig bekannte Gene, namentlich *glnA*, *glnD*, *glnK*, *amt*, *amtB*, *gdh*, *gltBD*, *soxA*, *ocd* und ORF 454 (kodiert für das putative Membranprotein VarS).

Zusätzlich konnte die Expression weiterer Gene als N-abhängig charakterisiert werden, nämlich des Gen *glnE*, welches für die ATase kodiert, sowie die Expression der *ureABCDE*-Gene, welche für Untereinheiten und akzessorische Proteine der Urease kodieren. Weiterhin wurde verstärkte Genexpression von *oppA*, *oppB* und *oppD*, welche für das Homolog eines Oligopeptid-Aufnahmesystems kodieren, detektiert, außerdem der Gene *livF*, *livG*, *livH* und *livM*, deren homologe Genprodukte in den Leucin-Transport involviert sind, sowie der Gene *gluA*, *gluB* und *gluC*, deren Genprodukte einen ABC-Transporter für die Glutamat-Aufnahme bilden. Die Expression von *lrp* (ORF 674), der für einen globalen Regulator kodiert, und die Expression von *azlC* (ORF 676), welcher für ein Transportsystem für verzweigt-kettige Aminosäuren kodiert, war ebenfalls induziert. Sechs induzierte Gene kodierten für weitere z. T. putative Transporter sowie fünf ORFs für regulatorische Elemente. Weiterführende Experimente mit den entsprechenden Deletionsmutanten könnten Aufschluss über die Substratspezifität der Transportsysteme bzw. die Funktion der regulatorischen Elemente geben.

Tab. 3: Induzierte Gene nach 10 und 30 Minuten Stickstoff-Limitation. Die angegebenen Gene waren mit mindestens einem Faktor von zwei im Vergleich zur Kontrolle reguliert. Gennamen von *C. glutamicum* und solche, die im Text erwähnt werden, sind angegeben. Die Abkürzung "str. sim." steht für "strong similarity", "hyp." steht für "hypothetical", "prot." steht für "protein", "put. fr." steht für "putative frameshift", "put. sequ. err." steht für "putative sequencing error".

| ORF | Gen | Protein bzw. Homolog nach Genomannotation  |
|-----|-----|--|
| 10  |     | str. sim. to p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase <i>pchA</i> ( <i>Pseudomonas putida</i> ) |
| 23  |     | str. sim. to IMP dehydrogenase <i>guaB</i> ( <i>Bacillus subtilis</i> )                    |
| 155 |     | sim. to transcriptional repressor <i>smtB</i> ( <i>Synechococcus</i> sp.)                  |
| 156 |     | str. sim. to hyp. cation transport protein Rv2025c ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )   |

---

|      |             |   |
|------|-------------|---|
| 191  |             | sim. to endonuclease <i>mrr</i> ( <i>Escherichia coli</i> )   |
| 281  |             | sim. to dimethylaniline monooxygenase FMO1 ( <i>Sus scrofa domestica</i> )  |
| 374  |             | str. sim. to hyp. prot. sll0788 ( <i>Synechocystis</i> sp.)   |
| 454  | <i>varS</i> | str. sim. to virginiamycin S resistance protein <i>varS</i> ( <i>Streptomyces virginiae</i> )                               |
| 455  |             | str. sim. to creatinine deaminase ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 466  | <i>ureA</i> | urease gamma subunit ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 467  | <i>ureB</i> | urease beta subunit ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 468  | <i>ureC</i> | urease alpha subunit ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 469  | <i>ureE</i> | urease accessory protein ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 472  | <i>ureD</i> | urease-associated protein ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 573  | <i>gltB</i> | glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase large subunit ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 575  | <i>gltD</i> | glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase small subunit [put. fr.] ( <i>C. glutamicum</i> )                                 |
| 591  |             | weak sim. to probable proton/oligopeptide symporter <i>yjdL</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 617  |             | str. sim. to hyp. 15.9 kD prot. in PTPA 5'-region SCQ11.05c ( <i>Streptomyces coelicolor</i> )                              |
| 674  | <i>Irp</i>  | leucine responsive regulator ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 676  | <i>azlC</i> | branched-chain amino acid transporter ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 679  |             | sim. to transcription repressor <i>smtB</i> ( <i>Synechocystis</i> sp.)   |
| 701  |             | str. sim. to regulatory protein <i>whiB</i> ( <i>S. coelicolor</i> )  |
| 749  |             | hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 1173 |             | str. sim. to DtxR/iron regulated lipoprotein precursor <i>irp1</i> [put. sequ. err.] ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ) |
| 1206 |             | methyl citrate synthase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 1245 |             | str. sim. to trehalose/maltose binding protein <i>malE</i> ( <i>Thermococcus litoralis</i> )                                |
| 1330 |             | hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 1381 |             | str. sim. to putative integral membrane protein SC18.08c ( <i>S. coelicolor</i> )   |
| 1499 | <i>livH</i> | str. sim. to leucine transport protein <i>livH</i> ( <i>E. coli</i> )   |
| 1500 | <i>livM</i> | sim. to leucine transport protein <i>livM</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 1501 | <i>livG</i> | str. sim. to high-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein <i>livG</i> ( <i>E. coli</i> )           |
| 1502 | <i>livG</i> | str. sim. to high-affinity branched-chain amino acid transport LIV-I system LivG protein ( <i>Salmonella typhimurium</i> )  |
| 1582 |             | str. sim. to lactam utilization protein <i>lamB</i> ( <i>Emericella nidulans</i> ) [put. fr.]                               |
| 1625 |             | sim. to frenolicin biosynthetic protein <i>frnS</i> ( <i>S. roseofulvus</i> )   |
| 1626 |             | str. sim. to sulfate transport protein, high affinity HVST1 ( <i>Hordeum vulgare</i> )                                      |
| 1853 |             | sim. to glutamyl-tRNA amidotransferase subunit C <i>gatC</i> ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 1888 | <i>mez</i>  | malic enzyme <i>mez</i> ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 1892 |             | weak sim. to vancomycin resistance protein <i>vanZ</i> ( <i>Enterococcus faecium</i> )                                      |
| 1901 |             | weak sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 1949 |             | questionable ORF  |
| 2041 | <i>gluB</i> | glutamate-binding protein <i>gluB</i> precursor ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2042 | <i>gluC</i> | glutamate transport system permease protein ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2093 | <i>oppA</i> | sim. to oligopeptide-binding protein <i>oppA</i> [put. fr.] ( <i>E. coli</i> )  |
| 2094 | <i>oppB</i> | str. sim. to oligopeptide transport system permease protein <i>oppB</i> ( <i>B. subtilis</i> )                              |
| 2146 |             | str. sim. to iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein <i>fecb</i> ( <i>E. coli</i> )                                 |
| 2173 | <i>glnD</i> | uridylyltransferase UTase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2175 | <i>glnK</i> | signal transduction protein GlnK ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2176 | <i>amtP</i> | low affinity ammonium uptake protein <i>amtP</i> ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2177 |             | hyp. prot.  |
| 2180 |             | sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2199 |             | str. sim. to hyp. prot. Rv2927c ( <i>M. tuberculosis</i> )  |
| 2203 | <i>gdh</i>  | glutamate dehydrogenase (NADP+) ( <i>C. glutamicum</i> )  |

---

|      |             |   |
|------|-------------|---|
| 2475 |             | weak sim. to sarcosine oxidase ( <i>B. sp.</i> )  |
| 2478 | <i>soxA</i> | sarcosine oxidase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2479 | <i>ocd</i>  | putative ornithine-cyclodecarboxylase ( <i>C. glutamicum</i> )                                      |
| 2480 | <i>amt</i>  | ammonium transporter ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2515 |             | str. sim. to dihydroorotase <i>pyrC</i> ( <i>Lactobacillus leichmannii</i> )                        |
| 2686 |             | questionable ORF  |
| 2912 |             | sim. to transposase <i>tnpA</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 3039 |             | sim. to conserved hyp. prot. DR1844 ( <i>Deinococcus radiodurans</i> )                              |
| 3102 | <i>oppD</i> | str. sim. to oligopeptide transport ATP-binding protein <i>oppD</i> [put. fr.] ( <i>L. lactis</i> ) |
| 3222 | <i>glnE</i> | str. sim. to glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase <i>glnE</i> ( <i>S. coelicolor</i> )      |
| 3218 |             | str. sim. to hyp. prot. MLCB268.21c ( <i>M. leprae</i> )  |
| 3236 | <i>glnA</i> | glutamine synthetase I ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 3241 |             | str. sim. to hyp. prot. <i>yidE</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 3338 |             | hyp. prot.  |
| 3530 |             | str. sim. to hyp. ABC transporter integral membrane protein SCF76.15c ( <i>S. coelicolor</i> )      |
| 3542 |             | str. sim. to L-arabinose transport permease <i>araE</i> ( <i>B. subtilis</i> )                      |
| 3578 |             | sim. to probable transcription regulator SCE68.13 ( <i>S. coelicolor</i> )                          |

Reprimiert nach 10- und 30 minütiger Stickstoff-Limitation war die Expression von Genen, deren Produkte homolog zu Proteinen der Cystein-Synthese *cysH*, *cysK* und *cysN* sind. Ebenso war die Expression von 10 für putative ribosomale Proteine kodierende Gene reprimiert, sowie von mehreren Genen, deren Produkte in Prozesse der Zuckeraufnahme (*ptsI*, *fruA*, *sacB*) und des Kohlenstoff-Metabolismus involviert sind. Hier sind besonders die Gene interessant, die für Proteine der Glykolyse kodieren, namentlich *gap* (GAP-DH), *pgk* (Phosphoglycerat-Kinase) und *eno* (Enolase). Die beobachtete Repression insbesondere des *gap*-Gens steht im Widerspruch zu früher veröffentlichten Ergebnissen (s. Diskussion). Eine Vielzahl der reprimierten ORFs kodierte für Proteine unbekannter Funktion.

Generell konnte beobachtet werden, dass *C. glutamicum* nur mit niedrigen Änderungen der Induktion bzw. Repression der Genexpression auf Stickstoff-Limitation reagierte. Maximale Änderungen unter N-Limitation lagen bei einem Faktor von acht im Vergleich zur N-Überschussskontrolle, wobei der Hauptteil mit einem ungefähren Faktor von vier reguliert war (s. Diskussion).

Tab. 4: Reprimierte Gene nach 10- und 30 minütiger Stickstoff-Limitation. Die angegebenen Gene waren mit mindestens einem Faktor von zwei in Bezug zur Kontrolle reguliert. Gennamen von *C. glutamicum* und solche, die im Text erwähnt werden, sind angegeben. Abkürzungen wie in Tab. 3.

