

**Expressionsregulation von
Transportern kompatibler Solute in
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martin Weinand

aus Hamburg

Köln, Juli 2004

1. Referent: Prof. Dr. R. Krämer, Lehrstuhl für Biochemie der Universität zu Köln

2. Referent: Prof. Dr. T. Langer, Lehrstuhl für Genetik der Universität zu Köln

Tag der Disputation: 07.07.2004

Kurzzusammenfassung

Corynebacterium glutamicum akkumuliert als Reaktion auf osmotischen Stress kompatible Solute. Hierzu synthetisiert das Bakterium die Aminosäuren Glutamat, Glutamin und Prolin *de novo* und/oder importiert die Solute Betain, Ectoin und Prolin mittels der sekundären Transporter BetP, EctP, LcoP und ProP, die jeweils unterschiedliche Affinitäten und Substratspektren zeigen. Die beteiligten Systeme der Osmoregulation werden auf der Ebene der Aktivität reguliert. Die Expressionsregulation der Transporter war bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Expressionskontrolle der Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* sowie die Neusynthese kompatibler Solute nach einem hyperosmotischen Schock untersucht. Hierzu wurden der Wildtyp und Deletionsmutanten, die jeweils nur noch ein intaktes Gen eines Transporters für kompatible Solute hatten, auf Expressionsebene verglichen. Die Induktion der jeweiligen Gene wurde durch RNA-Hybridisierungsexperimente bestimmt und eine Quantifizierung der Transkriptionsstärke über Transportmessungen und Antikörpernachweise durchgeführt. Durch die Analyse von Wachstumsparametern und der Akkumulation von *de novo* synthetisierten Aminosäuren (Glutamat, Glutamin und Prolin) wurden zusätzliche wichtige Faktoren der Osmoregulation von *C. glutamicum* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* einer osmotischen Kontrolle unterliegen. Unter niederosmolaren Bedingungen wurden nur geringe Mengen an mRNA nachgewiesen, aber bereits eine hohe Grundaktivität der Transporter BetP und EctP festgestellt. Durch hyperosmotischen Schock wurden insbesondere die Gene *betP*, *ectP* und *proP* deutlich induziert. Die Transportraten von BetP und ProP stiegen aufgrund der dadurch verstärkten Translation signifikant an, während keine Steigerung der Rate bei EctP festgestellt werden konnte. Unter den getesteten Bedingungen zeigte *lcoP* nur eine schwache Reaktion, was darauf hindeutet, dass der Transporter in der Osmoadaptation eine geringe Rolle spielt. Aufgrund der hohen basalen Transportraten unter niederosmolaren Bedingungen bilden EctP und BetP somit das Notfallsystem von *C. glutamicum* bei plötzlich auftretenden Änderungen der Osmolalität und externer Verfügbarkeit kompatibler Solute. Zusätzlich wurde eine starke transiente Akkumulation von Glutamat sowie Glutamin nachgewiesen, welche in der frühen Osmoantwort zur schnellen Restaurierung des sinkenden Turgordrucks dienen und später durch hohe Konzentrationen von Prolin ersetzt werden, welches bis in die stationäre Phase das dominante Solut darstellt. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* über ein System verfügt, welches unter hyperosmotischen Bedingungen durch kumulative Nutzung verschiedener zellulärer Prozesse die zur Kompensation von osmotischem Stress notwendige Akkumulation kompatibler Solute gewährleistet.

Abstract

To counteract the effects of hyperosmotic stress on turgor and cellular processes *Corynebacterium glutamicum* accumulates high amounts of compatible solutes. Therefore, the bacterium synthesizes the amino acids glutamate, glutamine, and proline de novo and/or imports the solutes betaine, ectoine, and proline via the secondary transporters BetP, EctP, LcoP, and ProP. These carriers exhibit different substrate affinities and spectra. The systems involved in osmoregulation are regulated at the level of activity. However, no data were available so far about the regulation of the transporters at the level of expression. This thesis analyzes the impact of expression control on the transporter genes *betP*, *ectP*, *lcoP*, and *proP* after hyperosmotic upshock. The *C. glutamicum* wild type strain and mutant strains devoid of four of the five genes each for transporters of compatible solutes were analyzed in detail. Induction of the respective genes was determined by RNA hybridization experiments. Quantification of expression intensity was carried out by transport measurements and antibody detection experiments. Analyses of growth parameters and determination of intracellular amounts of amino acids synthesized de novo (i.e. glutamate, glutamine, and proline, respectively) provided additional information on osmoregulation in *C. glutamicum*. It could be shown that the genes *betP*, *ectP*, *lcoP*, and *proP* are subject to osmotic control. Conditions of weak osmotic strength accounted for only small amounts of the respective mRNA's, though a surprisingly high basic activity for BetP and EctP was determined. Following osmotic upshock the genes *betP*, *ectP*, and *proP* were dramatically induced and the uptake rates of BetP and ProP rose significantly according to increased translation. However, no increase in the uptake rate of EctP was determined. LcoP showed only weak response under the tested conditions, which may be a hint to its minor role in osmoadaptation. Thus, BetP and EctP represent the emergency system of *C. glutamicum* when it is subject to a rapid increase of osmolarity and if external compatible solutes are available. Nevertheless, a transient accumulation of high concentrations of glutamate and glutamine could be determined in the first response to osmotic upshock. These amino acids were able to restore the decreasing turgor until being replaced by high concentrations of proline, which was the dominant compatible solute until stationary phase was reached. This study reveals the fine-tuned osmoprotective system of *C. glutamicum* which ensures the life-saving accumulation of compatible solutes by the use of multiple cellular processes under hyperosmotic conditions.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.2	Anpassung an schwankende Osmolaritäten	1
1.3	Osmoregulation unter hypoosmotischen Bedingungen	4
1.4	Osmoregulation unter hyperosmotischem Stress	5
1.4.1	Bedeutung und Funktion kompatibler Solute	6
1.4.2	Akkumulation kompatibler Solute durch <i>de novo</i> Synthese.....	8
1.4.3	Aufnahme kompatibler Solute	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Bakterienstämme, Plasmide und Primer	13
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
2.2.1	Nährmedien.....	15
2.2.2	Kultivierungsbedingungen.....	17
2.2.3	Stammhaltung	17
2.2.4	Bestimmung der Zellvitalität	18
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.3.1	Herstellung kompetenter Zellen, DNA-Transfer und Mutagenese	18
2.3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	18
2.3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α -mcr.....	18
2.3.1.3	Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -Deletionsmutanten.....	19
2.3.2	DNA-Arbeiten.....	19
2.3.2.1	Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	19
2.3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	20
2.3.2.3	Rekombinante DNA-Techniken.....	20
2.3.2.4	Klonierung von DNA	20
2.3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.3.3	RNA-Arbeiten	21
2.3.3.1	RNA-Präparation	21
2.3.3.2	Herstellung Digoxigenin-markierter <i>antisense</i> -RNA-Sonden.....	22
2.3.3.3	RNA-Hybridisierungen	23
2.3.3.4	Wasch- und Detektionsschritte für RNA-Hybridisierungen.....	24
2.3.3.5	DNA- <i>Microarrays</i>	25
2.4	Proteinchemische Methoden	26
2.4.1	Membranpräparation	26
2.4.2	Quantitative Bestimmung von Proteinen.....	26
2.4.3	Denaturierende SDS-Gelelektrophorese.....	26
2.4.4	Western Blot-Analyse.....	27
2.5	Biochemische Methoden.....	27
2.5.1	Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung mit CTAB	27
2.5.2	HPLC-Analysen.....	28
2.5.3	Bestimmung der Transportraten.....	29

2.5.4	Bestimmung des Korrelationsfaktors $OD_{600} \leftrightarrow BTM$	31
2.5.5	Messung von Osmolalitäten.....	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Osmoregulation in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 nach hyperosmotischem Schock.....	32
3.1.1	Abhängigkeit der Regulation vom Medium (Grundosmolalität).....	33
3.1.2	Abhängigkeit der Regulation von Schockstärke & Endosmolalität	34
3.1.3	Bedeutung kompatibler Solute zur Kompensation eines hyperosmotischen Schocks.....	40
3.2	Globale Transkriptionsanalyse nach einem hyperosmotischen Schock	43
3.2.1	Globale Analyse mit DNA-Microarrays.....	43
3.2.2	Kontrolle der DNA-Microarray-Daten	46
3.3	Untersuchung der Transkriptionsregulation einzelner Gene und Transporter	48
3.3.1	Versuchs-Setup	49
3.3.2	Einfluss der Waschbedingungen auf die Transportbedingungen.....	51
3.3.3	Charakterisierung des WT & der Mutanten	52
	Physiologische Parameter	52
	Transkription, Translation und Transportraten.....	58
	Vergleich zwischen Deletionsmutanten und dem Wildtyp	66
	Untersuchungen an <i>C. glutamicum</i> MH20-22B- <i>proP-IcoP</i>	67
4	Diskussion	71
4.1	Osmoregulation von <i>C. glutamicum</i> nach einem hyperosmotischen Schock	71
4.1.1	Abhängigkeit der Regulation von Umweltfaktoren	71
	Mediumzusammensetzung	71
	Grundosmolalität, Schockstärke & Endosmolalität.....	72
	Bedeutung kompatibler Solute	75
4.1.2	Stärke der Regulation.....	76
4.1.3	Vergleich zwischen Deletionsmutanten und dem Wildtyp	77
	Physiologische Parameter	78
	Transkriptionskontrolle der Transporteraktivität	79
	<i>C. glutamicum</i> MH20-22B- <i>proP-IcoP</i>	81
4.1.4	Bedeutung der Transporter für die Osmostress-Adaptation	82
4.2	Modell der Regulation nach einem hyperosmotischen Schock in <i>C. glutamicum</i>	84
4.3	Abschließende Betrachtungen.....	85
5	Zusammenfassung	87
6	Anhang	89
7	Literatur	94

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
AMI	Agosin-Medium I
AS	Aminosäure
ATCC	American type culture collection
BCCT-Familie	Betain-Cholin-Carnitin-Transporter-Familie
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat
BetP	Betain Permease
BHI-Medium	<i>Brain Heart Infusion</i> -Medium
BSA	Rinderserumalbumin
ChIA	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EctP	Ectoin Permease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GB	Glycinbetain
Kan ^R	Kanamycinresistenz
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer (isomolar aus K ₂ HPO ₄ & KH ₂ PO ₄)
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LcoP	<i>low capacity osmoregulated</i> Permease
MFS	Major Facilitator Superfamily
MMI	Minimalmedium I
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
N-Quelle	Stickstoffquelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
ProP	Prolin Permease
PutP	putative Permease
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol

üN-Kultur	Übernacht-Kultur
üT-Kultur	Übertag-Kultur
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Größen und Einheiten

Π	osmotischer Druck [Pa]
A	Radioaktivität [dpm]
a_w	Aktivität des Wassers
BTM	Biotrockenmasse [g/L]
Da	Dalton
dpm	<i>decays per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
K_F	Korrelationsfaktor $OD_{600} \leftrightarrow$ BTM
K_M	Michaelis-Konstante [μ M]
osM	Osmolalität [osmol/kg]
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
R	allgemeine Gaskonstante
RT	Raumtemperatur [20 °C]
T	Temperatur in Kelvin
t_D	Verdopplungszeit [h]
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit [$nmol \cdot min^{-1} \cdot (mg \text{ BTM})^{-1}$]
V_w	partielles molares Volumen des Wassers [L/mol]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]

1 Einleitung

1.1 *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum (früher *Micrococcus glutamicus*) wurde 1957 von Kinoshita *et al.* isoliert und charakterisiert. Phylogenetisch gehört die Gattung *Corynebacterium* innerhalb der Gram-positiven Bakterien zur Untergruppe mit hohem GC-Gehalt. Coryneforme Bakterien haben eine stäbchen- bzw. keulenförmige (coryneforme) Gestalt, sind aerob und unbeweglich, bilden keine Sporen aus und zeichnen sich durch eine „schnappende“ Zellteilung aus, d.h. die Zellen bleiben kurz vor der eigentlichen Teilung noch seitlich miteinander verbunden. Zur Gattung *Corynebacterium* zählen neben Bodenbakterien auch humanpathogene Arten wie z.B. *C. diphtheriae* und *C. pyogenes* sowie pflanzenpathogene Arten wie z.B. *C. michiganense* und *C. fascians*. *C. glutamicum* ist dagegen ein apathogenes Bodenbakterium und zeichnet sich dadurch aus, dass es unter bestimmten Bedingungen die Aminosäure Glutamat in die Umgebung exkretiert. Aufgrund dieser Eigenschaft hat *C. glutamicum* eine hohe biotechnologische und industrielle Bedeutung. Neben der Produktion von Glutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie wird Lysin als Futtermitteladditiv in der Tiermasthaltung hergestellt. Die weltweite jährliche Produktion der beiden wichtigsten durch *C. glutamicum* fermentativ hergestellten Aminosäuren beträgt zurzeit ca. 1,5 Mio. Tonnen L-Glutamat und 500.000 Tonnen L-Lysin (Krämer, persönliche Mitteilung).

1.2 Anpassung an schwankende Osmolaritäten

Mikroorganismen sind in den natürlichen Habitaten durch Nährstofflimitation, Austrocknung, Schwankungen in Temperatur und pH-Wert innerhalb kurzer Zeit einer Vielzahl von wachstumsbegrenzenden Stressfaktoren ausgesetzt (Hecker *et al.*, 1996). Trotzdem sind Mikroorganismen in der Lage, auch solche Lebensräume erfolgreich zu besiedeln, die sich durch deutliche Schwankungen biotischer und abiotischer Faktoren auszeichnen.

Eine besondere Bedeutung kommt dabei wechselnden Osmolaritäten zu. Einige Mikroorganismen sind in ihrem Habitat – dem Meerwasser oder Salzseen – der permanenten Präsenz hoher Konzentrationen osmotisch wirksamer Bestandteile

ausgesetzt (Ventosa *et al.*, 1998), während andere den Boden oder die oberen Bodenschichten besiedeln und damit durch Austrocknung und Regen bzw. Überflutung verursachte drastische Veränderungen der Wasseraktivität ausgleichen müssen (Galinski und Trüper, 1994; Miller und Wood, 1996).