| ORF  | Gen         | Protein bzw. Homolog nach Genomannotation   |
|------|-------------|---|
| 65   | <i>porA</i> | porin ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 90   |             | hyp. prot.  |
| 193  |             | str. sim. to hyp. prot. <i>ytnM</i> ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 195  | <i>cysN</i> | str. sim. to sulfate adenylyltransferase, large chain <i>cysN</i> ( <i>E. coli</i> )                      |
| 197  | <i>cysH</i> | str. sim. to 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase <i>cysH</i> ( <i>B. subtilis</i> )           |
| 198  |             | sim. to hyp. prot. SCBAC1A6.25c ( <i>S. coelicolor</i> )  |
| 199  |             | str. sim. to nitrite reductase <i>nirA</i> ( <i>Anabaena</i> sp.)   |
| 200  |             | str. sim. to ferredoxin-NADP+ reductase ( <i>Bos taurus</i> )   |
| 312  |             | str. sim. to shikimate transport protein <i>shiA</i> ( <i>E. coli</i> )                                   |
| 348  |             | str. sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 458  |             | weak sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 688  |             | questionable ORF  |
| 795  |             | str. sim. to low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase <i>epsP</i> ( <i>P. solanacearum</i> )     |
| 799  |             | str. sim. to galactosyltransferase <i>rfbP</i> ( <i>Campylobacter hyoilei</i> )                           |
| 854  |             | sim. to hyp. prot. SCC75A.17c ( <i>S. coelicolor</i> )  |
| 976  |             | str. sim. to 50S ribosomal protein L10 <i>rplJ</i> ( <i>S. coelicolor</i> )                               |
| 992  |             | str. sim. to ribosomal prot. S3 ( <i>B. stearothermophilus</i> )  |
| 1018 |             | str. sim. to 50S ribosomal prot. L6 <i>rplF</i> ( <i>Synechococcus</i> sp.) [put. fr.]                    |
| 1154 | <i>metY</i> | O-acetylhomoserine sulfhydrylase ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 1170 |             | str. sim. to iron transport membrane protein <i>irp1C</i> ( <i>C. diphtheriae</i> )                       |
| 1315 |             | str. sim. to hyp. prot. Rv2606c ( <i>M. tuberculosis</i> )  |
| 1354 |             | str. sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 1362 |             | sim. to hyp. prot. Rv0867c ( <i>M. tuberculosis</i> )   |
| 1451 | <i>betP</i> | glycine betaine transporter [put. fr.] ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 1549 | <i>eno</i>  | enolase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 1743 |             | hyp. prot.  |
| 1744 |             | str. sim. to ATP-dependent RNA helicase <i>deaD</i> [put. fr.] ( <i>E. coli</i> )                         |
| 2018 | <i>ptsI</i> | phosphotransferase system enzyme I ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2021 | <i>fruA</i> | phosphotransferase system II BC, fructose-specific ( <i>C. glutamicum</i> )                               |
| 2084 |             | weak sim. to translation initiation factor IF-2 [put. fr.] ( <i>B. subtilis</i> )                         |
| 2167 |             | str. sim. to 30S ribosomal prot. S16 <i>rpsP</i> ( <i>B. subtilis</i> ) [put. fr.]                        |
| 2195 |             | str. sim. to <i>gepB</i> ( <i>Dichelobacter nodosus</i> )   |
| 2262 |             | str. sim. to general stress protein 39 <i>ydaD</i> ( <i>B. subtilis</i> )                                 |
| 2329 |             | weak sim. to secreted peptidoglycan lytic protein P45 ( <i>Listeria monocytogenes</i> ) [put. pseudogene] |
| 2485 | <i>tpi</i>  | triose-phosphate isomerase ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2486 | <i>pgk</i>  | phosphoglycerate kinase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2487 | <i>gap</i>  | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2591 |             | str. sim. to cytidylate kinase <i>cmk</i> ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 2614 |             | str. sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2653 |             | weak sim. to late embryogenesis abundant protein group 3 ( <i>Glycine max</i> )                           |
| 2752 |             | hyp. prot.  |
| 2795 |             | str. sim. to hyp. prot. Rv3104c ( <i>M. tuberculosis</i> )  |
| 2872 |             | questionable ORF  |

|      |             |   |
|------|-------------|---|
| 2890 | <i>cysK</i> | str. sim. to cysteine synthase <i>cysK</i> ( <i>B. subtilis</i> )                               |
| 2895 |             | str. sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2918 |             | weak sim. to hyp. prot. ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2998 |             | str. sim. to L-arabinose transport protein <i>araQ</i> ( <i>B. subtilis</i> )                   |
| 3000 |             | str. sim. to maltose-binding protein <i>amyE</i> ( <i>T. thermosulfurigenes</i> )               |
| 3087 |             | questionable ORF  |
| 3142 |             | str. sim. to hyp. prot. <i>scc77.19c</i> ( <i>S. coelicolor</i> )                               |
| 3269 |             | str. sim. to Cop associated protein <i>copP</i> ( <i>Helicobacter pylori</i> )                  |
| 3458 |             | str. sim. to iron binding lipoprotein <i>sirA</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> )              |
| 3469 |             | sim. to hyp. prot. AF0251 ( <i>Archaeoglobus fulgidus</i> )                                     |
| 3553 |             | str. sim. to ribosomal protein L3 <i>rplC</i> ( <i>B. subtilis</i> )                            |
| 3568 |             | str. sim. to maltodextrin phosphorylase <i>malP</i> ( <i>E. coli</i> ) [put. fr.]               |
| 3684 |             | sim. to cytochrome-c oxidase chain II precursor <i>coxII</i> ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ) |
| 3735 | <i>sacB</i> | str. sim. to phosphotransferase system enzyme II <i>sacB</i> ( <i>L. lactis</i> )               |
| 3765 |             | weak sim. to hyp. oxidoreductase TM1009 ( <i>T. maritima</i> )                                  |
| 3767 |             | str. sim. to cold shock protein <i>csp</i> ( <i>Arthrobacter globiformis</i> )                  |
| 3771 |             | sim. to hyp. o-methyl transferase <i>mdmC</i> [put. fr.] ( <i>Acinetobacter</i> sp.)            |
| 3775 |             | str. sim. to ribosomal protein L23 <i>rplW</i> ( <i>B. subtilis</i> )                           |
| 3776 |             | str. sim. to ribosomal protein S19 <i>rpsS</i> ( <i>B. subtilis</i> )                           |
| 3777 |             | str. sim. to ribosomal protein S19 <i>rpsS</i> ( <i>B. subtilis</i> )                           |
| 3778 |             | str. sim. to ribosomal protein L22 <i>rplV</i> ( <i>E. coli</i> )                               |
| 3798 |             | str. sim. to ribosomal protein S6 <i>rpsF</i> ( <i>B. subtilis</i> )                            |

### 3.6.2 Das Transkriptom nach vier Stunden Stickstoff-Limitation

Zur Analyse des Transkriptoms nach vier stündiger N-Limitation wurden drei Chip-Experimente durchgeführt. Auch hier war die Kontrolle RNA von Zellen nach 30 minütigem Wachstum in CgC-Medium. Die Induktions- bzw. Repressionswerte der drei unabhängigen Experimente wurden gemittelt. Nach vier Stunden N-Limitation war die Expression von 60 Genen mit mindestens einem Faktor von zwei induziert und die Expression 80 Genen mit mindestens diesem Faktor reprimiert (Abb. 15, Tab. 5). Die Ergebnisse waren ähnlich zu denen nach 10- und 30 minütiger N-Limitation. Die Expression der bereits bekannten Gene des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle war noch induziert, ebenso der *liv*-Gene *livF*, *livG*, *livH* und *livM*. Zusätzlich war die Expression des zuvor nicht detektierten *glnH* (ORF 118), dessen Genprodukt homolog zu einem Glutamin-Bindeprotein ist, induziert, sowie von *narH* (ORF 1785), das für eine putative Nitrat-Reduktase kodiert. Die Expression von *gltT* (ORF 2905), dessen Genprodukt homolog zu einem H<sup>+</sup>/Glutamat-Symportprotein von *B. subtilis* ist, war ebenfalls induziert. Da das zweite, bisher nur biochemisch charakterisierte Aufnahmesystem für Glutamat in *C. glutamicum* noch nicht identifiziert wurde (s. Einleitung), erschien die Detektion dieses ORFs interessant. Weiterführende BLAST-Analysen der Proteinsequenz innerhalb der NCBI-Datenbank



([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)), welche auf einer anderen Genomannotation basiert, zeigten jedoch, dass ORF 2905 (dort als NCg12683 bezeichnet) für einen H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Dicarboxylat-Transporter von *C. glutamicum* kodiert. Weiterhin war nach vier stündigem N-Hunger die Genexpression zweier 2-Komponenten-Systeme (ORF 133 und ORF 374) induziert, ebenfalls zweier Deaminasen (ORF 455: Creatinin-Deaminase, und ORF 239: dCTP-Deaminase) sowie die Expression von *appF* (ORF 2965), welches das putative Bindeprotein eines weiteren Oligopeptid-Transportsystems kodiert. Auch die Expression von ORF 1174, dessen Genprodukt starke Ähnlichkeit zum *catabolite repression control protein* Crc aufweist, war nach vier Stunden N-Limitation induziert. Für dieses Protein wurde von Yuste *et al.* (2001) in *Pseudomonas putida* eine Funktion bei der Kataboliten-Repression einiger Stoffwechselwege Stickstoff-haltiger Komponenten beschrieben. Die Expression der Gene *cysK* und *cysH*, die nach 10- und 30 minütiger Stickstoff-Limitation reprimiert waren, waren nach vier stündiger N-Limitation induziert. Ähnlich zu den Ergebnissen nach 10 und 30 Minuten N-Limitation wurden nur geringe Änderungen der Induktion bzw. Repression der Genexpression ermittelt, mit maximalen Änderungen von einem Faktor von acht, wobei der Hauptteil mit einem ungefähren Faktor von vier reguliert war.

Tab. 5: Induzierte Gene nach vier Stunden Stickstoff-Limitation. Die angegebenen Gene waren mit mindestens einem Faktor von zwei im Vergleich zur Kontrolle reguliert. Gennamen von *C. glutamicum* und solche, die im Text erwähnt werden, sind angegeben. Abkürzungen wie in Tab. 3.

| ORF | Gen         | Protein bzw. Homolog nach Genomannotation  |
|-----|-------------|--|
| 21  |             | str. sim. to hyp. prot. Rv3592 ( <i>M. tuberculosis</i> )  |
| 118 | <i>glnH</i> | sim. to glutamine-binding protein ( <i>B. stearothermophilus</i> )                                     |
| 134 | <i>chiS</i> | sim. to two-component sensor kinase <i>chiS</i> ( <i>S. thermoviolaceus</i> )                          |
| 197 | <i>cysH</i> | str. sim. to 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase <i>cysH</i> ( <i>B. subtilis</i> )        |
| 226 |             | str. sim. to 3-methyladenine-DNA glycosylase I <i>tagI</i> ( <i>E. coli</i> )                          |
| 237 |             | sim. to probable membrane protein SCQ11.10c ( <i>S. coelicolor</i> )                                   |
| 238 |             | str. sim. to UDP-glucose 6-dehydrogenase <i>rkpK</i> ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )                 |
| 239 | <i>dcd</i>  | str. sim. to dCTP deaminase ( <i>E. coli</i> )   |
| 266 |             | str. sim. to polyketide synthase <i>mas</i> ( <i>M. tuberculosis</i> )                                 |
| 289 |             | sim. to transcription regulator <i>farR</i> ( <i>E. coli</i> )   |
| 306 |             | str. sim. to L-lactate dehydrogenase <i>ldh</i> ( <i>B. caldolyticus</i> )                             |
| 313 |             | str. sim. to L-lactate dehydrogenase <i>lldA</i> ( <i>Neisseria meningitidis</i> )                     |
| 337 | <i>chrS</i> | sim. to two-component signal transduction system histidine kinase ( <i>C. diphtheriae</i> ) [put. fr.] |
| 375 |             | str. sim. to copper-transporting ATPase ( <i>Enterococcus</i> sp.)                                     |
| 408 |             | str. sim. to hyp. prot. Rv0011c ( <i>M. tuberculosis</i> )   |
| 427 |             | str. sim. to hyp. prot. scf56.05 ( <i>S. coelicolor</i> )  |

---

|      |             |   |
|------|-------------|---|
| 450  | <i>bioB</i> | biotin synthase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 451  |             | str. sim. to probable protein phosphatase protein <i>ppp</i> ( <i>M. tuberculosis</i> )                                   |
| 454  | <i>varS</i> | str. sim. to virginiamycin S resistance protein <i>varS</i> ( <i>S. virginiae</i> )                                       |
| 455  | -           | str. sim. to creatinine deaminase ( <i>B. sp.</i> )   |
| 466  | <i>ureA</i> | urease gamma subunit ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 467  | <i>ureB</i> | urease beta subunit ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 468  | <i>ureC</i> | urease alpha subunit ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 469  | <i>ureE</i> | urease accessory protein ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 573  | <i>gltB</i> | glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase large subunit ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 575  | <i>gltD</i> | glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase small subunit [put. fr.] ( <i>C. glutamicum</i> )                               |
| 1129 |             | str. sim. to DNA photolyase <i>phrA</i> ( <i>M. smegmatis</i> )   |
| 1160 |             | str. sim. to hyp. prot. Rv1130 ( <i>M. tuberculosis</i> )   |
| 1175 | <i>crc</i>  | str. sim. to catabolite repression control protein <i>Crc</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )                                    |
| 1188 |             | str. sim. to ferrichrome transport ATP-binding protein <i>fhuC</i> ( <i>E. coli</i> )                                     |
| 1191 |             | sim. to probable secreted prot. SC6G10.08c ( <i>S. coelicolor</i> )   |
| 1196 |             | str. sim. to N-acyl-L-amino acid amidohydrolase <i>amaA</i> ( <i>B. stearrowthermophilus</i> )                            |
| 1281 |             | str. sim. to hyp. prot. Rv3241c ( <i>M. tuberculosis</i> )  |
| 1395 |             | str. sim. to thymidylate synthase <i>thyA</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 1397 |             | str. sim. to probable ATP-dependent helicase <i>lhr</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 1388 |             | str. sim. to fatty-acid synthase <i>fas</i> ( <i>Brevibacterium sp.</i> )   |
| 1499 | <i>livH</i> | str. sim. to leucine transport protein ( <i>E. coli</i> )   |
| 1500 | <i>livM</i> | sim. to leucine transport protein ( <i>E. coli</i> )  |
| 1501 | <i>livG</i> | str. sim. to high-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein ( <i>E. coli</i> )                     |
| 1502 | <i>livF</i> | str. sim. to high-affinity branched-chain amino acid transport LIV-I system <i>LivG</i> protein ( <i>S. typhimurium</i> ) |
| 1785 | <i>narH</i> | str. sim. to nitrate reductase beta chain ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 2175 | <i>glnK</i> | signal transduction protein <i>GlnK</i> ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2176 | <i>amtB</i> | low affinity ammonium uptake protein ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2425 | <i>acn</i>  | aconitase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2452 |             | sim. to multidrug resistance protein 1 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )   |
| 2474 | <i>devb</i> | glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2478 | <i>soxA</i> | sarcosine oxidase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2479 | <i>ocd</i>  | putative ornithine-cyclodecarboxylase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 2480 | <i>amt</i>  | ammonium transporter ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 2727 |             | str. sim. to ATP-dependent DNA helicase <i>recG</i> ( <i>E. coli</i> )  |
| 2754 |             | hyp. prot.  |
| 2890 | <i>cysK</i> | str. sim. to cysteine synthase <i>cysK</i> ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 2905 | <i>gltT</i> | str. sim. to H <sup>+</sup> /glutamate symport protein ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 2965 | <i>appF</i> | str. sim. to oligopeptide transport ATP-binding protein ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 2966 | <i>oppD</i> | sim. to oligopeptide transport ATP-binding protein [put. fr.] ( <i>B. subtilis</i> )                                      |
| 3236 | <i>glnA</i> | glutamine synthetase I ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 3472 |             | str. sim. to nonheme ferritin <i>ftn</i> ( <i>E. coli</i> )   |
| 3700 |             | str. sim. to malate dehydrogenase <i>mdh</i> ( <i>Aquaspirillum arcticum</i> )  |

Stark reprimiert nach vier Stunden N-Limitation (Tab. 6) war die Expression mehrerer ORFs, die für Proteine kodierten, welche für das Zellwachstum notwendig sind, so z. B. von 28 Homologen ribosomaler Proteine, von zwei Translationsinitiations-Faktoren, von zwei Elongationsfaktoren sowie der ATP-Synthase-Gene *atpA*, *atpB*, *atpG* und *atpH*. Von den Genen der N-Kontrolle war die Expression der *gdh* (ORF 2203, Glutamat-DHG) reprimiert, außerdem des für das Glutamat-Bindeprotein kodierenden *gluB* (ORF 2041). Die Expression des Gens *oppA*, welches für das Homolog eines Oligopeptid-Aufnahmesystems kodiert und nach 10- und 30 minütiger N-Limitation induziert war, war nach vier Stunden N-Limitation reprimiert.

Tab. 6: Reprimierte Gene nach vier Stunden Stickstoff-Limitation. Die angegebenen Gene waren mit mindestens einem Faktor von zwei im Vergleich zur Kontrolle reguliert. Gennamen von *C. glutamicum* und solche, die im Text erwähnt werden, sind angegeben. Abkürzungen wie in Tab. 3.

| ORF  | Gen         | Protein bzw. Homolog nach Genomannotation   |
|------|-------------|---|
| 64   |             | str. sim. to alternative sigma factor for siderophore production <i>pvdS</i> ( <i>M. tuberculosis</i> ) |
| 403  |             | sim. to single-stranded DNA-binding protein <i>ssb</i> ( <i>B. subtilis</i> )                           |
| 462  |             | str. sim. to lipase <i>lipA</i> ( <i>Str. cinnamomeus</i> )   |
| 646  | <i>aat</i>  | aspartate transferase ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 828  |             | str. sim. to probable transcription regulator Rv0465c ( <i>M. tuberculosis</i> )                        |
| 926  |             | sim. to probable transcription regulator Rv3678c ( <i>M. tuberculosis</i> )                             |
| 964  | <i>rplk</i> | 50S ribosomal protein L11 ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 965  | <i>rpla</i> | str. sim. to ribosomal prot. L1 ( <i>B. stearothermophilus</i> )  |
| 976  | <i>rplJ</i> | str. sim. to 50s ribosomal protein L10 ( <i>S. coelicolor</i> )   |
| 978  | <i>rplL</i> | str. sim. to 50S ribosomal protein L12 ( <i>S. coelicolor</i> )   |
| 990  | <i>fusA</i> | str. sim. to translation elongation factor EF-G ( <i>E. coli</i> )                                      |
| 991  | <i>tuf</i>  | elongation factor EF-Tu ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 992  | <i>rpsc</i> | str. sim. to ribosomal protein S3 ( <i>B. stearothermophilus</i> )                                      |
| 993  | <i>rplp</i> | str. sim. to ribosomal protein L16 ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 994  | <i>rpmc</i> | str. sim. to ribosomal protein L29 ( <i>B. stearothermophilus</i> )                                     |
| 999  | <i>rpln</i> | str. sim. to ribosomal protein L14 ( <i>B. stearothermophilus</i> )                                     |
| 1000 | <i>rplx</i> | str. sim. to ribosomal protein L24 ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 1017 | <i>rpsc</i> | str. sim. to ribosomal protein S8 ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 1018 | <i>rplF</i> | str. sim. to 50S ribosomal protein [put. fr.] ( <i>Synechococcus</i> sp.)                               |
| 1022 | -           | str. sim. to ribosomal protein S5 ( <i>B. stearothermophilus</i> )                                      |
| 1023 | <i>rpmD</i> | str. sim. to ribosomal protein L30 ( <i>Acyrtosiphon kondoi</i> )                                       |
| 1044 | <i>infa</i> | str. sim. to translation initiation factor IF-1 ( <i>B. subtilis</i> )                                  |
| 1046 | <i>rpsm</i> | str. sim. to 30S ribosomal protein S13 ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 1047 | <i>rpsk</i> | str. sim. to 30S ribosomal protein S11 ( <i>B. subtilis</i> )   |
| 1048 | <i>rpsd</i> | str. sim. to 30S ribosomal protein S4 ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 1049 |             | str. sim. to DNA-directed RNA polymerase alpha chain ( <i>S. coelicolor</i> )                           |
| 1050 | <i>rplq</i> | str. sim. to 50S ribosomal protein L17 ( <i>E. coli</i> )   |

|      |              |   |
|------|--------------|---|
| 1069 | <i>rpIM</i>  | str. sim. to ribosomal protein L13 ( <i>S. carnosus</i> )                                     |
| 1070 | <i>rpsI</i>  | str. sim. to 30S ribosomal protein S9 ( <i>E. coli</i> )                                      |
| 1223 | <i>dtsr</i>  | detergent sensitivity rescuer dtsR1 protein ( <i>C. glutamicum</i> )                          |
| 1245 |              | str. sim. to trehalose/maltose binding protein malE ( <i>Th. litoralis</i> )                  |
| 1306 |              | str. sim. to DNA helicase II ( <i>E. coli</i> )   |
| 1418 | <i>rpsr2</i> | sim. to 30S ribosomal protein S18 rps18 ( <i>Cyanophora paradoxa cyanelle</i> )               |
| 1419 | <i>rpsn2</i> | str. sim. to 30S ribosomal protein S14 ( <i>E. coli</i> )                                     |
| 1420 | <i>rpmg</i>  | str. sim. to ribosomal protein L33 [put. sequ. error] ( <i>E. coli</i> )                      |
| 1421 | <i>rpmB2</i> | str. sim. to ribosomal protein L28 ( <i>E. coli</i> )   |
| 1722 | <i>metE</i>  | cobalamin-independent methionine synthase ( <i>C. glutamicum</i> )                            |
| 1659 |              | str. sim. to cobalt transport ATP-binding protein ( <i>S. typh.</i> )                         |
| 1774 |              | str. sim. to tripeptidyl aminopeptidase precursor ( <i>S. lividans</i> )                      |
| 1775 | <i>argS</i>  | arginine-tRNA ligase ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 1807 | <i>atpB</i>  | str. sim. to H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase protein 6 ( <i>S. lividans</i> )       |
| 1810 | <i>atpH</i>  | str. sim. to H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase delta chain ( <i>S. lividans</i> )     |
| 1811 | <i>atpA</i>  | str. sim. to H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase alpha chain ( <i>S. lividans</i> )     |
| 1812 | <i>atpG</i>  | str. sim. to H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase gamma chain ( <i>S. lividans</i> )     |
| 1832 |              | str. sim. to hyp. prot. Rv3037c ( <i>M. tuberculosis</i> )                                    |
| 1849 |              | str. sim. to putative DNA polymerase III SCL2.24 ( <i>S. coelicolor</i> )                     |
| 2041 | <i>gluB</i>  | glutamate-binding protein gluB precursor ( <i>C. glutamicum</i> )                             |
| 2092 | <i>oppA</i>  | sim. to oligopeptide-binding protein [put. fr.] ( <i>E. coli</i> )                            |
| 2093 | <i>oppA</i>  | sim. to oligopeptide-binding protein [put. fr.] ( <i>E. coli</i> )                            |
| 2134 | <i>rpsB</i>  | str. sim. to 30S ribosomal protein S2 ( <i>S. coelicolor</i> )                                |
| 2146 |              | str. sim. to iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein <i>fecB</i> ( <i>E. coli</i> )   |
| 2203 | <i>gdh</i>   | glutamate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> ) ( <i>C. glutamicum</i> )                         |
| 2526 | <i>efp</i>   | elongation factor p ( <i>Brevibacterium lactofermentum</i> )                                  |
| 2647 | <i>rpmI</i>  | str. sim. to 50S ribosomal protein L35 ( <i>Mycoplasma fermentans</i> )                       |
| 2648 | <i>infC</i>  | str. sim. to translation initiation factor IF-3 ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> )            |
| 2675 | <i>rpsA</i>  | sim. to ribosomal protein S1 ( <i>E. coli</i> )   |
| 2790 | <i>ilvC</i>  | ketol-acid reductoisomerase ilvC ( <i>C. glutamicum</i> )                                     |
| 2792 | <i>ilvN</i>  | acetolactate synthase small chain ( <i>C. glutamicum</i> )                                    |
| 2881 |              | str. sim. to succinyl-CoA: Coenzyme A transferase <i>cat1</i> ( <i>Clostridium kluyveri</i> ) |
| 2865 |              | sim to D-alanine aminotransferase <i>dat</i> ( <i>B. sphaericus</i> )                         |
| 2998 |              | str. sim. to L-arabinose transport protein <i>araQ</i> ( <i>B. subtilis</i> )                 |
| 3000 |              | str. sim. to maltose-binding protein ( <i>T. thermosulfurigenes</i> )                         |
| 3013 |              | str. sim. to glyoxylate-induced protein ( <i>E. coli</i> )                                    |
| 3092 | <i>aceA</i>  | isocitrate lyase <i>aceA</i> ( <i>C. glutamicum</i> )   |
| 3129 |              | str. sim. to peptidyl-dipeptidase <i>dcp</i> ( <i>S. typhimurium.</i> )                       |
| 3458 |              | str. sim. to iron binding lipoprotein <i>SirA</i> ( <i>S. aureus</i> )                        |
| 3553 | <i>rplC</i>  | str. sim. to ribosomal protein L3 <i>rplC</i> ( <i>B. subtilis</i> )                          |
| 3555 | <i>rplB</i>  | str. sim. to ribosomal protein L2 <i>rplB</i> ( <i>B. subtilis</i> )                          |
| 3694 | <i>sucB</i>  | dihydrolipoamide-succinyltransferase <i>sucB</i> ( <i>C. glutamicum</i> )                     |
| 3775 | <i>rplW</i>  | str. sim. to ribosomal protein L23 ( <i>B. subtilis</i> )                                     |
| 3776 | <i>rpsJ</i>  | str. sim. to ribosomal protein S10 <i>rpsJ</i> ( <i>B. subtilis</i> )                         |
| 3777 | <i>rpsS</i>  | str. sim. to ribosomal protein S19 <i>rpsS</i> ( <i>B. subtilis</i> )                         |
| 3778 | <i>rplv</i>  | str. sim. to ribosomal protein L22 <i>rplV</i> ( <i>E. coli</i> )                             |