Die bakterielle Zellmembran ist für Wasser, Glycerin und kurzkettige Alkohole durchlässig, bildet jedoch eine effektive Barriere für anorganische Salze, Makromoleküle und organische Verbindungen im Cytoplasma oder der Umgebung der Zelle (Bovell *et al.*, 1963). In der Regel ist die intrazelluläre Konzentration osmotisch aktiver Substanzen höher als die des umgebenden Mediums. Aufgrund des resultierenden hohen osmotischen Potentials (Ψ_{π}) im Cytoplasma ist das Wasserpotential (Ψ_w), welches zum osmotischen Potential komplementär ist, sehr niedrig. Daher diffundieren Wassermoleküle vom externen Kompartiment mit höherem Wasserpotential ins Cytoplasma der Zelle und verursachen einen hydrostatischen Druck, auch Zellturgor genannt, der die Cytoplasmamembran gegen die Zellwand drückt und dem einströmenden Wasser entgegenwirkt. Der Wasserstrom kommt zum Erliegen, sobald sich das Druckpotential des Zellturgors (Ψ_p) dem osmotischen Potential (Ψ_{π}) angeglichen hat. Dann gilt:

$$\Psi_w = \Psi_{\pi} + \Psi_p ; \text{ wenn } \Psi_{\pi} = \Psi_p \text{ dann } \Psi_w = 0$$

Das Druckpotential des Zellturgors (Ψ_p) entspricht dabei dem osmotischen Druck (Π), der wie folgt definiert ist:

$$\Pi = - (RT/V_w) \ln a_w$$

R = Gaskonstante; T = Temperatur in Kelvin; a_w = Wasseraktivität; V_w = partielles molares Volumen des Wassers

Die Summe der molaren Konzentrationen aller osmotisch wirksamen Teilchen (c_i) einer Lösung bezeichnet man als Osmolarität. Diese beschreibt den osmotischen Druck wie folgt:

$$\text{Osmolarität} = \sum_i c_i \approx \Pi / RT$$

Da die Summe der osmotisch wirksamen Teilchen in einer Lösung berechnet, jedoch nicht gemessen werden kann, wird in der Praxis der osmotische Druck in Abhängigkeit vom Gewicht der Teilchen in einer Lösung (Osmolalität) bestimmt. Hierbei wird die durch gelöste Teilchen hervorgerufene Gefrierpunktniedrigung einer Lösung gemessen.

$$\text{Osmolalität} = \Pi / RT \quad [\text{osmol/kg}]$$

Zwei osmotische Prozesse werden unterschieden: Von hyperosmotischem Stress spricht man, wenn in der Umgebung eine größere Zahl an osmotisch wirksamen Substanzen vorliegt und Wasser aus der Zelle entweicht. Damit besteht die Gefahr der Plasmolyse und eines Zusammenbruchs des Turgors, was letztendlich zum Wachstumsstillstand führen könnte. Wird die Zelle dagegen hypoosmolaren Bedingungen ausgesetzt, strömt Wasser in die Zellen ein, und im Extremfall besteht die Gefahr des Platzens. Unter isoosmolaren Bedingungen strömt kein Wasser in die Zelle hinein oder aus ihr heraus. Da das Cytoplasma der Zelle allerdings unter normalen Bedingungen ein hochkonzentriertes gelartiges Molekülgemisch darstellt, wird der osmotische Druck durch den entgegengesetzt wirkenden Turgordruck kompensiert.

Die Aufrechterhaltung des Turgors innerhalb enger Grenzen wird als notwendig für das Zellwachstum und die Zellteilung von Bakterien- und Pflanzenzellen angesehen (Koch, 1983; Höltje, 1998). Strategien zur Anpassung an Schwankungen der externen Osmolarität sind also von fundamentaler Bedeutung für das Überleben und Wachstumsvermögen von Mikroorganismen, weshalb sie effektive Mechanismen entwickelt haben, um unter wechselnden osmotischen Bedingungen einen konstanten Turgordruck beizubehalten. Da Mikroorganismen keine Systeme für den aktiven Wassertransport besitzen, sind sie darauf angewiesen, den Wasserstrom über die Membran durch den Gehalt an intrazellulären osmotisch aktiven Substanzen, sog. kompatible Solute, zu regulieren. Diese Adaptation an unterschiedlichste osmotische Gegebenheiten wird auch als Osmoregulation bezeichnet (Brown *et al.*, 1986). Die essentielle Bedeutung der Osmoregulation für Zellen zeigt sich in der nahezu ubiquitären Verbreitung von molekularen Mechanismen zum Schutz vor osmotischem Stress.

1.3 Osmoregulation unter hypoosmotischen Bedingungen

Die Anpassung von Mikroorganismen an hyperosmolare Bedingungen ist mit der Akkumulation großer Mengen niedermolekularer Verbindungen gekoppelt. Werden bakterielle Zellen nach einer derartigen Anpassung plötzlich einem hypoosmotischen Schock ausgesetzt, kommt es entlang des Konzentrationsgradienten zu einem massiven Einstrom von Wasser in die Zellen. Als Konsequenz steigt der Turgor drastisch an, was die Zelle im Extremfall zum Platzen bringen kann. Um dem entgegenzuwirken, muss die Zelle in der Lage sein, osmotisch aktive Solute rasch aus dem Cytoplasma auszuschleusen, um das intrazelluläre osmotische Potential zu reduzieren. In vielen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ist der Efflux dieser Substanzen abhängig von so genannten dehnungsaktivierbaren mechanosensitiven Kanälen (Msc), durch welche die Osmolyte innerhalb weniger Sekunden nach einem hypoosmotischen Schock ausströmen können (Schleyer *et al.*, 1993). Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnten mechanosensitive Kanäle sowohl in Eu- als auch in Prokaryoten nachgewiesen werden (Morris, 1990; Sackin, 1995). Untersuchungen in *Escherichia coli* haben gezeigt, dass das Vorhandensein mechanosensitiver Kanäle essentiell für das Überleben eines osmotischen *downshifts* ist (Levina *et al.*, 1999). Dieses Bakterium besitzt mindestens drei mechanosensitive Kanäle (MscL, MscS und MscM), die sich hinsichtlich ihrer Aktivierungsschwellen und Leitfähigkeiten deutlich voneinander unterscheiden (Berrier *et al.*, 1996). Die Öffnung dieser Kanäle ist abhängig von einer Konformationsänderung der Proteinstruktur, die durch Änderungen der Membranspannung ausgelöst wird. Mittlerweile stehen die Kristallstrukturen der mechanosensitiven Kanäle MscL aus *Mycobacterium tuberculosis* (Chang *et al.*, 1998) und MscS aus *E. coli* zur Verfügung (Bass *et al.*, 2002), was weitere Schritte zur Aufklärung des Öffnungsprozesses ermöglicht. Ein aktuell diskutiertes Modell zur Aktivierung von MscL besagt, dass es unter hypoosmotischen Bedingungen in Folge des steigenden Turgordrucks zu einer lateralen Expansion der Cytoplasmamembran kommt. Die Kanalpore weitet sich, bleibt jedoch weiterhin geschlossen. Erst in einem zweiten Schritt ermöglicht die laterale Expansion weiterer Proteinbereiche eine Öffnung des Kanals (Sukarev *et al.*, 2001). Auch bei den Gram-positiven Bakterien *Lactobacillus plantarum* (Glaasker *et al.*, 1996), *Bacillus subtilis* (Moe *et al.*, 1998) und *C. glutamicum* (Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock *et al.*, 2003) wurden mechanosensitive Kanäle identifiziert, die große Ähnlichkeiten zu MscL und MscS

aus *E. coli* zeigen. Die funktionelle Charakterisierung der mechanosensitiven Kanäle aus *C. glutamicum* zeigte, dass diese Kanäle dem spezifischen Efflux von Glycinbetain, Prolin sowie einem geringen Efflux von Kationen dienen (Ruffert *et al.*, 1999). Daneben besitzt dieses Bakterium einen weiteren mechanosensitiven Kanal dessen molekulare Struktur jedoch noch nicht geklärt ist (Nottebrock, 2000).

1.4 Osmoregulation unter hyperosmotischem Stress

Steigt die Osmolalität des externen Mediums, sinkt dessen Wasserpotential und Wassermoleküle diffundieren entlang des osmotischen Gradienten aus der Zelle. Der Zellturgor sinkt, und den cytoplasmatischen Proteinen wird ihre funktionsrelevante Hydrathülle entzogen. Als Folge dieser Dehydratation kommen Zellstoffwechsel und Zellteilung zum Erliegen (Wood, 1999). Um dieses zu verhindern, haben Mikroorganismen im Laufe der Evolution zwei fundamental unterschiedliche Strategien entwickelt. In extrem halophilen Organismen dient die Anhäufung von anorganischen Ionen (hauptsächlich K^+ und Cl^-) dazu, die hohe Osmolarität des Mediums auszugleichen (Bremer und Krämer, 2000). Dabei werden diese Salze bis zu molaren Konzentrationen angehäuft, was voraussetzt, dass die gesamten metabolischen und regulatorischen Prozesse dieser Organismen an hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen angepasst sind. So sind einige biochemische Prozesse von der hohen intrazellulären Kaliumkonzentration abhängig, und die Zellmembran vieler halophiler Mikroorganismen ist unterhalb der hohen Ionenstärke strukturell nicht stabil (Brown, 1963; Britton *et al.*, 1998; Elcock *et al.*, 1998). Viele halophile Mikroorganismen sind zudem in der Lage, osmotisch wirksame Substanzen zu synthetisieren, um das osmotische Potential ihres Cytoplasmas zu erhöhen (Galinski, 1995; Ventosa *et al.*, 1998). Diese Anpassungsstrategie ist sehr erfolgreich bei der Adaptation an extreme Salzkonzentrationen, erweist sich aber als relativ unflexibel und beschränkt die Habitate solcher extrem halophilen Mikroorganismen auf Salzseen und Salinen.

Halotolerante Mikroorganismen, die moderater Osmolarität ausgesetzt bzw. regelmäßig Fluktuationen der externen Osmolarität unterworfen sind, bedienen sich einer anderen Strategie, die sie in Hinblick auf die Wahl ihrer Habitate deutlich flexibler macht als halophile Mikroorganismen. Als initiale Antwort auf hyperosmotischen Stress akkumulieren Bakterien wie *E. coli*, *B. subtilis* und

C. glutamicum Kaliumionen im Cytoplasma (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Whatmore *et al.*, 1990; Burger, 2001), das aber in derartig hoher Konzentration aufgrund der Inkompatibilität mit dem Zellmetabolismus nach kurzer Zeit in einem zweiten Schritt der Anpassung durch Synthese und/oder Aufnahme so genannter kompatibler Solute ersetzt wird (Csonka und Epstein, 1996; Bremer und Krämer, 2000). Diese organischen, osmoprotektiven Substanzen werden bis zu molaren Konzentrationen akkumuliert, ohne den Zellmetabolismus zu beeinträchtigen. Neben ihrer osmotischen Aktivität und dem daraus resultierenden Beitrag zur Aufrechterhaltung des Turgors sind diese Verbindungen in der Lage, die Struktur und Stabilität von Proteinen unter hochosmolaren Bedingungen positiv zu beeinflussen (Brown, 1976; Yancey *et al.*, 1982; Wood, 1999). Aufgrund dieser protektiven Eigenschaften ist die Akkumulation kompatibler Solute nicht nur in Bakterien und Archaea verbreitet (Csonka, 1989; da Costa *et al.*, 1998; Poolman und Glaasker, 1998; Oren, 1999), sondern findet sich auch bei Pilzen, Pflanzen, Tieren und menschlichen Zellen (Burg *et al.*, 1997; Hohmann, 1997; McNeil *et al.*, 1999).

1.4.1 Bedeutung und Funktion kompatibler Solute

Obwohl die Fähigkeit zur Akkumulation kompatibler Solute als Antwort auf hyperosmotischen Stress in Eukaryoten, Bakterien und Archaea weit verbreitet ist (Bohnert, 1995; Kempf und Bremer, 1998; Roberts, 2000), rekrutiert sich das Spektrum der verwendeten kompatiblen Solute aus lediglich vier Hauptgruppen:

- (i) Zucker und Polyole (z. B. Trehalose oder Glycerin)
- (ii) α - und β -Aminosäuren (z. B. Prolin oder Glutamat) und ihre Derivate (z. B. Ectoin)
- (iii) Trimethylammoniumverbindungen (z. B. Glycinbetain, Cholin oder Carnitin) und
- (iv) Methylsulfonium-Verbindungen und Sulfatester (z. B. Dimethylsulfoniumpropionat oder Cholin-O-sulfat).

Die meisten kompatiblen Solute in Bakterien und Eukaryoten sind metabolisch inert, polar (bei physiologischem pH-Wert ungeladen oder zwitterionisch) und bis zu molaren Konzentrationen löslich (Csonka, 1989). Sie bieten den Vorteil, dass sie selbst in diesen hohen cytoplasmatischen Konzentrationen den zellulären Stoffwechsel nicht beeinflussen und eine stabilisierende Wirkung auf die native Konformation von Enzymen zeigen (Yancey *et al.*, 1982; Wood, 1999).

Im Laufe der letzten Jahre stellte sich heraus, dass kompatible Solute von Zellen nicht allein zu osmoprotektiven Zwecken akkumuliert werden, sondern auch die Toleranz gegenüber anderen Stressarten erhöhen. Schon seit längerer Zeit ist der positive Einfluss von Zuckern und Polyolen auf die Toleranz von Mikroorganismen gegen Einfrieren und Auftauen bekannt (Mazur, 1968; Hino *et al.*, 1990). So werden kompatible Solute routinemäßig als Additiva für mikrobiologische Proben verwendet, die gefroren oder lyophilisiert werden sollen (Barbour und Priest, 1986). Zudem konnte in Bakterien und Pilzen eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt kompatibler Solute und ihrer Resistenz gegenüber Austrocknung nachgewiesen werden (Gadd *et al.*, 1987; Potts, 1994). Ein weiteres Beispiel für die weitreichenden protektiven Eigenschaften kompatibler Solute ist, dass Hefe-Zellen, die ausgelöst durch Stress Trehalose akkumulierten, deutlich resistenter gegen Sauerstoffradikale sind, als solche mit einem niedrigen Trehalose-Level (Benaroudj *et al.*, 2001). Besonders hervorzuheben sind jedoch die fördernden Eigenschaften kompatibler Solute auf das Wachstum von Mikroorganismen bei Kältestress. So konnte von Ko *et al.* (1994) gezeigt werden, dass Glycinbetain in *Listeria monocytogenes* bei Wachstum in der Kälte verstärkt transportiert wird und kryoprotektiv wirkt. Etwas später wurden andere Solute auf diese Eigenschaft hin untersucht und es stellte sich heraus, dass auch Strukturanaloga von Glycinbetain und Dimethylsulfoniumverbindungen das Wachstum von *L. monocytogenes* bei Kältestress fördern (Bayles und Wilkinson, 2000). Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in Mikroorganismen führten zu dem Ergebnis, dass z.B. das Disaccharid Trehalose das Wachstum von Hefe und Enterobakterien wie *Salmonella* und *Escherichia coli* fördert (Hengge-Aronis *et al.*, 1991; Canovas *et al.*, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass Glycinbetain sowohl in *E. coli* (Caldas *et al.*, 1999) als auch in Pflanzen (Alia *et al.*, 1998) die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen erhöht. Stress, der durch erhöhte Wachstumstemperaturen zustande kommt, tritt in der Natur häufig in Kombination mit osmotischem Stress auf (z. B. bedingt durch Austrocknung). Untersuchungen zur Auswirkung dieser Kombination zweier Stressfaktoren kamen zu dem Ergebnis, dass hyperosmotische Wachstumsbedingungen die Thermotoleranz von Mikroorganismen erhöhen können (Fletcher und Csonka, 1998; Fletcher *et al.*, 2001). Die unter hyperosmotischen Bedingungen gesteigerte Toleranz gegenüber

Hitze wird dabei auf die osmotisch induzierte Akkumulation kompatibler Solute zurückgeführt.

Die enorme Vielfalt der protektiven Wirkungen kompatibler Solute wirft die Frage nach der Wirkungsweise dieser Substanzen auf. Nach dem Modell der 'preferential exclusion' von Arakawa und Timasheff (1985) werden diese Verbindungen vorzugsweise aus der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen und ordnen sich um diese herum an. Dies bewirkt eine Erhöhung der lokalen Wasserkonzentration an der Proteinoberfläche. Der präferentielle Ausschluss ist energetisch am günstigsten, wenn die Oberfläche eines Proteins möglichst klein ist, was letztlich die Stabilisierung eines Proteins in einer kompakten, nativen Konformation zur Folge hat (Potts, 1994). Ihre nahezu fehlende Wechselwirkung mit den Proteinen an sich erklärt die Kompatibilität solcher Substanzen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Arakawa und Timasheff, 1985). Aufgrund dieser Eigenschaft werden kompatible Solute auch als chemische Chaperone bezeichnet (Tatzelt *et al.*, 1996).

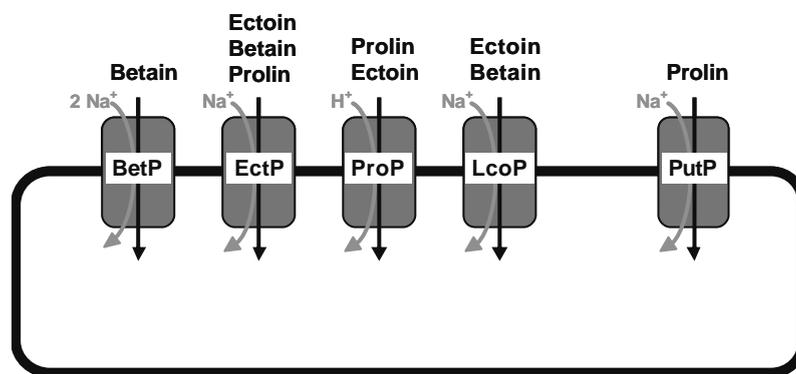
1.4.2 Akkumulation kompatibler Solute durch *de novo* Synthese

Bei halotoleranten Prokaryoten geht eine langfristige Adaptation an hyperosmotische Bedingungen in der Regel mit der Synthese kompatibler Solute einher, wobei das Spektrum der Syntheseleistungen von der jeweiligen enzymatischen Ausstattung der Organismen abhängt. Weit verbreitet ist neben der osmotisch induzierten *de novo* Synthese von Prolin, die man bei Gram-positiven Prokaryoten wie *B. subtilis* oder *C. glutamicum* nachgewiesen hat (Whatmore *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2003), die Synthese von Trehalose, welche beispielsweise *E. coli* und *C. glutamicum* eine Adaptation an längerfristige hyperosmotische Bedingungen ermöglicht (Wood *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu *C. glutamicum* besitzen *E. coli* und *B. subtilis* zudem die Fähigkeit, extern verfügbares Cholin, das durch den Abbau Cholin-haltiger Phospholipide entsteht, aufzunehmen und enzymatisch zu Glycinbetain zu oxidieren (Lamark *et al.*, 1991; Kappes *et al.*, 1999). Neben einer Regulation der Biosynthese-Enzyme auf Aktivitätsebene konnte bei verschiedenen Mikroorganismen auch eine Transkriptionsregulation der kodierenden Gene nachgewiesen werden (Killham und Firestone, 1984; Galinski und Trüper, 1994; Ley, 2001).

1.4.3 Aufnahme kompatibler Solute

Bei einem hyperosmotischen Schock kommt es zur gesteigerten Synthese kompatibler Solute. Bei externer Verfügbarkeit natürlich vorkommender Schutzsubstanzen, wie z.B. Prolin oder Glycinbetain, wird jedoch deren schnellere und zudem energetisch günstigere Aufnahme gegenüber der Eigensynthese bevorzugt (Wood, 1999). Die Synthese und der Eintrag dieser Osmoprotektiva in die Umwelt erfolgt im Allgemeinen durch Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen (Kemble und McPherson, 1954). Die Aufnahme ins Cytoplasma der Bakterienzellen wird durch osmotisch regulierte Transportsysteme katalysiert, welche sich aus den verschiedensten Protein-Familien rekrutieren. Neben Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern wie ProU aus *E. coli* (Csonka und Epstein, 1996), OpuA, OpuB und OpuC aus *B. subtilis* (Kappes *et al.*, 1998 und 1999) oder OpuA aus *Lactococcus lactis* (van der Heide und Poolman, 2000) und Bindeprotein-abhängigen sekundären Transportern wie TeaABC aus *Halomonas elongata* (Grammann *et al.*, 2002), wurden zahlreiche Natrium-Symporter wie EctP und BetP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998) bzw. Protonen-Symporter wie ProP aus *E. coli* (Sutherland *et al.*, 1987) und ein gleichnamiger Transporter aus *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1998) identifiziert. Zudem besitzt ein Bakterium meist mehrere Transportsysteme mit unterschiedlichen Substrataffinitäten und Substratspektren, wodurch eine rasche und flexible Adaptation der Zellen an plötzlich auftretende hyperosmotische Bedingungen gewährleistet wird (Millner *et al.*, 1988; Wood, 1988). Exemplarisch hierfür seien *C. glutamicum* und *B. subtilis* genannt, wobei letzteres auf insgesamt fünf osmotisch regulierte Transporter zurückgreifen kann, welche die Aufnahme von mehr als zehn unterschiedlichen kompatiblen Solute katalysieren (Kempf und Bremer, 1995; Kappes und Bremer, 1998). Im Gegensatz zu *B. subtilis* besitzt *C. glutamicum* ausschließlich sekundäre Transporter für die Aufnahme kompatibler Solute (Abbildung 1-1), deren Aktivität durch osmotische Änderungen reguliert wird. Die Aufnahme von Glycinbetain, dem bevorzugten kompatiblen Solut von *C. glutamicum*, erfolgt durch die beiden nah verwandten sekundären Natrium-Symporter BetP und EctP, zwei Mitgliedern der so genannten BCCT-Familie (Betain/Carnitin/Cholin-Transporter; Saier *et al.*, 1999), zu denen auch OpuD aus *B. subtilis* gehört. EctP kann außerdem Ectoin und Prolin aufnehmen. Zusätzlich kann *C. glutamicum* Prolin durch die Prolin/Ectoin-spezifische Permease ProP aus der MFS-Familie (major facilitator superfamily) aufnehmen, allerdings wurde eine

Aktivität bisher nicht gemessen (Peter *et al.*, 1998). Dieser Transporter ist nah verwandt mit dem gleichnamigen Protein aus *E. coli*, welches derzeit zu den am besten untersuchten osmotisch regulierten Transportsystemen unter den Prokaryoten gehört (Grothe *et al.*, 1986; Culham *et al.*, 2000). Erst kürzlich wurde in *C. glutamicum* ein Na⁺-abhängiges, osmotisch reguliertes Aufnahmesystem für Glycinbetain und Ectoin entdeckt (LcoP), welches ebenfalls zur BCCT-Familie gehört (Steger, 2002). Zusätzlich zu den osmotisch regulierten Transportern besitzt *C. glutamicum* den Transporter PutP, welcher der Aufnahme von Prolin zu anabolen Zwecken dient (Peter *et al.*, 1997).



Transporter	K _M -Wert je Solut				Quelle
	Betain [μM]	Ectoin [μM]	Prolin [μM]	Natrium (Na ⁺) [mM]	
BetP	8,6	-	-	4,1	Peter <i>et al.</i> , 1996
EctP	333	63	1200	9,1	Peter <i>et al.</i> , 1998
LcoP	150	540	-	36	Steger, 2002
ProP	-	132	48	-	Peter <i>et al.</i> , 1998
PutP	-	-	7,6	1,3	Peter <i>et al.</i> , 1997

Abbildung 1-1: Transportsysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum*.

In Kombination mit der Fähigkeit zur *de novo* Synthese der kompatiblen Solute Prolin und Trehalose ermöglicht ein Set osmotisch regulierter Transportproteine, wie es in *C. glutamicum* durch BetP, EctP, LcoP und ProP gegeben ist, eine optimale und schnelle Adaptation an unterschiedlichste hyperosmotische Gegebenheiten. Ein derartig komplexes Zusammenspiel ist auch für andere Bakterien, wie z.B. *E. coli* oder *B. subtilis* (Wood, 1999; Bremer und Krämer, 2000; Morbach und Krämer, 2002) beschrieben worden und unterstreicht die Bedeutung der Anpassungsfähigkeit an wechselhafte osmotische Bedingungen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Hyperosmotische Wachstumsbedingungen bewirken sowohl eine transkriptionelle Aktivierung der Gene der meisten hier beschriebenen Akkumulationssysteme als auch eine Stimulation der Transporter für kompatible Solute. Dazu muss osmotischer Stress wahrgenommen und das Signal prozessiert werden, um letztendlich zur Aktivierung der entsprechenden Vorgänge beizutragen (Poolman und Glaasker, 1998). Untersuchungen zur Transkriptionsregulation in verschiedenen Bakterien, insbesondere *E. coli* und *Bacillus subtilis*, haben gezeigt, dass in Abhängigkeit von hyperosmotischen Bedingungen sowohl Gene von Transportsystemen als auch Gene für Biosyntheseenzyme zur Akkumulation kompatibler Solute induziert werden. In *E. coli* beispielsweise wurden die Induktion der Gene *otsAB* (Trehalosesynthese), *betT* (Cholintransport), *proP* und das *proU*-Operon (*proVWX*; Prolintransport) als Reaktion auf hyperosmotischen Schock nachgewiesen (Kaasen *et al.*, 1992; Mellis *et al.*, 1995; Gowrishankar und Manna, 1996; Lamark *et al.*, 1996). Im Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* wurden unter osmotischen Stressbedingungen die Gene *proHJ* (Prolinsynthese), *opuB* (Betaintransport) und *opuE* (Prolintransport) induziert (von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter und Bremer, 1998; Kappes *et al.*, 1999).

In *C. glutamicum* ist die Transkriptionsregulation weitgehend unbekannt. Die Transportsysteme BetP, EctP, LcoP und ProP sind auf der Ebene der Aktivität osmoreguliert. Unterhalb einer externen Osmolalität von 0,5 osmol/kg sind alle Transporter inaktiv, erreichen aber das Maximum ihrer Aktivität, wenn die Osmolalität auf 1,1-1,4 osmol/kg ansteigt (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998; Steger, 2002).

Anhand von Transportmessungen wurde vermutet, dass das Glycinbetain-spezifische BetP-Protein auch auf der Transkriptionsebene osmotisch reguliert ist (Peter *et al.*, 1996), wohingegen *ectP* konstitutiv exprimiert wird (Peter *et al.*, 1998). Dieser Transporter gilt deshalb als ein Notfall-Aufnahmesystem. Für die Gene *proP* und *lcoP* wurde eine transkriptionelle Kontrolle ebenfalls noch nicht nachgewiesen.

Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der Frage, wie ein hyperosmotischer Stimulus die Transkription der Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* induziert. Zu diesem Zweck sollten physiologische Parameter, die Induktion codierender Gene der osmoregulierten Transporter sowie die Auswirkungen der Translation auf Transporterkonzentration und -aktivität parallel erfasst werden, um einen

Gesamteindruck von der Induktion und den dadurch bedingten Änderungen der Transportrate zu erhalten. Die Quantifizierung der Induktionsstärke sollte über vergleichende Analysen von RNA-Hybridisierungsexperimenten und DNA-*Microarray*-Experimenten erfolgen. Durch die Konstruktion von Deletionsmutanten, die jeweils nur noch ein Gen eines Transporters kompatibler Solute im Chromosom enthalten, sollte die Problematik redundanter Substratspektren der Carrier umgangen werden und die Gene sowie Transporter einzeln untersucht werden. Die im Wildtyp und den Mutanten bestimmten Transkriptmengen sowie Aufnahmeraten sollten die tatsächlich translatierte Konzentration an Proteinen quantifizierbar machen. Diese Daten sind für das grundsätzliche Verständnis der komplexen Osmoregulation der beteiligten Gene und Transporter in *C. glutamicum* notwendig.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum* sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Synonym in dieser Arbeit *)	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>			
DH5 α mcr	---	<i>endA1 supE44 thi-1 I⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 Φ80ΔlacZ ΔM15mcrA Δ(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
S17-1	---	<i>thi-1 F⁻ endA1 hsdR17 supE44 λ⁻ pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>C. glutamicum</i>			
ATCC13032	Cgl-wt	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
Δ BUE	Cgl- <i>proP-lcoP</i>	<i>betP⁻ putP⁻ ectP⁻</i>	Morbach, unveröffentl. Arbeit
Δ ELPU	Cgl- <i>betP</i>	<i>ectP⁻ lcoP⁻ proP⁻ putP⁻</i>	diese Arbeit
Δ BUPL	Cgl- <i>ectP</i>	<i>betP⁻ putP⁻ proP⁻ lcoP⁻</i>	diese Arbeit
Δ BUPE	Cgl- <i>lcoP</i>	<i>betP⁻ putP⁻ proP⁻ ectP⁻</i>	diese Arbeit
Δ BUEL	Cgl- <i>proP</i>	<i>betP⁻ putP⁻ ectP⁻ lcoP⁻</i>	diese Arbeit
MH20-22B	---	<i>lysC^{FBR}, leuCD</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1992
MH20-22B Δ EBU	MH20-22B- <i>proP-lcoP</i>	<i>lysC^{FBR}, leuCD ectP⁻ betP⁻</i>	Rönsch, 2000

*) Anm.: Die Vierfach-Deletionsmutanten von *C. glutamicum* ATCC13032 sowie eine Mutante des Produktionsstammes MH20-22B wurden in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit ihrer ursprünglichen Benennung der deletierten Gene benannt, sondern mit Synonymen belegt, aus denen sich leicht das noch vorhandene Gen ableiten lässt (z.B.: Cgl-*betP* enthält nur noch *betP*, alle anderen vier Transportergene wurden deletiert).

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pDrive	Km ^R , Ap ^R , <i>lacZa</i> , <i>oriV_{E. coli}</i>	Qiagen, Hilden
pDrive- <i>aceE</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>aceE</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>aro</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>aro</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>cysN</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>cysN</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>gap</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>gap</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>gcaD</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>gcaD</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>lcoP</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>lcoP</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>mez</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>mez</i>	diese Arbeit
pDrive- <i>nlpA</i>	pDrive mit 0,5 kb-Fragment aus <i>nlpA</i>	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	Km ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> , Integrationsvektor	Schäfer <i>et al.</i> 1994
pK19 <i>mobsacB-betP</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit 1,7 kb Δ <i>betP</i> -Fragment	Peter, 1997
pK19 <i>mobsacB-ectP</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit 1,8 kb Δ <i>ectP</i> -Fragment	Peter <i>et al.</i> , 1998
pK19 <i>mobsacB-lcoP</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit 1,6 kb Δ <i>lcoP</i> -Fragment	Steger, 2002
pK19 <i>mobsacB-proP</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit 1,4 kb Δ <i>proP</i> -Fragment	Peter <i>et al.</i> , 1998
pGEM3z / pGEM4z	Ap ^R , <i>lacZa</i>	Promega, Mannheim
pGEM3z-16S <i>rrn</i>	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus dem 16S-rRNA-Gen	Nolden, 2001
pGEM4z- <i>betP</i>	pGEM4z mit 0,5 kb-Fragment aus dem <i>betP</i> -Gen	Morbach, unveröfftl. Arbeit
pGEM4z- <i>ectP</i>	pGEM4z mit 0,5 kb-Fragment aus dem <i>ectP</i> -Gen	Morbach, unveröfftl. Arbeit
pGEM4z- <i>proP</i>	pGEM4z mit 0,5 kb-Fragment aus dem <i>proP</i> -Gen	Morbach, unveröfftl. Arbeit

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind paarweise in Tabelle 2-3 dargestellt.