### 3.6.3 Das Transkriptom nach Hitzeschock

Die bei Bakterien ubiquitär vertretene Hitzeschock-Antwort wurde bereits umfangreich analysiert (Narberhaus, 1999). Sie ist durch globale Transkriptionsänderungen charakterisiert, welche die Genexpressionsinduktion des Hitzeschock-Regulons beinhaltet. Auch die Hitzeschock-Antwort von *C. glutamicum* wurde bereits untersucht (Muffler *et al.*, 2002). Dabei konnte im Vergleich zur 30°C-Kontrolle eine etwa 30fache Expressionsinduktion der für Hitzeschock-Proteine kodierenden Gene detektiert werden. Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen nach Hitzeschock war die Validierung der geschilderten Stickstoff-Limitationsexperimente. Bei diesen Limitationsexperimenten wurden geringe Induktionsänderungen detektiert. Diese niedrigen Änderungen unter N-Limitation könnten zum einen darin begründet sein, dass dieser Stimulus keinen wirklichen Stress für *C. glutamicum* bedeutet, zum anderen könnten sie auf mangelnde Qualität der Microarrays oder der angewandten Methodik zurückzuführen sein. Um diese Frage zu klären, wurde das Transkriptom nach Hitzeschock untersucht. Es wurden drei Chip-Experimente zum Hitzeschock durchgeführt. Wie bei den Experimenten zur Proteomanalyse wurde eine Temperatur von 50°C für den Schock gewählt, dessen Dauer sieben Minuten betrug. Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zur 30°C-Kontrolle eine zwischen 15- und 40fache Expressionsinduktion des bekannten Hitzeschock-Regulons (Tab. 7), namentlich der Gene *dnaK*, *groEL2*, *dnaJ2*, *clpB* und *grpE*, welche für Chaperone kodieren, ebenso der Gene der Clp-Proteasen *clpP1*, *clpP2* und *clpC*, des weiteren des Gens *hspR*, das für das Hitzeschock-regulatorische Protein HspR kodiert, sowie der alternativen Sigmafaktoren *sigB* und *cnrH*. Starke Induktionsänderungen wurde auch für die Expression von Genen ermittelt, die für Proteine der generellen Stressantwort kodieren (*trx*, *msrA*, *gps1*, *rel*, *ssB*), neben einer Vielzahl von Genen mit Genprodukten noch unbekannter Funktion (z. T. in Tab. nicht gezeigt). Zusätzlich wurden zwei benachbarte Gene detektiert, die zuvor nicht als Hitze-induzierbar beschrieben wurden und die für einen putativen Transkriptionsregulator (ORF 2456) sowie ein konserviertes hypothetisches Protein (ORF 2455) kodieren. Durch diese Experimente konnte bestätigt werden, dass *C. glutamicum* mit sehr starken Änderungen im Transkriptom auf den Hitzeschock reagiert.

Tab. 7: Ausschnitt der induzierten ORFs nach sieben minütigem Hitzeschock der Zellen. Gennamen von *C. glutamicum* und solche, die im Text erwähnt werden, sind angegeben. Abkürzungen wie in Tab. 3.

| ORF  | Gen           | Protein bzw. Homolog nach Genomannotation  |
|------|---------------|--|
| 22   | <i>clpC</i>   | str. sim. to endopeptidase Clp ATP-binding chain C ( <i>B. subtilis</i> )                  |
| 68   | <i>groEL2</i> | str. sim. to groEL2 protein ( <i>M. tuberculosis</i> )                                     |
| 97   | <i>mrpG</i>   | sim. to mutiple resistance and pH regulation related protein ( <i>B. subtilis</i> )        |
| 151  | <i>clpB</i>   | heat shock protein ( <i>C. glutamicum</i> )  |
| 172  | <i>hspR</i>   | str. sim. to heat shock regulatory protein ( <i>S. coelicolor</i> )                        |
| 173  | <i>dnaJ</i>   | str. sim. to heat shock protein ( <i>M. tuberculosis</i> )                                 |
| 175  | <i>grpE</i>   | str. sim. to heat shock protein ( <i>M. tuberculosis</i> )                                 |
| 176  | <i>dnaK</i>   | str. sim. to dnaK-type molecular chaperone ( <i>M. tuberculosis</i> )                      |
| 324  | <i>msrA</i>   | str. sim. to protein-methionine-S-oxide reductase ( <i>E. coli</i> )                       |
| 396  | <i>trxB</i>   | str. sim. to thioredoxin ( <i>B. subtilis</i> )  |
| 403  | <i>ssb</i>    | sim. to single-stranded DNA-binding protein ssb ( <i>B. subtilis</i> )                     |
| 843  | <i>urdJ</i>   | str. sim. to multidrug efflux transporter ( <i>S. coelicolor</i> )                         |
| 1096 | <i>cnrH</i>   | sim. to RNA polymerase sigma factor ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> )                       |
| 1643 | <i>bcr</i>    | str. sim. to biocyclomycine resistance protein ( <i>E. coli</i> )                          |
| 1666 | <i>drrC</i>   | str. sim. to daunorubicin resistance protein ( <i>S. peucetius</i> )                       |
| 2000 | <i>sigB</i>   | RNA polymerase transcription factor ( <i>C. glutamicum</i> )                               |
| 2071 | <i>gpsI</i>   | str. sim. to guanosine pentaphosphate synthetase ( <i>S. antibioticus</i> )                |
| 2455 | -             | str. sim. to conserved hypothetical protein SCC22.07c ( <i>S. coelicolor</i> )             |
| 2456 | -             | str. sim. to putative transcriptional regulator Rv1460 ( <i>M. tuberculosis</i> )          |
| 2739 | <i>rel</i>    | weak sim. to GTP pyrophosphokinase ( <i>C. glutamicum</i> )                                |
| 2935 | <i>clpP2</i>  | str. sim. to ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2 ( <i>S. coelicolor</i> )     |
| 2936 | <i>clpP2</i>  | str. sim. to ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1 ( <i>S. coelicolor</i> )     |
| 3140 | <i>hrcA</i>   | str. sim. to heat-inducible transcriptional repressor ( <i>S. albus</i> )                  |
| 6692 |               | str. sim. to two component regulatory protein <i>czcR</i> ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> ) |

### 3.6.4 Qualitätskontrolle der Chips

Zur Überprüfung der Chip-Qualität sowie der Reproduzierbarkeit von RNA-Präparation und deren Weiterbehandlung wurden zwei Chip-Experimente mit RNA von Zellen durchgeführt, die unter identischen Wachstumsbedingungen (30 min in CgC-Medium) kultiviert und von zwei verschiedenen Personen gewonnen und in cDNA umgewandelt wurden. Die Genexpression sollte in beiden Proben annähernd identisch sein und die ermittelten Fluoreszenzwerte daher im Scatter-Plot auf der Winkelhalbierenden liegen. Der Erwartung entsprechend konnten für die verschiedenen RNAs/cDNAs sehr ähnliche Fluoreszenzwerte ermittelt werden (nicht gezeigt). Intensitätsunterschiede lagen innerhalb eines Faktors von zwei, welcher als biologische Variabilität gilt. Durch diesen Kontrollchip konnten demnach

verdeutlicht werden, dass Gene, deren Expression um einen Faktor größer/gleich zwei in Bezug auf die Kontrolle verändert war, signifikant reguliert sind.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde über zwei globale Ansätze der Einfluss des Stimulus Stickstoff-Limitation auf *C. glutamicum* untersucht. Da Stickstoff ein essentielles Element für Lebewesen ist, müssen bei nachlassender Stickstoff-Konzentration zelluläre Anpassungsmechanismen induziert werden, um eine ausreichende Stickstoff-Versorgung der Zelle weiterhin zu gewährleisten. Durch vorherige Arbeiten an *C. glutamicum* konnten bereits Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle charakterisiert werden, deren Expression oder Aktivität abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert werden (Jakoby *et al.*, 1999, Meier-Wagner *et al.*, 2001, Nolden *et al.*, 2001). Ziel des hier vorgestellten globalen Ansatzes war es, weitere N-abhängige Gene und Proteine zu detektieren und dadurch das Stickstoff-Stimulon zu definieren. Dafür wurde sowohl das Transkriptom über DNA-Microarrays als auch das Proteom über zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert.

### 4.1 Proteomanalysen

Die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) ermöglicht die Darstellung der zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorhandenen Proteine. Durch einen Vergleich des Proteinmusters vor und nach Einsetzen eines Stresses wie z. B. Stickstoff-Limitation können diejenigen Proteine detektiert werden, die spezifisch als zelluläre Reaktion auf diesen Stimulus synthetisiert werden. In den letzten Jahren wurden Protokolle für die zweidimensionale Proteomanalyse von *C. glutamicum* etabliert, die eine Vorfraktionierung der Gesamtproteine in physiologische Kompartimente zur Grundlage haben (Schmid *et al.*, 2000, Hermann *et al.*, 2001, Schaffer *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich die Proteomanalyse auf die Fraktion der cytoplasmatischen Proteine. Laut Computer-gestützten Vorhersagen (Hermann *et al.*, 2001) weist der Hauptteil der corynebakteriellen Proteine einen isoelektrischen Punkt (IEP) zwischen pH 4-7 und eine Größe zwischen 5-100 kDa auf. Dies stimmt mit den Vorhersagen für andere Bakterien wie z. B. *B. subtilis* überein (Büttner *et al.*, 2001). In diesem Bereich liegen auch die isoelektrischen Punkte und Größen der bereits bekannten Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle wie der Glutamin-Synthetase I (GS I), der Uridylyltransferase (UTase), des Signaltransduktions-Proteins GlnK und der drei Untereinheiten der Urease sowie des Urease-akzessorischen



Proteins UreE. Daher wurde die Proteomanalyse in diesem Bereich durchgeführt und erwartet, ein verstärktes Auftreten der genannten Proteine sowie weiterer, bisher unbekannter N-abhängiger Proteine in 2D-Gelen Stickstoff-gehungerter Zellen zu detektieren.

Interessanterweise unterschieden sich die Proteinmuster N-gehungerter Zellen kaum von denen der N-Überschussskontrolle. Selbst mit der hochsensitiven *pulse chase*-Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin konnten nur fünf Proteine detektiert werden, deren Synthese abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert war. Die deutlichste Regulation wurde für das L12-Protein detektiert, welches ein Bestandteil der ribosomalen 50S-Untereinheit ist. Dieses Protein war unter N-Limitation signifikant weniger vorhanden. Dass die Menge an 50S-Untereinheit unter Hungerbedingungen stark abnimmt, stimmt mit der negativen Regulation der Ribosomen-Synthese im Zuge der *stringent response* überein. Für *C. glutamicum* wurde die *stringent response* bereits als Antwort auf Aminosäure-Limitation beschrieben (Wehmeier *et al.*, 2001). Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptom-Analysen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression von Genen ribosomaler Proteine unter N-Limitation deutlich reprimiert ist. Diese Beobachtungen könnten eventuell ein Hinweis darauf sein, dass *C. glutamicum* auch auf Stickstoff-Limitation mit der *stringent response* reagiert.

Ein Protein, das unter Stickstoff-Limitation verstärkt auftrat, wurde als Thioredoxin identifiziert. Dieses Protein ist als cytoplasmatischer Redox-sensitiver Signalfaktor charakterisiert worden, der bei der zellulären Antwort auf verschiedene Stresssituationen eine Rolle spielt (Scharf *et al.*, 1998). Eine Chaperon-ähnliche Wirkung wurde diskutiert, da durch Co-Produktion von Thioredoxin während einer Überexpression rekombinanter Proteine die Bildung von *inclusion bodies* deutlich vermindert wird (LaVallie *et al.*, 1993). Die signifikant erhöhte Proteinkonzentration von Thioredoxin unter Stickstoff-Limitation gibt einen Hinweis darauf, dass das Protein auch bei der N-abhängigen Reaktion von *C. glutamicum* eine schützende Rolle spielt.

Ein weiteres Protein, das unter N-Limitation verstärkt vorhanden war, dagegen nicht oder nur sehr schwach im Kontrollgel, ist die Tetrahydrodipicolinat-Succinylase DapD der Diaminopimelat-Synthese. Die Synthese von Diaminopimelat, einem Bestandteil des Peptidoglycans der Zellmembran, verläuft bei *C. glutamicum* abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zellen auf zwei unterschiedlichen Wegen: bei hohen Ammonium-Konzentrationen wird der "Dehydrogenase-Weg" verwendet, bei niedrigen dagegen der Energie-aufwendigere "Succinylase-Weg", in welchen DapD involviert ist (Wehrmann *et al.*,

1998). Die beobachtete erhöhte Proteinkonzentration der Succinylase DapD stellt demnach eine Anpassung von *C. glutamicum* an den Stickstoffhunger dar.