Tabelle 23: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Zusammen dargestellt sind jeweils zwei Oligonukleotide, die zur Amplifikation eines Fragments verwendet wurden.

Primer	Sequenz	Fragmentgröße [bp]
<i>aceE</i> -s <i>aceE</i> -as	CGGCGGCGACCAGATC CCTGCGCCACGGAAGAA	468
<i>aro</i> -s <i>aro</i> -as	CCGCCTGGCTCCGCT CCGCCGCGCAAAATGAT	486
<i>cysN_Ec</i> -s <i>cysN_Ec</i> -as	CGCCCGCCACGGCG CCTGGGCTAGGCGCAG	527
<i>gap</i> -s <i>gap</i> -as	CGCGATCCAAAGAACCTG CGGTGACCTCAGACTTG	529
<i>gcaD_Bs</i> -s <i>gcaD_Bs</i> -as	GGCCGCATCGTGCGC GCGCCGTGCGCCGATG	506
<i>lcoP</i> -s <i>lcoP</i> -as	CCTCACGACACCCACC CCCCAGTGGAAGTGGG	476
<i>mez</i> -s <i>mez</i> -as	CGCAGCCATCGCGCC CGCCGTACTTCTGAGAC	536
<i>nlpA_Ec</i> -s <i>nlpA_Ec</i> -as	CCGCATCGGCACCACC CCGCGAGGTTTGGATCG	536

Anm.: Die für Amplifikationen verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen.

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde in der Regel LB-Medium (1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt; Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Sofern *C. glutamicum* auf Vollmedium kultiviert wurde, kam BHI-Medium (37 g/L BHI, Difco, Detroit, USA) zur Verwendung. Zur Herstellung von Festmedien wurden je Ansatz 15 g/L Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugegeben. Für die Selektion auf Resistenzmarker in *E. coli* und *C. glutamicum* wurde Carbenicillin und Kanamycin benutzt. Die Endkonzentrationen der Antibiotika betragen 50 µg/ml im Medium.

Minimalmedien für *C. glutamicum*:**Tabelle 24: Zusammensetzung der drei verwendeten Minimalmedien. Alle Mengen beziehen sich auf 1 L Endmedium.**

Zusammensetzung	AMI (Varela <i>et al.</i> , 2003)	MMI (Peter, 1997)	CgXII (Keilhauer <i>et al.</i> , 1993)
Salze			
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g	5 g	20 g
Harnstoff	--	5 g	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	2 g	1 g
K ₂ HPO ₄	3 g	2 g	1 g
NaCl	0,1 g	--	--
MOPS	--	--	42 g
Einzel-Lösungen			
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	400 mg	250 mg	250 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	100 mg	10 mg	10 mg
C-Quelle (Glucose)	20 g	20 g	40 g
Nitrilotriacetic acid (NTA)	50 mg	--	--
Deferoxamin	--	1 mg	--
Protokatechusäure	--	--	30 mg
Vitamine			
Biotin	15 µg	0,2 mg	0,2 mg
Thiamin x HCl	1 mg	--	--
Myo-Inositol	1,5 mg	--	--
Calcium-Pantothenat	1,5 mg	--	--
Cholinchlorid	1,5 mg	--	--
Nicotinsäure	1,5 mg	--	--
Desferroxaminmesylat	1,5 mg	--	--
Spurensalze			
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	30 mg	10 mg	10 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	4 mg	10 mg	10 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	4 mg	1 mg	1 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	4 mg	0,2 mg	0,2 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	--	0,02 mg	0,02 mg
H ₃ BO ₃	0,1 mg	0,09 mg	--
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	--	0,06 mg	--
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	--	0,009 mg	--
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,1 mg	--	--
Osmolalität	0,3 osmol/kg	0,3 osmol/kg	0,8 osmol/kg

2.2.2 Kultivierungsbedingungen

E. coli wurde standardmäßig in Luria-Bertani-Medium (LB) bei 37 °C kultiviert.

C. glutamicum wurde bei 30 °C in BHI-Vollmedium oder CgXII-, MMI- bzw. AMI-Minimalmedium angezogen.

Animpfschema auf Minimalmedium:

Zur Anzucht wurden am Vortag der Präparation *C. glutamicum*-Zellen von BHI-Platte oder aus Dauerkultur in BHI-Medium angeimpft und über Tag bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Nach ca. 8 h wurden die Zellen auf Minimalmedium überimpft (Start-OD₆₀₀ = 0,5) und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert, um eine effektive Anpassung der Zellen an das Minimalmedium zu erreichen. Am nächsten Morgen wurden aus dieser Kultur zwei frische Minimalmedienkulturen auf eine Start-OD₆₀₀ von 2 angeimpft und bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. In Schock-Experimenten wurde ein Aliquot Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (Referenzwert vor Schock) und die restliche Kultur durch Zugabe von 750 mM NaCl, wenn nicht anders angegeben, einem hyperosmotischen Schock unterworfen. Zu definierten Zeitpunkten nach Schock (siehe Ergebnisteil) wurden Proben für Aminosäureanalyse, RNA-Präparationen und Aufnahmemessungen entnommen. Für die Bestimmung der Wachstumsparameter wurden über den gesamten Zeitraum Proben entnommen.

In einigen Experimenten wurden die Schockstärke variiert, zusätzliche kompatible Solute dem Medium zugegeben oder Proben für weitere Aufarbeitungen (Membranpräparationen) entnommen. In Kontrollexperimenten wurden die Zellen entweder nicht osmotisch geschockt oder erhielten zusätzlich zum Schock 100 µg/ml Chloramphenicol zur Inhibition der Proteinbiosynthese. Siehe hierzu die Ausführungen im Ergebnisteil.

2.2.3 Stammhaltung

Bakterienstämme wurden auf LB- bzw. BHI-Agarplatten bei 4 °C oder in 50 % (v/v) Glycerin-Dauerkulturen bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt.

2.2.4 Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellen wurden aus der Kultur mit sterilem Wasser auf eine Zelldichte von 10^2 bis 10^6 Zellen/ml verdünnt und mindestens 100 μ l der Zellsuspension auf BHI-Agar ausplattiert. Nach 48 h Inkubation bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen, DNA-Transfer und Mutagenese

2.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde die Methode von Inoue *et al.* (1990) eingesetzt. Dafür wurden 250 ml SOB-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,4 % NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM KCl) mit 1 ml einer über Tag gewachsenen Kultur *E. coli* DH5 α mcr angeimpft und über Nacht bei Raumtemperatur und 200 rpm geschüttelt bis eine OD_{600} von circa 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4 °C), in eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes (pH 6,7), 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2$) gewaschen und in 20 ml TB-Puffer (4 °C) resuspendiert. 1,4 ml DMSO wurden portionsweise hinzugegeben, bevor die nun kompetenten Zellen in 200 ml Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

2.3.1.2 Transformation von *E. coli* DH5 α -mcr

Zur Transformation wurde ein 200 μ l Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut und mit 6 μ l eines Ligationsansatzes oder 1 μ l Plasmid versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 sec. Danach wurde sofort 400 μ l SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl, 0,36 % Glucose, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM KCl) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C im Thermoblock geschüttelt. Nach Ablauf der Regenerationszeit wurden die Zellen auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.3 Herstellung von *C. glutamicum*-Deletionsmutanten

Für die Herstellung von Deletionen im Chromosom von *C. glutamicum* wurde die Methode des Allelaustauschs von Schäfer *et al.* (1994) angewendet. Allele mit internen Deletionen waren bereits in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert worden (siehe Tabelle 2-2). Dieser Vektor besitzt zwei Selektionsmarker: ein Kanamycin-Resistenzgen (Km^R) und das *sacB*-Gen, welches für die Levan-Sucrase kodiert, die eine Saccharose-Sensitivität erzeugt. Der Vektor wurde über Elektroporation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* eingebracht. Da der Vektor für *C. glutamicum* keinen Replikationsursprung besitzt, musste für seinen Erhalt eine Integration (homologe Rekombination) ins Genom erfolgen. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz (BHI-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin) und Saccharose-Sensitivität (BHI-Platten mit 10 % Saccharose) wurden die Klone identifiziert, bei denen das Plasmid ins Genom integriert wurde. Durch den zweiten Selektionsmarker konnte auf ein zweites Rekombinationsereignis selektiert werden. Dazu wurden die Zellen in LB-Medium mit 2 % Glucose überimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Diese Inkubation ermöglichte Rekombinationsereignisse zwischen dem Deletionsfragment aus dem Vektor und dem intakten Gen auf dem Chromosom. Ergebnis einer solchen Rekombination ist der Verlust des Vektoranteils und die Erzeugung eines Deletions- oder eines Wildtyp-Gens. Um die Klone zu identifizieren, bei denen eine Rekombination stattgefunden hatte, wurde auf Verlust der Kanamycinresistenz und der Saccharose-Sensitivität selektiert. Aus den erhaltenen Klonen wurden die Deletionsmutanten mittels PCR kontrolliert. Ein im Vergleich zum Wildtyp kleineres DNA-Fragment zeigte den Allelaustausch an. Mit dieser Methode wurden die Deletionsmutanten Cgl-*betP* / -*ectP* / -*lcoP* und Cgl-*proP* konstruiert (Tabelle 2-1).

2.3.2 DNA-Arbeiten

2.3.2.1 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde das *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

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

2.3.2.3 Rekombinante DNA-Techniken

Enzyme und mitgelieferte Lösungen für Arbeiten mit isolierter DNA wie Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation stammten von NEB (Frankfurt), Roche Diagnostics (Mannheim) oder Qiagen (Hilden). Die Arbeiten wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.2.4 Klonierung von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wie pUC18 oder pK19*mobsacB* wurde mit dem *Ready to Go Ligation Kit* (Pharmacia, Freiburg) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit einzelnen A-Überhängen in den Vektor pDrive mit einzelnen U-Überhängen wurde mit dem *PCR Cloning Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) wurde zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Dazu wurden jeweils zwei Primer benutzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten (Tabelle 2-3). Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-*Annealing* und Primer-Elongation mittels DNA-Polymerase ermöglichte die Synthese der gewünschten DNA. Benutzt wurde die *Taq*-Polymerase von Sigma (Deisenhofen) oder Qiagen (Hilden). Die Primer (Tabelle 2-3) wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen.

Durchgeführt wurde die PCR im Mastercycler-Gradient (Eppendorf GmbH, Hamburg).

PCR Ansatz:

2 µl	10 X Puffer
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,8 µl	dNTP's (jeweils 10 mM)
1 µl	<i>sense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>antisense</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
11,2 µl	H ₂ O _{dd}
1 µl	<i>Template</i> -DNA

Als *Template* dienten entweder Zellen, chromosomale DNA oder verdünnte Plasmid-DNA. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil verwendet, wobei die Synthesegeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase ca. 1000 Basen/min betrug:

Denaturierung:	94 °C	2 min	
30 Zyklen:	94 °C	30 s	Denaturierung
	40-60 °C	30 s	Oligonukleotid-Anlagerung
	72 °C	1 min	Polymerisierungsreaktion

2.3.3 RNA-Arbeiten

Für RNA-Arbeiten wurden RNase-freie Plastikmaterialien, Wasser und Lösungen verwendet. Diese wurden durch 40-minütiges Autoklavieren bei 121 °C, 1 Bar sterilisiert.

2.3.3.1 RNA-Präparation

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurden je nach Zelldichte der Kultur 1 bis 5 ml Zellkultur durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur geerntet, in 700 µl RA1-Puffer + 7 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und mit 300 mg Glaskügelchen (0,15-0,2 mm Durchmesser; Sigma, Deisenhofen) durch zwei aufeinander folgende Passagen in einem Fast-Prep120 Instrument (Q-Biogene, Heidelberg) bei 6,5 m/s für 30 s aufgebrochen. Die

Reinigung der RNA aus der resultierenden Suspension erfolgte mit dem *Nucleospin RNA II Kit* (Machery-Nagel, Düren). Sollten höhere RNA-Ausbeuten erzielt werden, wurde das *Nucleospin RNA L Kit* der Firma Machery-Nagel (Düren) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Der in beiden Kits enthaltene DNaseI-Verdau wurde wegen schlechter Effizienz nicht durchgeführt, stattdessen wurde nachfolgend mit DNase RQ1 (Promega, Wisconsin, USA) behandelt. Dazu erfolgte der DNA-Verdau während einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C. Danach wurde 1 µl RQ1 Stopplösung (Promega, Wisconsin, USA) zugegeben und die DNase durch eine Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Erforderten nachfolgende Reaktionen eine geringe MgCl₂-Konzentration, so schloss sich eine Reinigung der RNA über S.N.A.P.-Säulen aus dem *Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Protokoll des Herstellers an.

Ansatz:

- 8 µl RNA-Probe (8-10 µg)
- 1 µl RQ1 DNase 10 X Reaktionspuffer
- 1 µl RQ1 DNase (1 U/µl)

2.3.3.2 Herstellung Digoxigenin-markierter *antisense*-RNA-Sonden

Die für den Nachweis spezifischer mRNA's durch RNA-Hybridisierungsexperimente benötigten *antisense*-RNA-Sonden wurden über eine *in vitro* Transkription hergestellt. Dazu wurde zunächst ein ca. 500 bp großes DNA-Fragment des kodierenden Bereichs des entsprechenden Gens über PCR aus dem Genom vervielfältigt und anschließend über Gelelektrophorese gereinigt. Die erhaltenen Fragmente wurden mit einem zur *in vitro* Transkription geeigneten Vektor wie pDrive, pGEM3z oder pGEM4z ligiert und die resultierenden Konstrukte (Tabelle 2-2) per Restriktionsanalyse getestet. Diese Vektoren besitzen stromaufwärts bzw. stromabwärts der *multiple cloning site* einen SP6- bzw. T7-Promotor. Das Plasmid wurde am 5'-Ende des PCR-Fragments linearisiert, über Gelelektrophorese gereinigt und anschließend der am 3'-Ende gelegene Promotor für die *in vitro* Transkription verwendet. Die Markierung der RNA-Sonden erfolgte mit Digoxigenin-11-dUTP.

in vitro Transkriptionsansatz:

- ~1 µg linearisiertes Plasmid
- 2 µl 10 X Transkriptions-Puffer (Roche Diagnostics)
- 2 µl DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche Diagnostics)
- 1 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas)
- 2 µl SP6- oder T7-Polymerase (Roche Diagnostics)

mit RNase-freiem H₂O_{dd} auf 20 µl auffüllen und mischen.

Die *in vitro* Transkription erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde das DNA-Template durch Zugabe von 1 µl RNase-freier RQ1-DNase (Promega, Wisconsin, USA) verdaut (25 min, 37 °C). Die *antisense*-RNA-Sonden wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.3.3 RNA-Hybridisierungen

Die Änderungen im Transkriptionsmuster der untersuchten Gene wurden über RNA-Hybridisierungen (*Dot Blots*) untersucht. Pro *Dot* wurden je 3 µg RNA-Probe mit 90 µl 10 X SSC-Puffer mit Bromphenolblau vermischt. Der Transfer der Proben auf die Nylonmembran (BioBond Nylon Membrane, Sigma, Deisenhofen) wurde mit einem "Dot Blotter" (S & S Minifold I, Schleicher & Schüll, Dassel) durchgeführt. Hierfür wurde auf die Siebplatte der Blotting-Apparatur ein mit 10 X SSC befeuchtetes Whatman-Filterpapier und darauf die Nylonmembran gelegt, die zuvor gewässert und anschließend in 10 X SSC äquilibriert wurde. Auf die Nylonmembran wurde die Absaugplatte der Apparatur gelegt. Durch Anlegen eines Vakuums wurde durch alle zu benutzenden Löcher 400 µl 10 X SSC-Puffer bei 100 mbar gesaugt. Anschließend wurden die RNA-Proben aufgetragen und bei 15 mbar langsam durchgesaugt. Zum Trocknen der Membran wurde die Pumpleistung anschließend noch für einige Minuten auf 100 mbar gestellt. Danach wurde die Membran entnommen und die RNA zweimal bei jeweils 125 mJ/cm² im UV-Crosslinker UV-fixiert (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg).

Für die Hybridisierung wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. In einer einstündigen Prähybridisierung wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit Blockingreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 50 °C im

Hybridisierungssofen blockiert. Anschließend wurde 3 µl DIG-markierte RNA-Sonde zugegeben und über Nacht bei 68 °C hybridisiert.

2.3.3.4 Wasch- und Detektionsschritte für RNA-Hybridisierungen

Nach der Hybridisierung der *antisense*-Sonde mit der RNA wurde die Membran zweimal 15 min bei Raumtemperatur in Waschlösung A, zweimal 25 min bei 65 °C in Waschlösung B und anschließend 2 min bei Raumtemperatur in Waschlösung C gewaschen. Die Blockierung der Membran erfolgte mit 20 ml 1 X Blockierungslösung für 30 min. Anschließend wurde das Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim) 1:10.000 in der 1 X Blockierungslösung verdünnt und die Membran weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper-Konjugat wurde dreimal 20 min bei Raumtemperatur mit Waschlösung C gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 min in Detektionspuffer äquilibriert und zum Nachweis der Hybridisierung mit CSPD-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:100 in Detektionspuffer benetzt. Die Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschweißt und 15 min im Dunklen bei 37 °C inkubiert. Danach wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Mit der entstehenden Chemolumineszenz wurden Röntgenfilme der Firma Kodak belichtet oder die Signale mit dem *Luminescent Image Analyzer* mit integrierter CCD-Kamera (Fuji Photo Film Co., Omiyama, Japan) detektiert.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für RNA-Hybridisierungsexperimente.

Lösung	Zusammensetzung
Waschlösung A	2 X SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung B	0,1 X SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung C	Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween 20
20 X SSC	3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat, pH 7,0 (HCl)
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 (NaOH)
(Prä-)Hybridisierungslösung	50 ml Formamid, 20 ml 10 X Blockingreagenz, 25 ml 20 X SSC, 1 ml Na-Lauroylsarkosinat (10 % (w/v)), 200 µl SDS (10 % (w/v)), ad 100 ml H ₂ O _{dd} .
10 X Blockingreagenz	10 g Blockingreagenz (Roche Diagnostics) in 100 ml Maleinsäurepuffer durch Erwärmen lösen. Für eine 1 X Blockierungslösung wurde die Stock-Lösung in Maleinsäurepuffer 1:10 verdünnt. Aufbewahrung bei 4 °C.
Detektionspuffer	0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH 9,0 (NaOH)
10 X MOPS-Puffer	200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0 (NaOH)

Die Auswertung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit der Software AIDA (*Advanced Image Data Analyzer*, Fuji Photo Film Co., Omiyama, Japan) sowie Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA). Hierfür wurde der Hintergrund definiert und von der detektierten Signalstärke abgezogen. Anschließend wurden die Daten von Kontrollzellen auf den Wert '1' gesetzt und alle Änderung auf diesen Wert bezogen.

2.3.3.5 DNA-Microarrays

RNA wurde nach obiger Beschreibung (2.3.3.1) präpariert und durch DNaseI-Verdau von DNA-Kontaminationen befreit. Eine Kontrolle des DNA-Verdaus erfolgte über PCR. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch über den Quotienten aus A_{260}/A_{280} (Absorption bei 260/280 nm) bestimmt. Zusätzlich wurden RNA-Hybridisierungsexperimente zur weiteren Qualitätskontrolle durchgeführt. Die anschließende Untersuchung mittels DNA-Microarrays wurde im Forschungszentrum Jülich von T. Ishige durchgeführt. Hierzu wurde die RNA in einer Reverse Transkriptase-PCR-Reaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen FluoroLink Cy3-dUTP green und FluoroLink Cy5-dUTP red (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, England) markiert. Im ersten Hybridisierungsschritt wurde die cDNA von Kontrollzellen auf einen *Microarray* aufgetragen. Im zweiten Schritt wurde auf diesen *Microarray* die cDNA von den Zellen der untersuchten Bedingung gegenhybridisiert. Mit einem Laserscanner (GenePix 4000, Axon Inc., Union City, Kalifornien, USA) wurde die Intensität der Fluoreszenz bei 635 und 532 nm gemessen. Zur Kontrolle wurden die Farbstoffe in einer erneuten RT-PCR zwischen der RNA von Kontrollzellen und geschockter Zellen vertauscht und ein sog. *colour swap*-Experiment durchgeführt. Die Daten wurden ebenfalls im FZ Jülich mit der Software GenePix v3.0 (Axon Inc.) quantifiziert und ausgewertet. Die normalisierten Werte wurden nur dann weiter analysiert, wenn sie um das Dreifache vom Grundrauschen (*signal-to-noise ratio*) abwichen. Für die Werte mehrerer unabhängiger *Microarray*-Experimente mit unterschiedlichen biologischen Proben wurden p-Werte errechnet. Ein Gen galt als signifikant reguliert, wenn sein p-Wert kleiner als 0,05 war.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Membranpräparation

Membranen wurden aus Kulturüberständen von *C. glutamicum* ATCC13032, *Cgl-betP* und *Cgl-ectP* präpariert. Dazu wurden 100 ml Zellen bei 4000 rpm und Raumtemperatur geerntet, mit 50 mM KP_i /NaCl-Puffer gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Aufschlusspuffer aufgenommen (70 mM KCl, 10 % Glycerin, 50 mM TRIS und EDTA-freies Complete, Roche Diagnostics, Mannheim) und mit 300 mg Glaskügelchen (0,15 - 0,2 mm Durchmesser; Sigma, Deisenhofen) durch fünf aufeinander folgende Passagen in einem Fast-Prep120 Instrument (Q-Biogene, Heidelberg) bei 6,5 m/s für 30 s aufgebrochen. Der Überstand wurde 15 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert und so von Zelltrümmern befreit. Das Pellet wurde in Aufschlusspuffer resuspendiert und in einer Beckman-Ultrazentrifuge (Optima-TLX, Beckman Coulter Inc., Unterschleißheim-Lohhof) bei 90000 rpm zentrifugiert. Das Membranpellet wurde mit Aufschlusspuffer einmal gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wurde das Membranpellet in 2 ml desselben Puffers aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.2 Quantitative Bestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Hierzu wurde das *dye reagent no. 1* (0,01 % SERVA Blue G, 1,6 M Phosphorsäure, 0,8 M Ethanol; Read und Northcote, 1981) verwendet.

2.4.3 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden auf 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine mit 4 X Probenpuffer (20 % Glycerin, 8 % SDS, 400 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 mM EDTA, 100 μ M β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) versetzt. Die Färbung des Gels erfolgte mit 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Sambrook *et al.*, 1989). Zum Entfärben wurde 10 %-ige Essigsäure verwendet.

2.4.4 Western Blot-Analyse

Immunoblot-Analysen wurden zum Nachweis der Transporter für kompatible Solute BetP und EctP in Membranpräparationen des Wildtyps sowie der Mutantenstämme Cgl-*betP* und Cgl-*ectP* durchgeführt. Bei den Antikörpern handelte es sich um polyklonale Immunglobuline aus Kaninchen (BetP) bzw. Meerschweinchen (EctP). Die Übertragung der Proteine von SDS-Gelen auf PVDF-Membranen (0,45 µm Porendurchmesser, Millipore, Eschborn) erfolgte nach dem *semi dry blotting*-Verfahren von Kyhse-Anderson (1984). Die Transferdauer betrug 30 bis 60 Minuten. Nach Absättigung freier Bindungsstellen mit 5 %iger Milchpulverlösung wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (Kaninchen-anti-BetP bzw. Meerschweinchen-anti-EctP) in 1:2500-facher Verdünnung zwei Stunden lang inkubiert. Nach Waschen der Membran wurde der zweite Antikörper, ein Ziege-anti-Kaninchen- bzw. Ziege-anti-Meerschweinchen-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma, Taufkirchen), zugegeben (1:10000) und 1 h inkubiert. Überschüssiges AP-Konjugat wurde durch weitere Waschschriffe entfernt. Der Nachweis der Proteine erfolgte kolorimetrisch durch die von der Alkalischen Phosphatase katalysierte Umsetzung der Substrate NBT und BCIP (Sigma, Taufkirchen). Die Auswertung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit der Software AIDA (*Advanced Image Data Analyzer*, Fuji Photo Film Co., Omiyama, Japan) sowie Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA). Hierfür wurde der Hintergrund definiert und von der detektierten Signalstärke abgezogen. Anschließend wurden die Daten von Kontrollzellen auf den Wert '1' gesetzt und alle Änderung auf diesen Wert bezogen.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung mit CTAB

Zum Nachweis cytoplasmatischer Aminosäuren wurden den Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten 0,5 bis 1 ml Zellen entnommen und durch Vakuumsaugfiltration an Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) adsorbiert. Die Filter wurden zweimal mit 2,5 ml isoosmolarer NaCl-Lösung gewaschen und mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml 0,1 % CTAB inkubiert. Die permeabilisierten Zellen wurden von den Filtern gespült und sedimentiert (20000 g, 7 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2 HPLC-Analysen

Die quantitative Analyse von Aminosäuren wurde mit einem Umkehrphasen-HPLC-System (HP1090, HP1046A *Fluorescence Detector*, oder HP1100 *Liquid Chromatograph*, HP 1100 Series *Fluorescence Detector*, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn) mit automatisierter Vorsäulen-Fluoreszenzderivatisierung basierend auf der von Schuster (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Derivatisierung primärer Aminosäuren erfolgte mit ortho-Phthaldialdehyd 2-Mercaptopropionsäure (OPA-MPA), sekundärer Aminosäuren mit 9-Fluorenylmethylchlorformiat (FMOC).

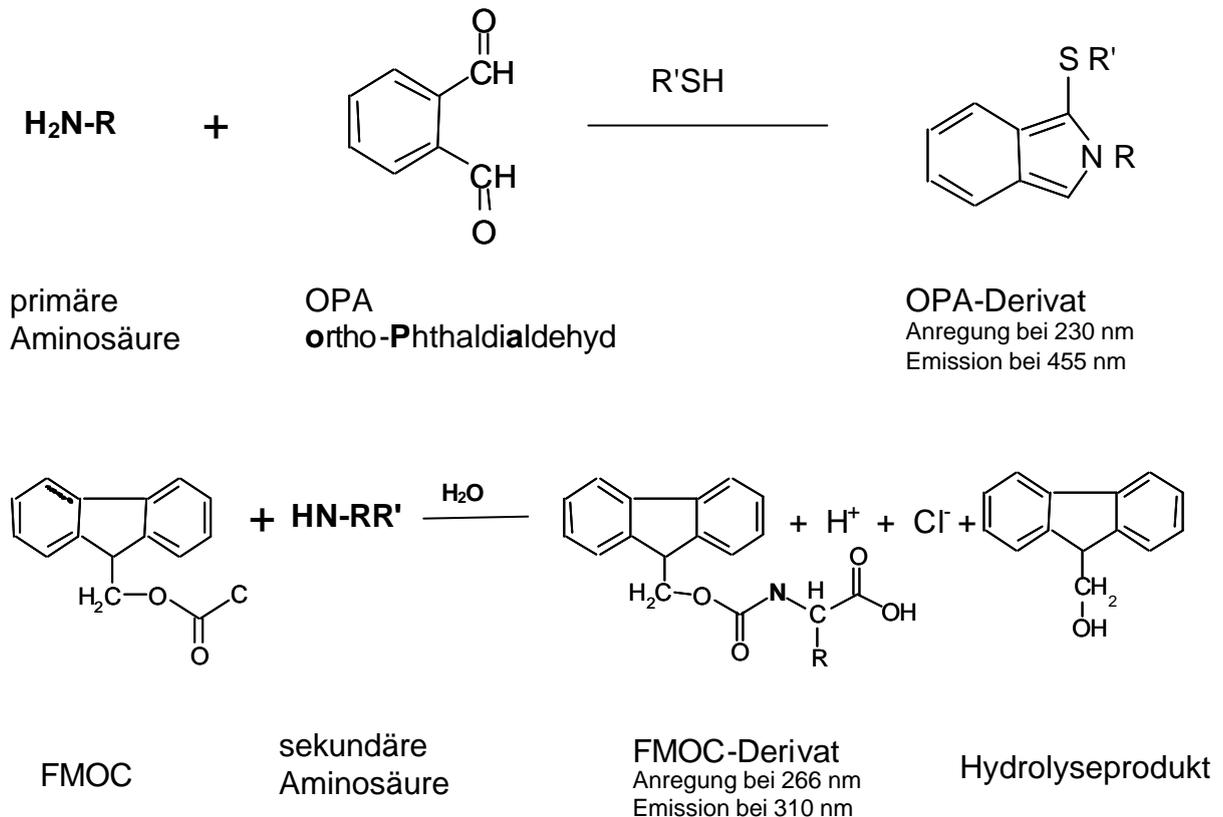


Abbildung 2-1: Derivatisierung primärer Aminosäuren mit ortho-Phthaldialdehyd / Mercaptopropionsäure und sekundärer Aminosäuren mit 9-Fluorenylmethylchlorformiat.

Die Auftrennung der dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Schuster, 1988) wurde je nach verwendetem HPLC-System (1090 bzw. 1100) mit unterschiedlicher Säulenausstattung und verschiedenen Laufmitteln bei 40 °C durchgeführt.

Tabelle 2-6: Säulenausstattung und verwendete Laufmittel für HPLC-Analysen.