Vermindert vorhanden unter Stickstoff-Limitation war dagegen die Homocystein-Synthase CysD. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Transkriptom-Analysen, bei denen unter Limitation ebenfalls eine verminderte Expression von Genen detektiert wurde, deren Genprodukte in die Biosynthese von Cystein involviert sind. Insgesamt wurden durch die geschilderte Proteomanalyse fünf Proteine detektiert, deren Menge abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert wurde. Neben den bereits bekannten Proteinen des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle können demnach auch diese fünf Proteine zum Stickstoff-Stimulon von *C. glutamicum* gezählt werden, auch wenn sie wahrscheinlich nicht unter der Kontrolle des globalen Regulators AmtR stehen.

Neben dem *C. glutamicum*-Wildtyp wurde auch die  $\Delta glnD$ -Deletionsmutante LN-D in Bezug auf Stickstoff-abhängige Proteinsynthese analysiert. Die in dieser Mutante deletierte Uridyltransferase (UTase) ist ein essentieller Bestandteil der N-abhängigen Regulationskaskade; dem entsprechend wurde in der Mutante eine Deregulation der Stickstoff-Kontrolle auf RNA-Ebene beobachtet (Nolden *et al.*, 2001b). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Proteomanalyse der  $\Delta glnD$ -Deletionsmutante bestätigt diese Deregulation: es konnte gezeigt werden, dass die im Wildtyp detektierten N-abhängigen Änderungen nicht im Proteinmuster der Deletionsmutante auftraten.

In dieser Arbeit konnte kein verstärktes Auftreten der bereits bekannten Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle unter N-Limitation detektiert werden, obwohl die Microarray-Experimente zeigten, dass die entsprechenden Gene bereits 10 Minuten nach Beginn der Limitation exprimiert werden. Dass die genannten Proteine dennoch nicht im Proteom Stickstoff-gehungerter Zellen detektiert wurden, ist mit einer nur geringen Induktion der Genexpression selbst unter N-Hunger zu erklären. Hierfür sprechen die von Lars Nolden durchgeführten RT-PCR-Analysen. Für die Gene *glnA*, *amtR*, *amt*, *amtB* und *gltB* wurde dabei unter N-Limitation eine nur zweifache Induktion der Genexpression im Vergleich zur N-Überschusskontrolle ermittelt. Auch die in dieser Arbeit durch die Microarray-Experimente detektierten Genexpressionsänderungen, die für die genannten Gene bei einem ungefähren Faktor von vier im Vergleich zur N-Überschusskontrolle lagen, verdeutlichen, dass *C. glutamicum* auf N-Limitation nur mit geringen Änderungen der Transkription reagiert. Die daraus resultierenden geringfügigen Unterschiede im Proteinmuster sind mit der 2-DE nicht detektierbar (Steffen Schaffer, FZ Jülich; pers. Mitteilung).

Eine Ursache der nur geringen Genexpressionsinduktion unter Stickstoff-Limitation kann sein, dass die durchgeführten Limitationsexperimente keine drastische Stressbedingung für *C. glutamicum* darstellen, weil das Bakterium aufgrund seiner beachtlichen Mengen an zellinternen Stickstoff-Quellen gut an Limitationsbedingungen angepasst ist. Bis zu 200 mM Glutamat (Krämer & Lambert, 1990), 50 mM Glutamin (Tesch *et al.*, 1999) sowie 5-10 mM Ammonium (Nolden *et al.*, 2001) konnten über HPLC-Messungen und colorimetrische Tests bestimmt werden. Für diese These spricht auch, dass *C. glutamicum* nach Umsetzen in N-freies Medium mit annähernd gleichen Wachstumsraten wie in Medium mit N-Überschuss weiterwächst, bis das Bakterium nach 2-3 Verdopplungen das Wachstum einstellt. Interessante weiterführende Analysen wären daher Limitationsexperimente unter kontinuierlicher Fermentation. Unter diesen Bedingungen kann nach dem Verbrauch der internen N-Quellen fortgesetztes Zellwachstum erzielt und dadurch eventuell eine stärkere Stressantwort mit deutlich verstärktem Auftreten der N-abhängigen Proteine beobachtet werden.

Ob die nur geringfügigen Änderungen im Proteom spezifisch für den Stimulus Stickstoff-Limitation sind, welcher möglicherweise keine drastische Stressbedingung für *C. glutamicum* darstellt, wurde durch die Analyse einer weiteren Stressantwort kontrolliert. Hierfür wurden Proteomanalysen nach einem Hitzeschock der Zellen durchgeführt. Auf diesen physikalischen Stress reagieren mesophile Organismen mit der Induktion des Hitzeschock-Regulons, welches auf Transkriptom- und Proteomebene bereits umfangreich charakterisiert wurde und daher als Modellsystem für die globale Analyse von Genexpressionsänderungen gilt (Stewart *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Wachstumsversuche und Überlebenstests gezeigt werden, dass *C. glutamicum* auf einen Hitzeschock von 50°C mit stark vermindertem Wachstum reagiert, eine signifikante Anzahl der Zellen aber selbst einen 30 minütigen Hitzeschock überlebt und demnach zur Proteinsynthese befähigt sein sollte. Den Erwartungen entsprechend waren nach einem Hitzeschock der Zellen die Proteinkonzentrationen der zur Hitzeschockfamilie gehörenden Chaperone wie z. B. DnaK bis zu 10fach erhöht, während für das Zellwachstum benötigte Proteine signifikant vermindert oder gar nicht mehr vorhanden waren. Es konnte also eine deutliche Reaktion auf Hitzeschock im Proteinmuster von *C. glutamicum* über 2-DE detektiert werden. Diese Experimente bestätigen, dass die nur geringen Änderungen im Transkriptom, mit denen *C. glutamicum* spezifisch auf Stickstoff-Limitation reagiert, und die daraus resultierenden minimalen Unterschiede im Proteinmuster über die Methode der 2-DE nicht detektierbar sind.

Aus den geschilderten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass *C. glutamicum* aufgrund seiner hohen internen Stickstoff-Quellen nur mit geringfügigen Änderungen im Proteinstmuster auf die Stickstoff-Limitation reagiert (Nolden *et al.*, 2001b). Außerdem könnte unter N-Limitation eine Erhöhung der Aktivität bereits vorhandener Proteine gegenüber ihrer Neusynthese bevorzugt sein. Für zwei Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle, GS I und GlnK, wurde bereits eine Regulation ihrer Aktivität über posttranslationale Modifikation beschrieben (Nolden *et al.*, 2001a). Dies verdeutlicht, dass posttranslationale Modifikationen bei der Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation eine Rolle spielen.

#### 4.2 Das Phosphoproteom von *C. glutamicum*

Die häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die reversible Phosphorylierung (Schlosser *et al.*, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die phosphorylierten Proteine von *C. glutamicum* zu detektieren. Anschließend wurde untersucht, ob Phosphorylierungsprozesse für die zelluläre Reaktion auf Stickstoff-Limitation eine Rolle spielen. Für die Detektion des Phosphoproteoms konnte eine Methode zur *in vivo*-Markierung und anschließenden Autoradiographie der zweidimensional getrennten Proteine etabliert werden. Bisher wurde für einen solchen Ansatz ausschließlich eine Markierung mit dem sehr starken  $\beta$ -Strahler [ $^{32}\text{P}$ ] (1,7 MeV) beschrieben (Djafarzade, 1997; Immler, 1998). In dieser Arbeit konnte aber erstmalig gezeigt werden, dass eine metabolische Markierung auch mit dem weniger starken  $\beta$ -Strahler [ $^{33}\text{P}$ ] gelingt, dessen niedrigere Energie (0,2 MeV) ein sichereres Arbeiten ermöglicht. Ein weiterer Vorteil von [ $^{33}\text{P}$ ] liegt in der relativ langen Halbwertszeit von 25 Tagen, verglichen mit den 14 Tagen  $t_{1/2}$  von [ $^{32}\text{P}$ ], wodurch die zeitintensiven 2D-Arbeiten mit anschließender Detektion der radioaktiven Proteine erleichtert werden.

Nach metabolischer Markierung und folgender zweidimensionaler Gelelektrophorese konnten durch Autoradiographie 59 phosphorylierte Proteinspots detektiert werden (Abb. 11). Nach dieser Methodenetablierung war es möglich, Phosphorylierungsprozesse während der Adaptation an Stickstoff-Limitation zu analysieren. Dafür wurde das Phosphoproteom unter N-Überschuss mit dem Phosphoproteom N-gehungerter Zellen verglichen. Dieser Vergleich zeigte aber keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster (siehe 4.2.2). Die Ursache hierfür kann die relativ lange Markierungsdauer von 45 Minuten sein, die notwendig war, um eine ausreichend hohe Aufnahme des radioaktiven Phosphats durch die Zellen zu erreichen. Falls die putativen Phosphorylierungsprozesse der Stickstoff-Kontrolle in den ersten Minuten

nach Einsetzen der Limitation stattfinden, wären sie demnach mit der beschriebenen Methode nicht detektierbar. Für die Analyse dieser Kurzzeitantwort wurde eine Methode zur Immunfärbung des Phosphoproteoms entwickelt. In Bakterien werden Proteine häufig an Histidin-, Glutamat- und Aspartat-Resten phosphoryliert (Kennelly & Potts, 1996); diese N- und Acylphosphate sind allerdings aufgrund ihrer Instabilität unter den meisten Laborbedingungen nicht analysierbar (Sickmann & Meyer, 2001). Daher wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen das O-Phosphat Phosphoserin (pSer) verwendet, mit denen bis zu 90 Phosphoproteine detektiert werden konnten (Abb. 12).

Die mit beiden Methoden detektierten phosphorylierten Proteine wurden aus 2D-Gelen ausgeschnitten und nach einem tryptischen Verdau über MALDI-TOF-MS identifiziert (Tab. 2), so dass eine Karte des Phosphoproteoms von *C. glutamicum* erstellt werden konnte (Abb. 14). Hier muss berücksichtigt werden, dass ein auf diese Art identifiziertes Protein nicht zwangsläufig das Phosphoprotein ist, welches das Detektionssignal verursacht hat. Beispielsweise kann ein stark abundantes (nicht-phosphoryliertes) Protein über einem geringer abundanten Phosphoprotein liegen, wenn beide denselben IEP und die gleiche Größe aufweisen. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, könnten die Proben statt über MALDI-TOF-MS über LC-MS analysiert werden. Diese Methode ist um ein Vielfaches sensitiver, so dass in einem ausgeschnittenen Proteinspot bis zu fünf verschiedene Proteine identifiziert werden können. Die Validierung der in dieser Arbeit durchgeführten Proteinidentifizierungen erfolgte über Datenbankrecherchen, welche für einen Großteil der identifizierten Proteine eine Phosphorylierung bestätigten. Für einige Proteine, die nur über [<sup>33</sup>P]-Markierung detektiert wurden, nicht aber über pSer-Immunfärbung, wurden keine Datenbankeinträge bezüglich einer Phosphorylierung gefunden, bspw. für die Carbamoylphosphat-Synthase und die Acyl-CoA-Carboxylase. Bei diesen Proteinspots kann es sich um Enzym-Substrat-Intermediate handeln, da während der *in vivo*-Markierung das radioaktive Phosphat zum einen für die Proteinphosphorylierung verwendet wird, zum anderen der interne ATP-Pool das radioaktive Phosphat anreichert (Solow *et al.*, 1998). Durch nachfolgende Phosphatgruppen-Übertragung wird das Enzym-Substrat-Intermediat radioaktiv markiert, so dass nicht die Phosphorylierung des Enzyms, sondern die radioaktiv markierte Phosphorylgruppe des Intermediats detektiert wurde. Bei Proteinen wie der Pyruvat-Kinase, die sowohl als Phosphotransferase fungiert als auch als phosphoryliert beschrieben wurde, ist es unklar, ob in dieser Arbeit das Phosphoprotein oder das Intermediat detektiert wurde. Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Glutamin-Synthetase I. Dieses Protein wird in *C. glutamicum* über Adenylylierung mit einem AMP-Rest modifiziert. Daher müsste das Protein über [<sup>33</sup>P]-Markierung analog zu den Enzym-

Phosphat-Intermediaten detektiert werden. Jedoch wurde ebenfalls über pSer-Immunfärbung ein Signal erhalten, was Hinweise auf eine echte Proteinphosphorylierung gibt. Die Glutamin-Synthetase I von *Mycobacterium phlei* wurde sowohl in der adenylierten Form (AMP-GS) als auch in der phosphorylierten Form (P-GS) isoliert (Kimura *et al.*, 1988). Es ist daher möglich, dass die corynebakterielle Glutamin-Synthetase I sowohl adenyliert als auch phosphoryliert wird.