	HP1090	HP1100
Vorsäule	Hypersil ODS 5, 40 x 4,6 mm (CS-Chromatographieservice, Langerwehe)	EC 40/4 Nucleodur 100-5 C-18 ec (Machery-Nagel, Düren)
Hauptsäule	Hypersil ODS 5, 125 x 4,6 mm (CS-Chromatographieservice, Langerwehe)	EC 125/4 Nucleodur 100-5 C-18 ec (Machery-Nagel, Düren)
Puffer A	30 mM NaAc (pH 7,2) / 0,5 % THF (modifiziert nach Gratzfeld-Huesgen, 1999)	35 mM NaAc (pH 6,5) / Puffer A (95 : 5; v/v) (modifiziert nach Schuster, 1988)
Puffer B	ACN / MeOH / 0,1 M NaAc (pH 7,2) (2 : 2 : 1, v/v/v) (modifiziert nach Gratzfeld-Huesgen, 1999)	MeOH / ACN (1 : 1, v/v) (modifiziert nach Schuster, 1988)

Die zur Auftrennung verwendeten Zeitprogramme (modifiziert nach Gratzfeld-Huesgen, 1999) sind in Tabelle 2-7 dargestellt. Nach 6 min wurden zur Detektion von Prolin Anregungs- und Emissionswellenlängen (Ex./Em.) von OPA (Ex.: 230 nm, Em.: 455 nm) auf FMOC (Ex.: 266 nm, Em.: 310 nm) umgestellt.

Tabelle 2-7: Laufmittel-Gradienten für HPLC-Analysen.

HPLC 1090				HPLC 1100			
Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Fluss [ml/min]	Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Fluss [ml/min]
0	93	7	0,8	0	90	10	1
1,25	90	10	0,8	3	80	20	1
2	85	15	0,8	3,5	70	30	1
3,8	50	50	1	5,5	62	38	1
8,9	0	100	1	7	35	65	1
				8,8	0	100	1
				10,8	0	100	1

Die Bestimmung der zellulären Aminosäurenkonzentrationen erfolgte über Vergleichsläufe mit Aminosäurestandards der Konzentrationen 100 / 200 / 300 / 400 μ M. Die Steuerung und Auswertung erfolgte mittels der HP Chemstation Software v 6.03 (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn).

2.5.3 Bestimmung der Transportraten

Zellen von *C. glutamicum* wurden abzentrifugiert und zweimal mit 50 mM $K_2P_4/NaCl$ -Puffer, pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Puffer aufgenommen, auf eine OD_{600} zwischen 1 und 8 (je nach erwarteter Aufnahme rate)

eingestellt (doppelt konzentriert), mit 10 mM Glucose energetisiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Durch Mischen von doppelt konzentriertem 1,2 M KP_i/NaCl -Puffer und der Zellsuspension wurde der eigentliche Versuchsansatz mit V_{\max} -Bedingungen hergestellt ($\text{OD}_{600} = 0,5 - 4$; $600 \text{ mM NaCl} \approx 1,2 \text{ osmol/kg}$). Die Zellen wurden für 3 min bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Belüftung durch Rühren inkubiert, bevor die Aufnahme durch Zugabe von einem Gemisch aus unmarkiertem und [^{14}C]-markiertem Substrat gestartet wurde. Es wurde die fünffache Konzentration des K_M -Wertes des untersuchten Transporters (Abbildung 1-1) als unmarkiertes Substrat hinzugegeben, um V_{\max} -Bedingungen einzustellen. Je $200 \text{ }\mu\text{l}$ des Messansatzes wurden 15, 30, 45, 60 und 90 sec nach Zugabe des Substrats entnommen. Um die Zellen von dem umgebenden Medium zu trennen, wurde die schnelle Membranfiltration über Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hölzel, Dörfen) angewendet. Durch unmittelbares zweimaliges Waschen mit jeweils $2,5 \text{ ml } 0,1 \text{ M LiCl}$ -Lösung wurde das an den Zellen oder Filtern anhaftende Medium entfernt. Anschließend wurden die Filter in ein Szintillationsröhrchen gelegt und mit $3,8 \text{ ml}$ Szintillationscocktail (Rotiscint ecoplus, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) versetzt. Zur Bestimmung der Gesamt-Radioaktivität im Messansatz wurden weitere $200 \text{ }\mu\text{l}$ Lösung direkt in ein Szintillationsröhrchen gegeben. Die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckman Coulter Inc., Unterschleißheim-Lohhof) vermessen. Die gemessene Radioaktivität ergab die aufgenommene Menge Substrat eines einzelnen Zeitpunktes:

$$r_{\text{up}} = \frac{A_{\text{Probe}} \cdot [S_{\text{Probe}}]}{A_{\Sigma} \cdot V_{\text{Probe}} \cdot F_{\text{BTM}} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}}$$

r_{up} = aufgenommene Menge Substrat [$\text{nmol} \cdot (\text{mg BTM})^{-1}$]

A_{Probe} = Radioaktivität der Probe [dpm]

$[S_{\text{probe}}]$ = Substratmenge im Probenvolumen [nmol]

A_{Σ} = Gesamt-Radioaktivität [dpm]

V_{Probe} = Probenvolumen [ml]

F_{BTM} = Trockengewichtsfaktor für *C. glutamicum* [$\text{mg BTM} \cdot \text{ml}^{-1}$]

$\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ = optische Dichte der Zellen bei 600 nm

Durch lineare Auftragung der Zeit gegen die gemessene Radioaktivität der Zellen lässt sich mit Hilfe der erhaltenen Steigung die spezifische Transportrate der Zellen berechnen.

2.5.4 Bestimmung des Korrelationsfaktors $OD_{600} \leftrightarrow BTM$

Um die aktuelle Biotrockenmasse einer Kultur über einen geeigneten Umrechnungsfaktor aus der einfacher zu bestimmenden optische Dichte bei 600 nm zu berechnen, wurde ein Korrelationsfaktor mittels schneller Membranfiltration bestimmt. Dazu wurden 0,5 ml Zellen von dem umgebenden Medium über Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hölzel, Dörfen) abgetrennt. Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 2,5 ml isoosmolarer NaCl-Lösung wurde das an den Zellen oder Filtern anhaftende Medium entfernt. Anschließend wurden die Filter entnommen und bei 65 °C einen Tag getrocknet. Die Differenz zwischen Filter-Leergewicht und -Beladungsgewicht abzüglich des Nullwertes (Filter ohne Zellen mit Saline gewaschen) entsprach der Biotrockenmasse zum gegebenen Zeitpunkt. Dieser Wert wurde mit der gemessenen OD_{600} desselben Zeitpunktes korreliert. Hieraus ergab sich eine lineare Beziehung:

$$BTM = K_F \times OD_{600} \quad [g/L]$$

BTM = Biotrockenmasse [g/L]

K_F = Korrelationsfaktor

OD_{600} = optische Dichte der Zellen bei 600 nm

2.5.5 Messung von Osmolalitäten

Die Osmolalitäten der benutzten Medien wurde mit dem Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Berlin) gemessen. Das Gerät misst die Osmolalität über Gefrierpunktniedrigung in der Lösung. Zur Zweipunkteichung des Geräts diente eine der erwarteten Osmolalität entsprechenden NaCl-Lösung und H_2O_{dd} .

3 Ergebnisse

3.1 Osmoregulation in *C. glutamicum* ATCC13032 nach hyperosmotischem Schock

Zum Schutz gegen hyperosmotischen Stress oder Schock kann *C. glutamicum* kompatible Solute aus dem umgebenden Medium aufnehmen oder selbst synthetisieren. Die Aufnahme geschieht über vier Transportsysteme (BetP, EctP, LcoP und ProP) mit unterschiedlicher Spezifität für die entsprechenden Substrate (Abbildung 1-1). Bisherige biochemische Untersuchungen an diesen Transportern zeigten, dass sie auf der Ebene der Aktivität osmoreguliert sind, d.h. ihre Transportergeschwindigkeit wird abhängig vom osmotischen Stress reguliert (Peter *et al.*, 1996 und 1998). Da die Osmolalität des Wachstumsmediums die Transportrate von BetP, aber nicht die von EctP beeinflusste, wurde geschlossen, dass das *betP*-Gen osmotisch induziert werden kann, während *ectP* konstitutiv exprimiert wird (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998). Die Gene *proP* und *lcoP* wurden bisher nicht charakterisiert. Aufgrund fehlender Daten zur Induktion wurden diese vier Gene unter osmotischen Stressbedingungen mit RNA-Hybridisierungsexperimenten untersucht und charakterisiert. So konnten qualitative und quantitative Aussagen über deren Regulation nach einem hyperosmotischen Schock getroffen werden, welche unter Berücksichtigung der physiologischen Parameter (Wachstum und Aminosäureanalysen des Cytoplasmas) ein differenziertes Bild der generellen Osmoregulation von *C. glutamicum* ergaben. In einem globalen Ansatz wurde anschließend die Transkription aller ORFs (*open reading frames*) von *C. glutamicum* mit DNA-Microarrays untersucht, um weitere Gene der Osmoregulation zu entdecken und zu untersuchen.

In Vorversuchen sollten optimale Bedingungen für diese Analysen gefunden werden. Hierzu gehörten Untersuchungen zum Einfluss des Kultivierungsmediums, der Schockstärke sowie extern verfügbarer kompatibler Solute auf den physiologischen Status und die Transkriptionsstärke der analysierten Gene.

3.1.1 Abhängigkeit der Regulation vom Medium (Grundosmolalität)

Definierte Minimalmedien für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen haben, abhängig von der Konzentration der C- und N-Quelle und dem Grad der Pufferung, stark variierende Osmolalitäten. Ein Mikroorganismus passt sich diesen Unterschieden durch Osmoregulation an, weshalb das Wachstumsverhalten, die Zusammensetzung des Cytoplasmas und die Transkriptionsstärke von Genen durch die Wahl des Mediums beeinflusst werden (Ley, 2001; Varela *et al.*, 2002). Um ein geeignetes Medium für Transkriptionsanalysen und DNA-Microarray-Experimente zu finden, wurden Versuche mit drei Minimalmedien (CgXII, MMI, AMI) durchgeführt. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* Wildtyp analysiert.

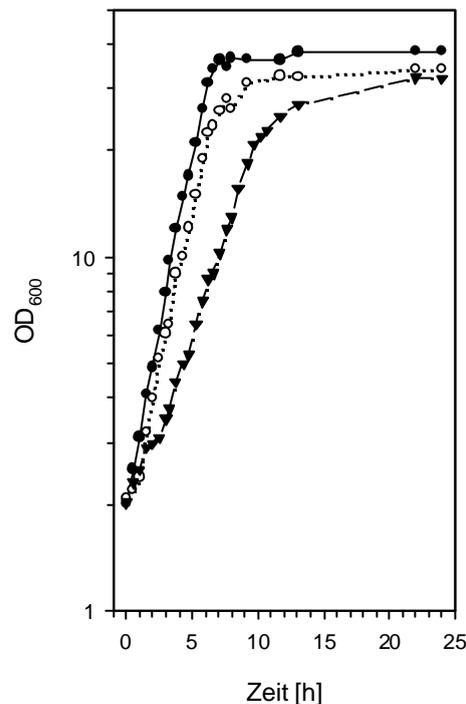


Abbildung 3-1: Wachstumsvergleich von *C. glutamicum* Wildtypzellen auf verschiedenen Medien. ● MMI-Medium; ▼ AMI-Medium (je 0,3 osmol/kg); ○ CgXII-Medium (0,8 osmol/kg).

Tabelle 3-1: Wachstumsraten μ_{\max} , Verdopplungszeiten t_D sowie End- OD_{600} von *C. glutamicum* Wildtyp auf verschiedenen Minimalmedien (zu Abbildung 3-1).

Medium	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_D [h]	End- OD_{600}
CgXII	0,39	1,8	34
AMI	0,27	2,6	32
MMI	0,51	1,6	38

Auf AMI-Medium erreichten die Zellen nach längerer *lag*-Phase die geringste Verdopplungszeit und End-Biotrockenmasse. Trotz höherer Nährstoffkonzentrationen erreichten Zellen auf CgXII-Medium wegen deutlich höherer Osmolalität des Mediums nur mittlere Biotrockenmassen. Die Wachstumsrate auf diesem Medium entspricht früheren Daten (Ley, 2001).

Für alle weiteren Experimente wurde grundsätzlich MMI-Medium verwendet. Es vereinte die Vorzüge einer geringen Osmolalität (0,3 osmol/kg) mit gutem Wachstumsverhalten (kurze *lag*-Phase, hohe Teilungsrate, hohe stationäre End-OD₆₀₀) und erlaubte so die höchste Variationsbreite für die Höhe eines hyperosmotischen Schocks in weiteren Versuchen. Eine möglichst niedrige Osmolalität des Mediums vor Schock ist insbesondere in RNA-Hybridisierungsexperimenten sowie globalen Analysen mit DNA-*Microarrays* vorteilhaft, um Transkriptionsänderungen im Vergleich zwischen ungeschockten und geschockten Zellen deutlich erkennen zu können.

In den folgenden Experimenten wurden physiologische Parameter wie die zellulären Aminosäurekonzentrationen bestimmt. Um diese auf das zelluläre Trockengewicht beziehen zu können, wurde auf MMI-Medium ein Korrelationsfaktor zwischen optischer Dichte der Kultur bei 600 nm (OD₆₀₀) und der Biotrockenmasse bestimmt. Für *C. glutamicum* Wildtypzellen auf MMI-Medium ergab sich der Faktor 0,36, d.h. bei einer OD₆₀₀ von 1 hatten die Zellen der Suspension ein Trockengewicht von 0,36 g/L.

3.1.2 Abhängigkeit der Regulation von Schockstärke & Endosmolalität

Nachdem die Kultivierung von Zellen auf MMI-Medium für die folgenden Untersuchungen etabliert worden war (siehe 3.1.1), sollten die idealen Schockbedingungen für Analysen der Transkriptionsregulation bestimmt werden. Bei Untersuchungen des Gens *proA*, welches für ein Biosyntheseenzym der als kompatibles Solut fungierenden Aminosäure Prolin codiert, wurde festgestellt, dass unterschiedlich starke osmotische Änderungen des Mediums verschiedene Muster in der Transkriptionsstärke, -dauer und -maxima zeigten (Ley, 2001). Es wurde deshalb untersucht, ob *C. glutamicum* Wildtypzellen ihr Wachstumsverhalten, die Akkumulation von Aminosäuren und die Transkriptionsmuster der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* an die Differenz zwischen Anfangs- bzw. Endosmolalität (absolute

Änderung der Osmolalität), die Endosmolalität (relative Änderung) oder an den Faktor der Erhöhung anpassten. In diesen Versuchen wurden diese Faktoren sowie die Grundosmolalität des MMI-Mediums variiert.

C. glutamicum Wildtypzellen wurden nach beschriebem Animpfschema angezogen und bei $OD_{600} = 7$ auf die angegebene Endosmolalität geschockt (Tabelle 3-2). Kurz vor dem Salzschock (T_{-5}) und zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 120 und 180 Minuten nach Salzzugabe sowie in stationären Zellen wurden Aliquots für die Untersuchung der internen Aminosäurezusammensetzung und des Transkriptionsmusters aufgearbeitet.

Tabelle 3-2: Bedingungen für osmotische Schocks von *C. glutamicum* Wildtypzellen auf MMI-Medium.

Kultur	Grundosmolalität [osmol/kg]	Endosmolalität [osmol/kg]	Differenz	Faktor
A	0,3	0,9	0,6	3
B	0,3	1,8	1,5	6
C	0,3	2,4	2,1	8
D	0,9	2,4	1,5	2,7

Anm.: Die Werte wurden so gewählt, dass die absolute Schockdifferenz oder die Endosmolalität in zwei unterschiedlichen Versuchen identisch waren (grau markiert).