Über Markierung mit [<sup>33</sup>P] wurden ca. 60, über Immunfärbung bis zu 90 Phosphoproteine visualisiert. Die Zuverlässigkeit beider Methoden wird dadurch verdeutlicht, dass 33 der phosphorylierten Proteine mit beiden Methoden detektiert wurden. Mit dem verwendeten Protokoll zur Immunfärbung wurden mehr Phosphoproteine als mit der [<sup>33</sup>P]-Markierung detektiert, was an der hohen Sensitivität der eingesetzten Antikörper und an der schlechten Aufnahme des [<sup>33</sup>P] durch die Zellen liegt. Außerdem können mit der Immunfärbung auch diejenigen Phosphoproteine visualisiert werden, die konstitutiv phosphoryliert werden und deswegen einen langsamen Phosphat-*turnover* haben (Kaufmann *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden 21 Proteine ausschließlich über Markierung mit [<sup>33</sup>P] detektiert. Ursächlich hierfür könnte eine Phosphorylierung an Threonin oder Tyrosin statt an Serin sein, oder das Nichterkennen der Phosphorylierung aufgrund sterischer Hinderung der Erkennungssequenz (Kaufmann *et al.*, 2001). Bei einigen dieser Proteine handelt es sich sicherlich um die bereits erwähnten Enzym-Substrat-Intermediate. Für die anschließende Identifizierung der detektierten Proteine durch massenspektrometrische Methoden bietet die Markierung mit [<sup>33</sup>P] den erheblichen Vorteil einer eindeutigen Zuordnungsmöglichkeit der phosphorylierten Proteinspots innerhalb eines Coomassiegefärbten Vergleichs. Im Gegensatz hierzu können die immundetektierten Proteine nicht direkt aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und identifiziert werden, so dass eine indirekte Proteinidentifizierung notwendig ist. Abschließend bleibt festzuhalten, dass eine Kombination beider Detektionsmethoden ideal ist, um das Phosphoproteom möglichst umfassend darstellen zu können, wie es auch Kaufmann und Mitarbeiter (2001) für Säugerzellen vorschlugen.

#### 4.2.1 Geschätzter Umfang des Phosphoproteoms

In Eukaryoten unterlaufen Schätzungen zufolge 30% der Proteine Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse, während bis zu 5% des Genoms für Protein-Kinasen oder Phosphatasen kodieren (Blom *et al.*, 1998). Für Prokaryoten existieren bisher keine vergleichbaren Studien. Interessanterweise wurden aber unter den 3745 annotierten Genen von *C. glutamicum* nur vier Serin/Threonin-Kinasen, eine Serin/Threonin-Phosphatase und eine Tyrosin-Phosphatase gefunden, was weniger als 0,2% der Genomsequenz entspricht (Steffen Schaffer, FZ Jülich; unveröffentlichte Daten). Diese Zahlen geben Hinweise darauf, dass zumindest in diesem Bakterium Phosphorylierungsprozesse deutlich seltener als bei Eukaryoten auftreten. Von den 3745 annotierten Genen von *C. glutamicum* kodieren ca. 1900 für Proteine mit einem isoelektrischen Punkt innerhalb des in dieser Arbeit analysierten Bereiches von pH 4-7. Von diesen sind 35 kleiner als 5 kDa und 58 größer als 100 kDa, wodurch sie über 2-DE nicht analysierbar sind. Von den verbleibenden ungefähr 1800 Proteinen sind 27% Membranproteine, deren zweidimensionale Auftrennung bisher ebenfalls nicht möglich ist. Demnach sind ungefähr 1200 Proteine mit dem angewendeten Protokoll zur 2-DE analysierbar. Unter diesen wurden mit pSer-spezifischen Antikörpern bis zu 90 als Phosphoproteine detektiert. Zumindest bei Eukaryoten stellen Phosphorylierungen an Serin-Resten quantitativ den größten Anteil dar, verdeutlicht durch ein Verhältnis pSer:pThr:pTyr von 1800:200:1 (Mann *et al.*, 2002). Abgesehen von den niedrig-abundanten Proteinen, die nicht visualisierbar sind, könnte die detektierte Anzahl an Phosphoproteinen demnach mehr oder weniger dem Umfang des corynebakteriellen Phosphoproteoms entsprechen, der über den vorgestellten 2-DE-Ansatz detektierbar ist.

#### 4.2.2 Phosphorylierungsprozesse während Stickstoff-Limitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse bei der Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation eine Rolle spielen. Dazu wurde das Phosphoproteom unter N-Überschuss und N-Mangel mit [<sup>33</sup>P]-Markierung und Immunfärbung verglichen. Für die [<sup>33</sup>P]-Markierung wurden Zellen in Medien mit und ohne Stickstoff 45 Minuten *in vivo* markiert. Im Phosphoproteom von Zellen unter den beiden Kulturbedingungen waren keine Unterschiede detektierbar. Um zu prüfen, ob die putativen Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse bereits in den ersten Minuten nach Einsetzen der Limitation erfolgen, wodurch sie mit der beschriebenen radioaktiven Detektionsmethode aufgrund der notwendigen langen Markierungsdauer nicht

detektiert werden können, wurde über Immunfärbung das Phosphoproteom nach siebenminütiger Limitation analysiert. Auch mit dieser Methode wurden keine Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsprozesse detektiert, die spezifisch unter Stickstoff-Hunger erfolgten. Ursächlich hierfür kann eine methodische Limitation sein: in dieser Arbeit wurden ausschließlich cytoplasmatische Proteine des Trennbereiches von pH 4-7 und 5-100 kDa analysiert. Falls die putativen Phosphoproteine der N-Kontrolle nur in geringen Mengen synthetisiert werden, wie es für viele Regulatorproteine und Signaltransduktionsmoleküle der Fall ist, ist deren niedrige Konzentration für eine Darstellung über 2-DE zudem nicht ausreichend. Dass in dem gewählten Fenster von Kriterien keine Proteine liegen, die spezifisch als Reaktion auf Stickstoff-Limitation phosphoryliert werden, legt die Vermutung nahe, dass Proteinphosphorylierungen keine Rolle für die physiologische Antwort von *C. glutamicum* auf N-Limitation spielen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass bis jetzt kein für die N-Kontrolle verantwortliches Zwei-Komponenten-System ähnlich dem enterobakteriellen NtrB/C-System gefunden wurde (Faust, 2002). Bisher charakterisierte corynebakterielle Regulationsmechanismen *via* posttranslationale Modifikation verlaufen über Adenylylierung und Uridylylierung verschiedener Proteine (Jakoby *et al.*, 1999, Nolden *et al.*, 2001).

### 4.3 Transkriptomanalysen

Durch DNA-Chipexperimente kann das Transkriptom, die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt synthetisierten RNA, unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden (Baichoo *et al.*, 2002). Dies ermöglicht eine genomweite Analyse der zellulären Reaktion auf bestimmte Stimuli (Überblick, s. Lucchini *et al.*, 2001). Durch die Arbeiten von Jakoby *et al.* (1999), Meier-Wagner *et al.* (2001) und Nolden *et al.* (2001) wurde bereits ein Stickstoff-Stimulon charakterisiert, welches aus mindestens 16 Genen besteht, deren Expression abhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zelle reguliert wird. Ziel der hier vorgestellten globalen Transkriptomanalyse war es, zusätzliche Gene zu detektieren, die spezifisch als zelluläre Reaktion auf Stickstoff-Limitation exprimiert werden. Dafür wurde das Transkriptom nach 10- und 30 minütiger sowie nach vier stündiger Stickstoff-Limitation mit dem Transkriptom unter Stickstoff-Überschuss verglichen. Anhand dieser Chip-Experimente konnten sämtliche Gene, deren Expression bereits als N-abhängig charakterisiert worden war, detektiert werden, namentlich *glnA*, *glnD*, *glnK*, *amt*, *amtB*, *gdh*, *gltBD*, *soxA*, *ocd* und



ORF 454, welches für das putative Membranprotein VarS kodiert. Durch diese sehr gute Wiederfindungsrate wird die hohe Qualität der Chip-Experimente verdeutlicht.

Neben den bereits bekannten Genen des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle wurden zahlreiche weitere Gene detektiert, deren Expression spezifisch unter Limitation induziert wurde. Abgesehen von den ORFs mit unbekannter Funktion handelt es sich zum großen Teil um solche, die für putative oder bereits charakterisierte Aufnahmesysteme Stickstoff-haltiger Komponenten kodieren, wie ein putatives Oligopeptid-Aufnahmesystem (*oppA*, *oppB* und *oppC*), ein putatives Leucin-Aufnahmesystem (*livF*, *livG*, *livH* und *livM*) sowie der Glutamat-spezifische ABC-Transporter von *C. glutamicum* (*gluA*, *gluB* und *gluC*). Bisher war über dieses Glutamat-Aufnahmesystem nur bekannt, dass es unter Kohlenstoff-Kataboliten-Kontrolle steht, doch die geschilderten Expressionsinduktion unter Stickstoff-Limitation gibt Hinweise darauf, dass der ABC-Transporter zusätzlich unter Stickstoff-Kontrolle steht. Entgegen vorherigen Beobachtungen konnte eine verstärkte Genexpressionsinduktion von *glnE*, welches für die ATase der Stickstoff-Regulationskaskade kodiert, detektiert werden; ebenso der Gene *ureABCDE*, welche für Untereinheiten und akzessorische Proteine der Urease kodieren. Die Expression dieser Gene konnte im selben Zeitfenster der Stickstoff-Limitation zuvor nicht als N-abhängig charakterisiert werden, da für diese ORFs keine gute Sonde für Dot Blot-Experimente konstruiert werden konnten (vgl. Nolden, 2001c). Des weiteren wurde nach Stickstoff-Limitation eine verstärkte Expression zahlreicher Gene detektiert, die für putative Transporter mit zum Teil nicht charakterisierter Substratspezifität kodieren.

Die geschilderten Ergebnisse stimmen mit der Transkriptomanalyse von *E. coli* überein, bei der gezeigt wurde, dass 2/3 der unter Stickstoff-Kontrolle stehenden Gene für Transportproteine kodieren (Zimmer *et al.*, 2000). Die auf einen bestimmten Stimulus folgende spezifische Induktion von Genen bisher unbekannter Funktion ist ein guter Indikator für die physiologische Rolle der entsprechenden Genprodukte (Hecker & Engelmann, 2000). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die bisher nicht näher charakterisierten Aufnahmesysteme, deren Genexpression spezifisch unter N-Limitation induziert war, eine Rolle bei der Adaptation an die Mangelbedingung spielen und dass sie Mitglieder des Stickstoff-Stimulons sind. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass sich ein Bindemotiv für den globalen Repressor der Stickstoff-Kontrolle, AmtR, vor einigen dieser Gene befindet (Gabi Beckers, Uni Köln; pers. Mitteilung).

Interessanterweise wurde die Expression des *lrp*-Gens unter Limitation induziert, dessen Genprodukt das *leucine responsive*-Protein ist. Für *E. coli* wurde dieses als ein globaler Regulator beschrieben, der die Expression einer Vielzahl von Genen positiv

reguliert, deren Genprodukte in Transport, Biosynthese und Abbau von Aminosäuren involviert sind (Belitsky *et al.*, 1997). Unter anderem reguliert das Lrp-Protein bei *E. coli* die Expression von *azlC*, dessen Genprodukt ein Transportsystem für verzweigt-kettige Aminosäuren ist, sowie die Expression des *liv*-Operons und des *gltBDF*-Operons. Die Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* zeigten, dass auch bei diesem Bakterium die Expression des *liv*-Operons, des *gltBD*-Operons sowie die Expression von *azlC* unter Limitation gesteigert war. Zumindest die Expression des *gltBD*-Operons steht bei *C. glutamicum* jedoch unter AmtR-Kontrolle. Weiterführende Chip-Experimente mit Deletionsmutanten könnten klären, ob die genannten Gene unter Kontrolle beider Regulatoren stehen.

Die Langzeit-Adaptation an Stickstoff-Limitation wurde über die Transkriptomanalyse nach vier stündiger Limitation untersucht. Wie zu erwarten, waren die bereits nach 10- und 30 minütiger Limitation detektierten Gene des Stickstoff-Regulons noch induziert. Neben zwei weiteren ORFs, deren Genprodukte homolog zu Komponenten von Aufnahmesystemen Stickstoff-haltiger Substanzen sind, wurde des weiteren eine Expressionsinduktion von Genen für zwei putative Zwei-Komponenten-Systeme detektiert. Weiterführende Analysen über Dot Blot-Experimente zeigten jedoch, dass diese nicht unter Stickstoff-Kontrolle stehen (Faust, 2002). Interessanterweise war keine Genexpression von Proteinen der generellen Stressantwort induziert, wie sie beispielsweise für *B. subtilis* als Reaktion auf Nährstofflimitation detektiert wurde (Völker *et al.*, 1995). Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung, dass Stickstoff-Limitation für *C. glutamicum* aufgrund der hohen internen Stickstoff-Quellen keine Stressbedingung darstellt.

Reprimiert nach 10- und 30 minütiger Stickstoff-Limitation war die Expression der für Enzyme der Cysteinbiosynthese kodierenden Gene *cysH*, *cysK* und *cysN*. Dieses Ergebnis passt zu der Proteomanalyse, bei welcher eine verminderte Proteinkonzentration der Homocystein-Synthase (kodiert durch *cysD*) unter Stickstoff-Limitation detektiert wurde. Es gibt keine naheliegende Erklärung dafür, dass ausschließlich die Synthese dieser Aminosäure reprimiert ist. Möglicherweise werden weitere für Aminosäuresynthese-Enzyme kodierende Gene vermindert exprimiert, doch mit Expressionsänderungen niedriger als einem Faktor von zwei, wodurch sie in dieser Studie nicht detektiert wurden. Auffällig war, dass nach 10- und 30 minütiger Stickstoff-Limitation die Expression der für glykolytische Enzyme kodierenden Gene *gap* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAP-DH), *eno* (Enolase) und *pgk* (Phosphoglycerat-Kinase) reprimiert waren. Dies steht im Widerspruch zu vorherigen Beobachtungen, bei denen unter Stickstoff-Limitation verstärkte Atmung sowie verstärkte Glykolyse gezeigt wurde, verdeutlicht durch Northern-

Hybridisierungen, mit denen für das *gap*-Transkript und das *fba*-Transkript (Fructose-Bisphosphat-Aldolase) Induktionsänderungen von einem Faktor zwischen zwei und drei gezeigt wurden (Schmid *et al.*, 2000). Bei *B. subtilis* charakterisierten Fillinger und Mitarbeiter (2000) zwei unterschiedlich regulierte GAP-DH, von denen die eine die glykolytische Reaktion, die andere die Reaktion der Gluconeogenese katalysiert. Auch bei *C. glutamicum* wurde neben dem bereits bekannten *gap*-Gen (ORF 2487) zusätzlich das *gap2*-genannte Gen (ORF 1505) identifiziert, welches für eine zweite GAP-DH kodiert (Hayashi, 2002). Das von Schmid und Mitarbeitern (2000) untersuchte und das in der vorliegenden Arbeit detektierte *gap*-Gen sind jedoch identisch (ORF 2487). Den Hauptanteil der reprimierten Gene unter Limitation stellen, neben einer Vielzahl von ORFs mit unbekannter Funktion, für ribosomale Proteine kodierende Gene. Dieses war besonders auffällig nach vier stündiger Stickstoff-Limitation, wo ungefähr 50% der reprimierten Gene für ribosomale Proteine kodieren. Ebenso durch die Proteomanalyse wurde eine verminderte Synthese des ribosomalen L12-Proteins detektiert. Die Beobachtungen können auf generelle Wachstumsdefizite infolge der vierstündigen Limitation zurückzuführen sein oder eventuell ein Hinweis darauf sein, dass *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation mit der *stringent response* reagiert.

Die Transkriptomanalysen nach Stickstoff-Limitation zeigen, dass *C. glutamicum* nur mit geringen Induktions- und Repressionsänderungen der Genexpression auf diese Mangelsituation reagierte. Als maximale Induktion wurde ein Wert von acht in Bezug auf die Kontrolle ermittelt, wobei der Hauptteil der Gene nur Expressionsänderungen mit einem ungefähren Faktor von vier zeigten. Um die Qualität der gewonnenen Daten zu überprüfen und um auszuschließen, dass experimentelle Fehler die Ursache dieser niedrigen Änderungen waren, wurden Hitzeschock-Experimente durchgeführt. Auf diesen drastischen Schock reagieren mesophile Organismen mit genomweiten Transkriptionsänderungen (Narberhaus, 1999). Auch für *C. glutamicum* wurde kürzlich die Hitzeschockantwort untersucht und dabei Induktionsänderungen bis zu einem Faktor von 30 im Vergleich zur 30°C-Kontrolle ermittelt (Muffler *et al.*, 2002). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen konnte die starke Hitzeschock-Antwort von *C. glutamicum* bestätigt werden: detektiert wurde eine zwischen 15- und 40fache Genexpressionsinduktion der bekannten Hitzeschock-Proteine wie der Chaperone DnaK, GroEL2, DnaJ, ClpB und GrpE, welche vor allem als Faltungshelfer der Proteine fungieren (Hartl, 1996). Ebenso für die zur Hitzeschock-Familie zählenden Proteasen, welche denaturierte Proteine degradieren, wurde diese starke Genexpressionsinduktion ermittelt.

Durch die geschilderte Detektion einer drastischen Genexpressionsinduktion des Hitzeschock-Regulons konnte ausgeschlossen werden, dass die nur geringen Induktionsänderungen unter Stickstoff-Limitation auf experimentelle Artefakte oder eine mangelnde Qualität der Microarrays zurückzuführen sind. Bisher liegen keine vergleichbaren Daten anderer Mikroorganismen zur Stickstoff-Kontrolle vor, so dass nicht geklärt werden kann, ob diese niedrigen Induktionsänderungen spezifisch für *C. glutamicum* sind. Jedoch beobachteten auch andere Arbeitsgruppen für dieses Bakterium auf Stimuli wie erhöhte Salzkonzentration nur geringe Expressionsänderungen (Martin Weinand, Uni Köln; pers. Mitteilung). Daher liegt der Rückschluss nahe, dass *C. glutamicum*, welches als Bodenbakterium einer Vielzahl unterschiedlicher Stimuli ausgesetzt ist, ein sehr anpassungsfähiger Mikroorganismus ist, der ohne drastische Umstellung des Stoffwechsels auf vielfältige Wachstumsbedingungen reagiert.

#### 4.4 Vergleich der Proteom- und Transkriptomanalysen

Obwohl mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese mehr als 1200 cytoplasmatische Proteine von *C. glutamicum* gleichzeitig dargestellt werden konnten, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Limitation dieser Methode auf: eine Stress-spezifische Reaktion kann nur dann im Proteom verfolgt werden, wenn eine deutliche Änderung der Genexpression und der Translation induziert wird, wie es hier am Beispiel der Hitzeschock-Antwort von *C. glutamicum* gezeigt wurde. Während bei einem Hitzeschock Genexpressionsänderungen mit einem Faktor zwischen 15 und 40 im Vergleich zur 30°C-Kontrolle ermittelt wurden, welche in drei- bis 10fachen Konzentrationsänderungen der entsprechenden Proteine im 2D-Gel resultieren, wurden unter Stickstoff-Limitation maximale Genexpressionsänderungen eines Faktors von acht ermittelt. Die resultierenden niedrigen Änderungen der Proteinkonzentration scheinen unterhalb des Schwellenwerts zu liegen, welcher für eine Detektion im 2D-Gel notwendig sind.

Neben diesem Sensitivitätsvorteil ermöglichen Microarrays die Analyse von Genen, die für Proteine kodieren, deren physiko-chemischen Eigenschaften eine Auftrennung im 2D-Gel verhindern. Dieser Aspekt wird in der vorliegenden Arbeit durch die Detektion zahlreicher Aufnahmesysteme Stickstoff-haltiger Substrate verdeutlicht, die als Membranproteine über die zweidimensionale Gelelektrophorese nicht analysiert werden können, sowie durch die Detektion regulatorischer Elemente, deren geringe Konzentration ebenfalls eine Analyse über 2-DE verhindert. Da die verwendeten Microarrays den Großteil aller ORFs von

*C. glutamicum* enthielten, konnte die Stress-spezifische Genexpression fast genomweit analysiert werden. Die detektierten mRNA-Profile stellen aber nur den ersten Schritt einer Genexpressionskaskade dar und korrelieren nur zum Teil mit dem Proteom, welches die letzte Stufe der Genregulation repräsentiert und zusätzliche Informationen über Translationseffizienz, Proteinstabilität und posttranslationale Prozesse gibt (Hecker & Engelmann, 2000). Dem entsprechend konnten in der vorliegenden Arbeit Gene bzw. Proteine der Cystein-Biosynthese sowie ribosomale Proteine sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene als reprimiert unter N-Limitation detektiert werden. Für die Proteine Thioredoxin und DapD dagegen wurden über 2-DE verstärkte Proteinkonzentrationen detektiert, ohne dass deren Genexpression erhöht war. Diese Beobachtung kann durch mögliche postexpressionale Prozesse wie eine Regulation über die Translationseffizienz oder über die Stabilität der mRNA oder des Proteins erklärt werden.

Trotz der Limitationen der 2-DE bietet diese Methode zusätzlich zu den geschilderten den Vorteil, dass posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungsprozesse analysiert werden können, welche häufig für die biologische Aktivität eines Proteins verantwortlich sind (Büttner *et al.*, 2001). Aus den geschilderten Gründen erscheint es daher notwendig, die Analysedaten des Transkriptoms und des Proteoms zu kombinieren und dadurch ein umfassendes globales Verständnis der regulatorischen Vorgänge unter verschiedenen Stressbedingungen zu erlangen (Jenkins & Pennington, 2001). Über einen entsprechenden Versuchsansatz könnte zum Beispiel für *C. glutamicum* ein regulatorischer Zusammenhang zwischen Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus aufgedeckt werden, indem Regulationsmechanismen charakterisiert werden, die Regulon-übergreifend die zelluläre Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen koordinieren.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Reaktion von *C. glutamicum* auf Stickstoff-Limitation auf der Ebene des Proteoms und der Ebene des Transkriptoms untersucht.

Die Proteomanalysen zeigten, dass *C. glutamicum* auf Stickstoff-Hunger nur mit geringfügigen Änderungen im Proteinmuster reagiert. Eine Erhöhung der Menge bereits bekannter Proteine des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle konnte unter Stickstoff-Limitation nicht detektiert werden. Dagegen konnten fünf Proteine dem Stickstoff-Stimulon als weitere Mitglieder zugeordnet werden, von denen bisher keine Regulation in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung bekannt war. Ursächlich für die nur geringfügige Reaktion auf Stickstoff-Limitation sind wahrscheinlich hohe interne Aminosäure-Konzentrationen, welche als Stickstoff-Speicher dienen. Dass die N-Limitationsexperimente daher keine Stresssituation für *C. glutamicum* darstellen, konnte durch die Analyse einer anderen Stressantwort bestätigt werden: auf den physikalischen Stress eines Hitzeschocks war eine deutliche Reaktion detektierbar.

Im Rahmen der Proteomarbeiten gelang die Etablierung einer Methode zur *in vivo*-Markierung phosphorylierter Proteine mit dem  $\beta$ -Strahler [ $^{33}\text{P}$ ]; zusätzlich erfolgte deren Immundetektion mit Phosphoserin-spezifischen Antikörpern. Ein Großteil der detektierten phosphorylierten Proteine wurde über MALDI-TOF-MS identifiziert, so dass eine umfangreiche Karte des Phosphoproteoms von *C. glutamicum* erstellt werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass Phosphorylierungsprozesse wahrscheinlich keine Rolle für die zelluläre Adaptation von *C. glutamicum* an Stickstoff-Limitation spielen.

Stickstoff-abhängige Änderungen im Transkriptom wurden über DNA-Microarrays ermittelt, welche eine nahezu genomweite Analyse der Genexpression ermöglichten. Mit dieser Methode wurde die bereits bekannte Genexpressionsinduktion der Stickstoff-abhängigen Proteine verifiziert. Zusätzlich konnte eine verstärkte Genexpression von Proteinen des Stickstoff-Metabolismus und dessen Kontrolle detektiert werden, die durch die bisherigen Dot Blot-Experimente nicht als abhängig von der Stickstoff-Versorgung reguliert charakterisiert worden waren, namentlich *glnE* und *ureABCDE*. Außerdem wurde gezeigt, dass die Genexpression des Glutamat-spezifischen ABC-Transporters, vom dem bisher nur bekannt war, dass er unter Kohlenstoff-Kataboliten-Repression steht, ebenfalls abhängig von der Stickstoff-Versorgung reguliert wird. Des Weiteren wurden mit dieser globalen Methode zahlreiche putative Aufnahmesysteme für Stickstoff-haltige Verbindungen detektiert, deren Genexpression spezifisch als Adaptation an Stickstoff-Hunger induziert wurde.

## 6 Literatur

Abe, S., Takayama, K., Kinoshita, S. (1967): Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Microbiol* **13**: 279-301.

Andersson, L. & Porath, J. (1986): Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography. *Anal Biochem* **154**: 250-254.

Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Mach, H., Völker, U., Hecker, M. (1997): First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **18**: 1451-1463.