Die Wachstumsparameter waren abhängig von den jeweiligen Schockbedingungen (Abbildung 3-2).

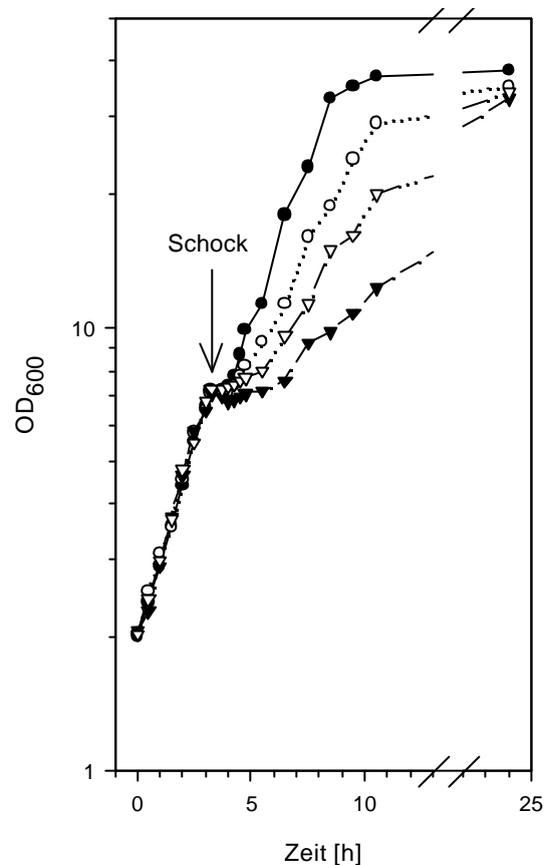


Abbildung 3-2: Wachstum von *C. glutamicum* vor und nach unterschiedlichen Änderungen der Osmolalität. ● 0,3 auf 0,9 osmol/kg; ○ 0,3 auf 1,8 osmol/kg; ▼ 0,3 auf 2,4 osmol/kg; ▽ 0,9 auf 2,4 osmol/kg.

Tabelle 3-3: Dauer der *lag*-Phasen nach Schock, Verdopplungszeit t_D und End-Biotrockenmassen zu Abbildung 3-2.

Kultur	Schock	End- OD ₆₀₀	End- BTM [g/L]	<i>lag</i> -Phase nach Schock [h]	t_D [h]	
					- Schock	+ Schock
A	0,3 auf 0,9	38	13,4	1,0	1,6	2,2
B	0,3 auf 1,8	35	12,5	1,2		3,3
C	0,3 auf 2,4	33	12,0	4,2		6,8
D	0,9 auf 2,4	34	12,3	3,2	1,8	4,8

Vor dem Schock wuchsen die Zellen der Kulturen A, B und C (Medien mit gleicher Grundosmolalität) mit identischer Wachstumsrate bzw. Verdopplungszeit, Zellen der Kultur D aufgrund der höheren Osmolalität etwas langsamer. Nach dem Schock regenerierten die Zellen unterschiedlich schnell. Kultur A (0,3 auf 0,9 osmol/kg) wuchs nach kurzer *lag*-Phase etwas langsamer als vor Schock. Die Kulturen B, C und D wuchsen nach längeren *lag*-Phasen mit verringerter Verdopplungszeit. Es

bestand eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Schockdifferenz einerseits und der Anpassungszeit sowie Wachstumsrate nach Schock (Kulturen A bis C). Der Unterschied in der Differenz hatte zudem einen größeren Einfluss auf die Zellen als die Endosmolalität, wie der Vergleich zwischen den Kulturen C und D belegt.

Nach einem hyperosmotischen Schock akkumulierten die Zellen *de novo* synthetisierte Aminosäuren (Glutamat, Glutamin und Prolin) mit osmoprotektiver Wirkung.

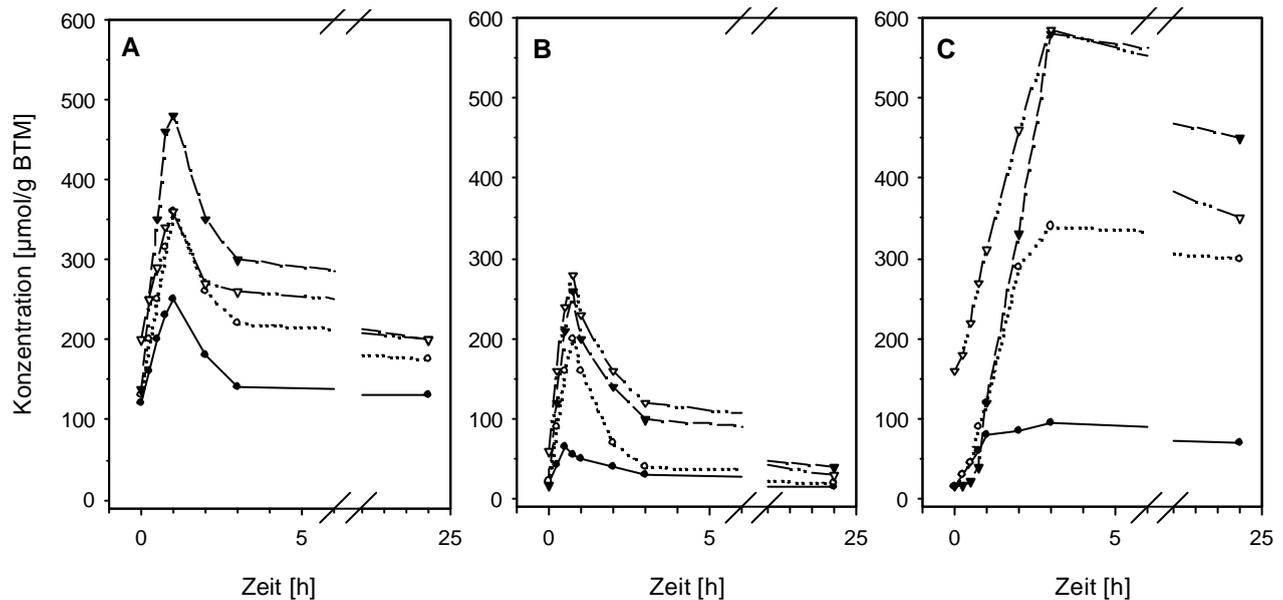


Abbildung 3-3: Cytoplasmatische Akkumulation verschiedener Aminosäuren vor und nach unterschiedlichen Änderungen der Osmolalität. ● 0,3 auf 0,9 osmol/kg; ○ 0,3 auf 1,8 osmol/kg; ▼ 0,3 auf 2,4 osmol/kg; ▽ 0,9 auf 2,4 osmol/kg. (A) Glutamat; (B) Glutamin; (C) Prolin.

Tabelle 3-4: Maximale Akkumulationsfaktoren der untersuchten Aminosäuren sowie maximale Konzentration von Prolin.

Kultur	Schock	Glu	Gln	Pro	
A	0,3 auf 0,9	2 x	3 x	6 x	95 $\mu\text{mol/g BTM}$
B	0,3 auf 1,8	3 x	10 x	23 x	340 $\mu\text{mol/g BTM}$
C	0,3 auf 2,4	4 x	14 x	38 x	580 $\mu\text{mol/g BTM}$
D	0,9 auf 2,4	2 x	5 x	4 x	585 $\mu\text{mol/g BTM}$

Die Aminosäurenkonzentrationen stiegen in den Kulturen A, B und C in Abhängigkeit von der Schockstärke. Glutamat und Glutamin wurden transient akkumuliert (Maxima bei T_{45} bzw. T_{60}) und anschließend durch Prolin ersetzt, welches das wichtigste neu synthetisierte kompatible Solut unter diesen Bedingungen war. In der stationären Phase fanden sich immer noch hohe Konzentrationen (bis zu 450 $\mu\text{mol/g BTM}$) an Prolin in allen Kulturen.

Zellen, die erhöhter Grundosmolalität ausgesetzt waren (Kultur D), akkumulierten Glutamat abhängig von der Schockdifferenz (vergleichbar Kultur B), Prolin und Glutamin in Abhängigkeit von der Endosmolalität (ähnlich Kultur C). Zusätzlich wirkte sich die Grundosmolalität auf erhöhte Vor-Schock-Konzentrationen im Vergleich zu den Kulturen A bis C aus, so dass wesentlich geringere Akkumulationsfaktoren bestimmt wurden. Dies weist auf die Anpassung der Zellen an die erhöhte Osmolalität des Mediums und die osmoprotektive Bedeutung der untersuchten Aminosäuren hin.

In Gram-positiven Bakterien wird ein hoher Turgordruck von bis zu 20 bar durch Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen aufgebaut. In *C. glutamicum* liegt Glutamat bereits bei niedrigen osmolaren Bedingungen (0,3 osmol/kg) höher konzentriert vor (120 $\mu\text{mol/g}$ BTM), als dies für biosynthetische Zwecke notwendig ist und dient vermutlich der Aufrechterhaltung des Turgors.

Wie bereits beschrieben wurde, bewirkten unterschiedlich starke Änderungen der Osmolalität des Mediums verschiedene Transkriptionsmuster des Gens *proA*. Deshalb wurden die Transkriptionsmuster der Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* nach unterschiedlichen hyperosmotischen Schocks mit Hilfe von RNA-Hybridisierungsexperimenten untersucht.

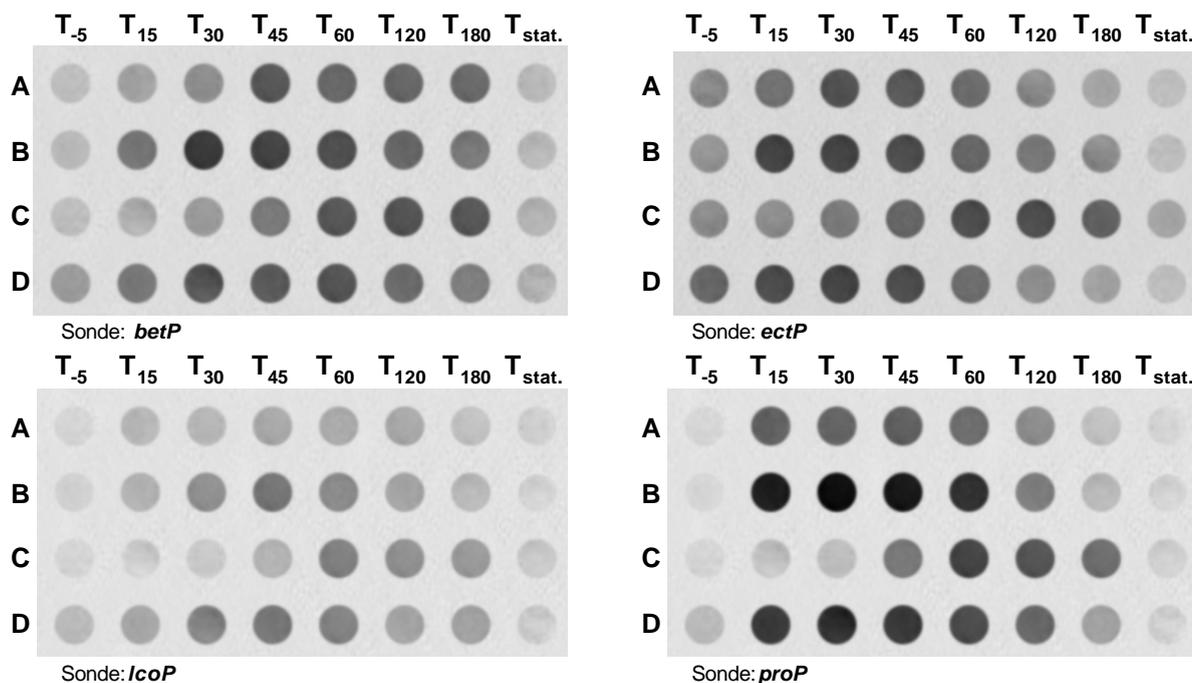


Abbildung 3-4: Änderung der Transkription der Gene *ectP*, *betP*, *IcoP* und *proP* nach unterschiedlich starken hyperosmotischen Schocks. (A) 0,3 auf 0,9 osmol/kg; (B) 0,3 auf 1,8 osmol/kg; (C) 0,3 auf 2,4 osmol/kg; (D) 0,9 auf 2,4 osmol/kg.

Die Quantifizierung der Transkriptionsmuster erfolgte mit der Software AIDA (Fuji Photo Film Co., Omiyama, Japan). Hierzu wurde der Hintergrundlevel von den gemessenen Spot-Intensitäten subtrahiert. Anschließend wurden die T₋₅-Werte auf 1 gesetzt und die Induktionsfaktoren im Vergleich zu diesem Wert bestimmt. Vergleiche zwischen Daten aus einzelnen RNA-Hybridisierungsexperimenten sind so möglich. Insgesamt wurden die Werte aller Transkriptionsanalysen mehrfach reproduziert.

Tabelle 3-5: Maximale Induktionsfaktoren und -zeitpunkte von Transportergenen nach verschiedenen hyperosmotischen Schocks gemäß Tabelle 3-2.

Kultur	Schock	maximale Induktion			
		<i>betP</i>	<i>ectP</i>	<i>IcoP</i>	<i>proP</i>
A	0,3 auf 0,9	10,2 (T ₄₅)	2,2 (T ₃₀)	2,9 (T ₄₅)	12,8 (T ₁₅)
B	0,3 auf 1,8	11,5 (T ₃₀)	2,6 (T ₁₅)	3,3 (T ₄₅)	15,0 (T ₁₅)
C	0,3 auf 2,4	11,7 (T ₆₀)	2,6 (T ₆₀)	3,4 (T ₆₀)	15,2 (T ₆₀)
D	0,9 auf 2,4	6,4 (T ₃₀)	1,5 (T ₁₅)	2,8 (T ₄₅)	11,7 (T ₁₅)

Zum Zeitpunkt T₋₅ wurden alle Gene, mit Ausnahme von *ectP* sowie der Zellen aus Kultur D, gering exprimiert. Nach Schock stiegen die mRNA-Konzentrationen mit genspezifischer maximaler Induktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tabelle 3-5). In der stationären Phase waren alle mRNA-Level auf Grundwerte zurückgegangen.

Dies bedeutet, dass alle vier untersuchten Gene in ihrer Transkription durch hyperosmotischen Schock reguliert sind.

Grundsätzlich spiegelte sich die Schockdifferenz in den Transkriptionsmustern wider. Je stärker der Schock war, desto stärker wurden die Carriergene bei gleicher Grundosmolalität (Kulturen A, B und C) induziert und umso länger dauerte die Reaktion auf den Schock. Vor-Schock-Level waren bei höherosmolaren Grundbedingungen (Kultur D) jedoch deutlich erhöht, was für einen zusätzlichen Einfluss der Grundosmolalität auf die Transkriptionsregulation spricht. Hieraus resultierten geringere Induktionsfaktoren (Tabelle 3-5).

Die deutliche Induktion der Gene *proP* (Faktor 12 bis 15) und *betP* (Faktor 6 bis 12) waren besonders auffällig. *proP* wurde schneller als die anderen Gene induziert. Das Gen *ectP* wurde durch den hyperosmotischen Schock ebenfalls induziert. Untersuchungen der Aktivität des Transporters hatten zu der Interpretation geführt, dass er konstitutiv exprimiert und nicht osmoreguliert wird (Peter *et al.*, 1998).

Für eine deutliche Erkennung auch geringer Unterschiede der Transkriptionsmuster eignete sich die Kultivierung der Zellen auf MMI-Medium mit einer Grundosmolalität von 0,3 osmol/kg und hyperosmotischer Schock auf 1,8 osmol/kg am besten (Kultur B), weshalb für nachfolgende Experimente die Bedingungen von Kultur B gewählt wurden. Die Induktionsänderungen der anderen Kulturen waren entweder schwächer (Kulturen A und D) oder zeitlich zu stark verzögert (Kultur C). In Kultur D wurden zudem durch die erhöhte Grundosmolalität Änderungen des Transkriptionsmusters schon vor Schock beobachtet. Die Ergebnisse der Wachstums- und Aminosäureanalysen sprachen ebenfalls nicht gegen diese Entscheidung.

3.1.3 Bedeutung kompatibler Solute zur Kompensation eines hyperosmotischen Schocks

Kompatible Solute, die in der natürlichen Umgebung von Bodenbakterien häufig vorliegen (Lynch und Whipps, 1990; Galinski und Trüper, 1994), ermöglichen es den Zellen, sich an osmotischen Stress anzupassen. Die Kultivierung von Zellen in Anwesenheit kompatibler Solute bewirkt eine Änderung in der Transkription von Genen (Dinnbier *et al.*, 1988; Bremer und Krämer, 2000). Daher stellte sich die

Frage, ob extern vorhandene kompatible Solute Einfluss auf die Transkription der hier untersuchten Transportergene nehmen.

Hierzu wurden Wildtypzellen nach beschriebenem Schema kultiviert und in der exponentiellen Phase bei $OD_{600} = 7$ von 0,3 auf 1,8 osmol/kg geschockt. Zwei Kulturen wurden mit 2 mM Betain oder Prolin versetzt.

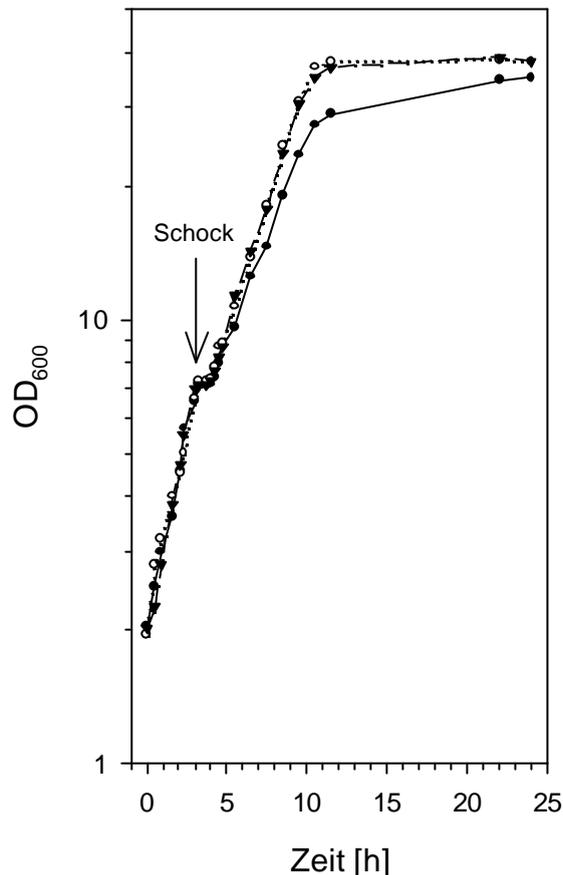


Abbildung 3-5: Wachstum von *C. glutamicum* Wildtypzellen nach einem hyperosmotischen Schock und externer Verfügbarkeit kompatibler Solute.

● keine kompatiblen Solute; ○ 2 mM Betain; ▼ 2 mM Prolin.

Tabelle 3-6: Wachstumsparameter vor und nach einem hyperosmotischen Schock.

Kultur	Komp. Solut	End-BTM [g/L]	lag-Phase nach Schock [h]	t_D [h]	
				- Schock	+ Schock
1	-	12,6	1,2	1,6	3,3
2	Betain	13,7	1,0		2,7
3	Prolin	13,7	1,0		2,8

Vor Schock wuchsen alle drei Kulturen mit gleicher Wachstumsrate. Zugabe von Betain bzw. Prolin zeitgleich zum Schock führte nach kurzer lag-Phase zu Wachstum mit verringerter Verdopplungszeit. Die Kultur ohne Zugabe kompatibler Solute zeigte

eine leicht verlängerte *lag*-Phase und anschließend eine deutlich geringere Wachstumsrate als die beiden anderen Kulturen mit kompatiblen Soluten im Medium, die in der stationären Phase identische Biotrockenmassen wie ungeschockte Zellen erreichten (Tabelle 3-3B).

Für die Bestimmung der Transkriptionsmuster wurde ein zusätzlicher Wert fünf Minuten nach Schock bestimmt (T_5), um die in obiger Analyse (Abbildung 3-4) bestimmte schnelle Induktion von *ectP* und *proP* genauer betrachten zu können.

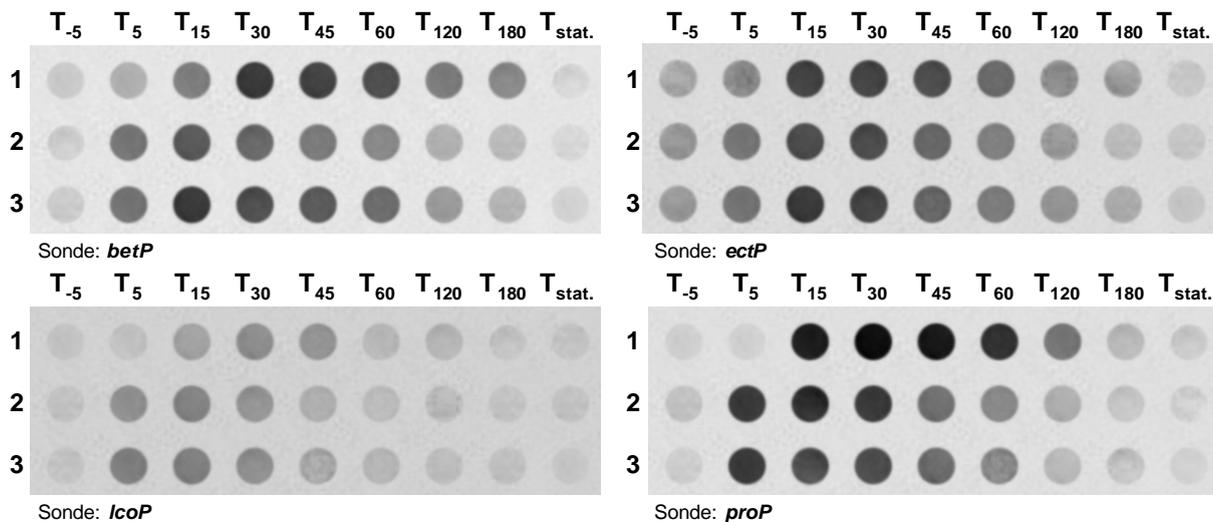


Abbildung 3-6: Änderungen der Transkriptmenge von *ectP*, *betP*, *proP*, *lcoP* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg in MMI-Medium. (1) Wildtyp, ohne Zusatz; (2) Wildtyp, Zugabe von 2 mM Betain; (3) Wildtyp, Zugabe von 2 mM Prolin. In Spalten wurden die Zeitpunkte der Probenahme aufgetragen.

Tabelle 3-7: Maximale Induktionsfaktoren der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* von Zellen ohne bzw. mit Zugabe kompatibler Solute.

Kultur	Komp. Solut	maximale Induktion			
		<i>betP</i>	<i>ectP</i>	<i>lcoP</i>	<i>proP</i>
1	ohne	11,3 (T_{30})	2,6 (T_{15})	3,4 (T_{45})	15,2 (T_{15})
2	Betain	10,6 (T_{15})	2,2 (T_{15})	2,9 (T_{15})	14,3 (T_5)
3	Prolin	10,8 (T_{15})	2,3 (T_{15})	3,0 (T_{15})	14,5 (T_5)

Obige Tabelle erfasst die Induktionsstärke der untersuchten Gene von Zellen ohne bzw. mit Zugabe kompatibler Soluten. Zellen ohne kompatible Solute im Medium verhielten sich wie unter 3.1.2 beschrieben, d.h. die Transportergene wurden nach 15 bis 30 Minuten maximal induziert, wobei die Transkriptmenge mit Ausnahme von *lcoP* über einen Zeitraum von ca. 45 Minuten erhöht blieb. Wiederum wurde Induktion von *ectP* durch den Salzschock beobachtet.

Die Zugabe von Betain bzw. Prolin zum Medium nach einem hyperosmotischen Schock bewirkte eine schnellere, aber leicht abgeschwächte Induktion der Gene sowie eine Verkürzung der Induktionsdauer. Dabei stellte *ectP* eine Ausnahme dar, dessen Transkriptionslevel durch Zugabe kompatibler Solute nur geringfügig beeinflusst wurde.

3.2 Globale Transkriptionsanalyse nach einem hyperosmotischen Schock

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation der Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* war es notwendig gewesen, Bedingungen zu finden, die eine starke Transkriptionsänderung dieser Gene zur Folge hatten. Im ersten Teil (siehe 3.1) wurden die Bedingungen etabliert, unter denen eine deutliche Änderung der Transkription untersucht werden konnte. Da hier sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden, stellte sich die Frage, inwieweit sich diese Bedingungen auch für die Untersuchung der generellen Osmostressantwort von *C. glutamicum* eignen, um so weitere Gene zu identifizieren, die an der Osmoregulation beteiligt sind. Daher wurde die Transkriptionsänderung nach einem hyperosmotischen Schock mithilfe der DNA-*Microarray*-Technik untersucht. Die schon bekannten Ergebnisse aus den RNA-Hybridisierungsexperimenten sollten dabei als Kontrolle der *Microarray*-Analysen herangezogen werden. Zusätzlich sollten die in den RNA-Hybridisierungsexperimenten beobachtete Geninduktion quantifiziert werden.

3.2.1 Globale Analyse mit DNA-*Microarrays*

Wildtypzellen (*C. glutamicum* ATCC13032) wurden nach beschriebenem Animpfschema angezogen und bei $OD_{600} = 7$ von 0,3 auf 1,8 osmol/kg geschockt. Für die DNA-*Microarray*-Analysen wurde RNA präpariert. Jede RNA-Präparation wurde auf qualitative Gleichwertigkeit überprüft. Hierzu wurde die Stärke von Verunreinigungen mit Proteinen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und ein DNase-Verdau mit anschließender Gelkontrolle durchgeführt. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde ein RNA-Hybridisierungsexperiment mit den Sonden für *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* durchgeführt, da das Transkriptionsmuster dieser Gene bereits bekannt war (siehe 3.1). Wie in Abbildung 3-7 zu erkennen ist, zeigte sich das bekannte Muster früherer Analysen. Zur weiteren Kontrolle der

Versuchsbedingungen wurden Wachstumsdaten erfasst und interne Aminosäurebestimmungen der Zellen vorgenommen. Diese physiologischen Daten entsprachen schon beschriebenen Ergebnissen (siehe 3.1). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die isolierte RNA von gleicher Qualität war wie in früheren Analysen.

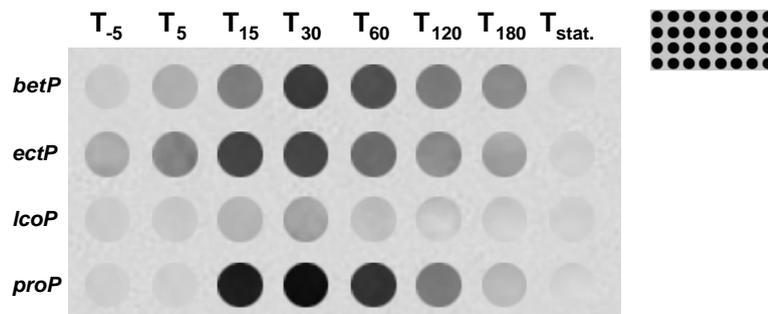


Abbildung 3-7: Transkriptionsänderungen der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg in MMI-Medium. Klein: 16S-rRNA-Kontrolle.

Anschließend wurde die RNA im FZ Jülich mittels DNA-*Microarrays* untersucht. Die RNA ungeschockter Zellen wurde als Nullwert benötigt, um die durch einen hyperosmotischen Schock induzierte Abweichung von der basalen Transkription zu erkennen. In einem RT-PCR-Schritt wurden die Nullwerte mit dem Farbstoff FluoroLink Cy3-dUTP green, die RNA geschockter Zellen mit FluoroLink Cy5-dUTP red (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, England) markiert. Im ersten Hybridisierungsschritt wurde die cDNA ungeschockter Kontrollzellen auf sechs *Microarrays* aufgetragen. Im zweiten Schritt wurde auf jeweils einen *Microarray* die cDNA geschockter Zellen eines einzelnen Zeitpunktes gegenhybridisiert. Das durch Anregung der Farbstoffe bei den entsprechenden Wellenlängen emittierte Licht wurde mit einem Laser-Scanner ausgelesen und gab unterschiedliche Konzentrationen der cDNA in verschiedenen Farben an. Zur Kontrolle wurden die Farbstoffe in einer neuen RT-PCR zwischen den Nullwerten und der RNA geschockter Zellen vertauscht und ein sog. *colour swap*-Experiment durchgeführt.

Es wurden nur solche Signale verwertet, die in beiden Experimenten vergleichbare Ergebnisse erbrachten (entspricht der Schnittmenge). Die weitere Auswertung der DNA-*Microarrays* wurde nach strengen Kriterien betrieben. Ein Signal wurde gewertet, wenn gemäß t -Test dessen p -Value $< 0,05$ war und das Signal um mehr als das dreifache vom Median des Grundrauschens abwich ($signal-to-noise\ ratio > 3$ bzw. $< 1/3$). Diejenigen Gene, die diesen beiden Anforderungen entsprachen, galten

als signifikant induziert bzw. reprimiert. Insgesamt wurde für jeden Zeitpunkt die RNA aus mindestens zwei, meistens aber drei unabhängigen Versuchen analysiert.

Gemäß diesen Auswertungskriterien wurden 141 Gene der 2860 auf dem *Microarray* befindlichen ORF's signifikant in ihrer Transkription reguliert (Auflistung im Anhang). Dabei war auffällig, dass außer im Fall von *proA* und *proP* keine Gene gemessen wurden, für die über RNA-Hybridisierungsexperimente bereits bekannt war, dass sie durch hyperosmotischen Schock induziert werden. Dies betraf z.B. *proB* und *proC* (Ley, 2001), *otsA* und *treS* (Wolf *et al.*, 2003), sowie *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* (diese Arbeit). Diese Gene entsprachen obigen Auswertungskriterien nicht und gingen im Hintergrundrauschen unter. Die Transkriptionsfaktoren dieser Gene der Osmoregulation sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