Baichoo, N., Wang, T., Ye, R., Helmann, J-D. (2002): Global analysis of *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**: 1613-1629.

Barthe, B., Kalinowski, J., Pühler, A. (1996): The physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol Gen Genet* **252**: 255-265.

Beckers, G., Nolden, L., Burkovski, A. (2001): Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology* **147**: 2961-2970.

Belitsky, B. R., Gustafsson, M. C. U., Sonenshein, A. L., v. Wachenfeldt, C. (1997): An *Irp*-like gene of *Bacillus subtilis* involved in branched-chain amino acid transport. *J Bacteriol* **179**: 5448-5457.

Blom, N., Kreegipuu, A., Brunak, S. (1998): PhosphoBase: a database of phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research* **26**: 382-386.

Burkovski, A., Weil, B., Krämer, R. (1996): Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **136**: 169-173.

Büttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C., Schmid, R., Mäder, U., Eymann, C., Antelmann, H., Völker, A., Völker, U., Hecker, M. (2001): A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **22**: 2908-2935.

Chen, S. L., Huddleston, M. J., Shou, W., Deshaies, R. J., Annan, R. S., Carr, S. A. (2002): Mass spectrometry-based methods for phosphorylation site mapping of hyperphosphorylated proteins applied to Net1, a regulator of exit from mitosis in yeast. *Molecular & Cellular Proteomics* **1.3**: 186-196.

Cottrell, J. S., Sutton, C. W. (1996): The identification of electrophoretically separated proteins by peptide mass fingerprinting. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol 61, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Djafarzadeh, S. & Niggli, V. (1997): Signaling pathways involved in dephosphorylation and localization of the actin-binding protein cofilin in stimulated human neutrophils. *Exp Cell Res* **236**: 427-435.

Eggeling, L. & Sahm, H. (1999): L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 146-153.

Eggeling, L. & Sahm, H. (2001): The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J Biosci Bioeng* **92**: 201-213.

Faust, A. (2002): Charakterisierung möglicher Regulatoren der Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., White, F. M. (2002): Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**: 301-305.

Fillinger, S., Boschi-Müller, S., Azza, S., Dervyn, E., Branlant, G., Aymerich, S. (2000): Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J Biol Chem* **275**: 14031-14037.

Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., Weiss, W. (1995): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**: 1079-1086.



Görg, A., Boguth, G., Köpf, A., Reil, G., Parlar, H., Weiss, W. (2002): Sample prefractionation with sephadex isoelectric focusing prior to narrow ph range two-dimensional gels. *Proteomics*, in press.

Hartl, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579.

Harth, G., Clemens, D. L., Horwitz, M. A. (1994): Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: Extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **27**: 9342-9346.

Hayashi, M., Mizoguchi, H., Shiraischi, N., Obayaschi, 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**: 1337-1344.

Hecker, M. & Engelmann, S. (2000): Proteomics, DNA arrays and the analysis of still unknown regulons and unknown proteins of *Bacillus subtilis* and pathogenic Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**: 123-134.

Hecker, M. & Völker, U. (2001): General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv microb Physiol* **44**: 35-91.

Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985): Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112.

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., Pfefferle, W., Baumann, C., Busker, E., Schaffer, S., Bott, M., Sahm, H., Dusch, N., Kalinowski, J., Pühler, A., Bendt, A. K., Krämer, R., Burkovski, A. (2001): Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 1712-1723.

Immler, D., Gremm, D., Kirsch, D., Spengler, B., Presek, P., Meyer, H. E. (1998): Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Electrophoresis* **19**: 1015-1023.

Jakoby, M., Krämer, R., Burkovski, A. (1999): Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **173**: 303-310.

Jakoby, M., Nolden, L., Meier-Wagner, J., Krämer, R., Burkovski, A. (2000): AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **37**: 964-977.

Jenkins, R-E. & Pennington, S-R. (2001): Arrays for protein expression profiling: Towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **1**: 13-29.

Kaufmann, H., Bailey, J.E., Fussenegger, M. (2001): Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **1**: 194-199.

Kennelly, P. J. & Potts, M. (1996): Fancy meeting you here! a fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J Bacteriol* **178**: 4759-4764.

Kennelly, P. J. & Potts, M. (1999): Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. *Front Biosci* **15**: 372-85.

Kimura, K., Suzuki, H., Nakano, Y. (1988): Regulation of glutamine synthetase activity by phosphorylation instead of by adenylation. *Biochem Biophys Res Commun* **155**: 1133-1138.

Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957): Studies on the amino acid fermentation. Part 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*. Evidence for a primary active transport system. *Eur J Biochem* **194**: 937-944.

Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C., Ebbighausen, H. (1990): Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur J Biochem* **194**: 929-935.

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.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Larsen, M. R., Sørensen, G. L., Fey, S. J., Larsen, P. M., Roepstorff, P. (2001): Phosphoproteomics: Evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics* **1**: 223-238.

LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., McCoy, J. M. (1993): A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* **11**: 187-193.

Leuchtenberger, W. (1996): Amino acids, technical production and use. In *Products of Primary Metabolism* (Rehm, H. J. & Reeds, G., eds.). *Biotechnology* **6**: 455-502, VCH Weinheim, Deutschland.

Lim, E., Ehrlich, S., Maguin, E. (2000): Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* **21**: 2557-61.

Lockhart, D. J., Winzeler, E. A. (2000): Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-836.

Loos, A., Glanemann, C., Willis, L. B., O'Brien, X. M., Lessard, P. A., Gerstmeir, R., Guillouet, S., Sinskey, A. J. (2001): Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2310-2318.

Lucchini, S., Thompson, A., Hinton, J. C. D. (2001): Microarrays for microbiologists. *Microbiology* **147**: 1403-1414.

Mann, M., Ong, S.-E., Grønborg, M., Stehen, H., Jensen, O. N., Pandey, A. (2002): Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **20**: 261-268.

Meier-Wagner, J. (2000): Mechanismen und Regulation der (Methyl-)Ammoniumaufnahme in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Meier-Wagner, J., Nolden, L., Jakoby, M., Siewe, R., Krämer, R., Burkovski, A. (2001): Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB. *Microbiology* **147**: 135-143.

Muffler, A., Bettermann, S., Haushalter, M., Hörlein, A., Neveling, U., Schramm, M., Sorgenfrei, O. (2002): Genom-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J Bacteriol* **98**: 255-268.

Narberhaus, F. (1999): Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* **31**: 1-8.

Neuhoff, V., Arold, N., Taude, D., Ehrhardt, W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.

Nolden, L., Beckers, G., Möckel, B., Pfefferle, W., Nampoothiri, K. M., Krämer, R., Burkovski, A. (2000): Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organization of corresponding genes and investigation of activity. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 305-310.

Nolden, L., Farwick, M., Krämer, R., Burkovski, A. (2001a): Glutamine synthetase of *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 91-98.

Nolden, L., Ngoutou-Nkili, C.-E., Bendt, A. K., Krämer, R., Burkovski, A. (2001b): Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: The role of *glnK* and *glnD*. *Mol Microbiol* **42**: 1281-1295.

Nolden, L. (2001c): Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D., Séror, S. J. (2000): Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *J Bacteriol* **182**: 5634-5638.

O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021.

Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A., Gimenez, M. N., Collins, M. D. (1995): Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 724-728.

Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J., Völker, U., Hecker, M. (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.

Rosamond, J., Allsop, A. (2000): Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* **287**: 1973-1976.

Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T. (2000): Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* **21**: 1054-1070.

Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Gunther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., Bott, M. (2001): A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 4404-4422.

- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470.
- Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U., Hecker, M. (1998): Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 1869-77.
- Schlosser, A., Bodem, J., Bossemeyer, D., Grummt, I., Lehmann, W. D. (2002): Identification of protein phosphorylation sites by combination of elastase digestion, immobilized metal affinity chromatography, and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2**: 911-918.
- Schmid, R., Uhlemann, 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.
- Schrattenholz, A. (Hrg): Trypsinverdau von geringen Proteinmengen. In: *Methoden der Proteomforschung*. Spektrum-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 158-159.
- Shi, L., Potts, M., Kennelly, P.-J. (1998): The serine, threonine, and /or tyrosine-specific protein kinase and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait *FEMS Microbiol Rev* **22**: 229-253.
- Sickmann, A. & Meyer, H. E. (2001): Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* **1**: 200-206.
- Siewe, R. M., Weil, B., Krämer, R. (1995): Glutamine uptake by a sodium-dependent secondary transport system in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **164**: 98-103.
- Siewe, R. M., Weil, B., Burkovski, A., Eggeling, L., Krämer, R., Jahns, T. (1998): Urea uptake and urease activity in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **169**: 411-416.
- Solow, B., Bischoff, K. M., Zylka, M. J., Kennelly, P. J. (1998): Archaeal phosphoproteins. Identification of a hexosephosphate mutase and the alpha-subunit of succinyl-CoA synthetase in the extreme acidothermophile *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Sci* **7**: 105-111.

Stewart, G-R., Wernisch, L., Stabler, R., Mangan, J-A., Hinds, J., Laing, K-G., Young, D-B., Butcher, P-D. (2002): Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* **148**: 3129-3138.

Tesch, M., de Graaf, A. A., Sahm, H. (1999): *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1099-1109.

Trötschel, C., Kandirali, S., Diaz-Achirica, P., Meinhardt, A., Morbach, S., Krämer, R., Burkovski, A. (2002): GltS of *Corynebacterium glutamicum*: Identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, im Druck.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E. J., Hieter, P., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1997): Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**: 243-251.

Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M. (1995): Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiol* **140**: 741-752.

Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., Humphery-Smith, I. (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**: 1090-1094.

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

Wehrmann, A., Phillipp, B., Sahm, H., Eggeling, L. (1998): Different modes of diamino-pimelate synthesis and their role in cell wall integrity: a study with *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **180**: 3159-3165.

---

Yuste, L. & Rojo, F. (2001): Role of *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **183**: 6197-6206.

Zhou, H., Watts, J. D., Aebersold, R. (2001): A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol* **19**: 375-378.

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A., 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.



## Lebenslauf

- 02.01.1974 geboren in Kiel
- 1980-1984 Besuch der Muhlius-Grundschule in Kiel
- 1984-1993 Besuch des Ernst-Barlach-Gymnasiums in Kiel, Abschluss: Abitur
- 1993-1995 Diplomstudiengang Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Abschluss: Vordiplom
- 1995-1996 Besuch der Université des Sciences Humaines de Strasbourg, Abschluss: Diplôme d'Etudes Françaises
- 1996-08/1999 Diplomstudiengang Biologie an der Universität Greifswald, Abschluss: Diplom; Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Hecker; Thema: "*Screening*, Klonierung und Charakterisierung kälteangepasster Chitinasen von psychrophilen und psychrotrophen Mikroorganismen".
- 11/1999 Praktikum am Institut für Rechtsmedizin, Dresden
- 02/2000-02/2003 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer. Thema: "Globale Analyse von Stickstoff-Metabolismus und Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*".

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich herzlich für das interessante Arbeitsthema und die freundliche Unterstützung während der Arbeit; außerdem dafür, dass er sich immer Zeit für Diskussionen nahm.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich für die freundliche Übernahme des Co-Referats.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Andreas Burkovski für die kontinuierliche gute Betreuung und für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern und insbesondere bei Gabi Beckers, Inga Bellahn und Matthias Schauen.

Einen großen Dank an Dr. Steffen Schaffer für die tolle Einführung in die Massenspektrometrie, die Diskussionen und die Möglichkeit, meine Proteine bei ihm identifizieren zu können.

Bei Dr. Mike Farwick möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Microarray-Experimente in seinem Labor durchführen zu können und außerdem für seine Diskussionsbereitschaft der Ergebnisse. Bei Jennifer Brehme bedanke ich mich für ihre unermüdliche Geduld und Hilfestellung bei der Durchführung der Microarray-Experimente.

Meinen Eltern und Philipp danke ich sehr für ihr Interesse an meiner Arbeit und stärkende Worte!

## 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. K., Burkovski, A., Schaffer, S., Bott, M., Farwick, M., Hermann, T.: Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*; *Proteomics*, im Druck.

Hermann, T., Pfefferle, W., Baumann, C., Busker, E., Schaffer, S., Bott, M., Sahm, H., Dusch, N., Kalinowski, J., Pühler, A., Bendt, A. K., Krämer, R., Burkovski, A. (2001): Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 1712-1723.

Nolden, L., Ngoutou-Nkili, C.-E., Bendt, A. K., Krämer, R., Burkovski, A. (2001): Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: The role of *glnK* and *glnD*. *Mol Microbiol* **42**: 1281-1295.

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: Köln, Mai 2003

Unterschrift:

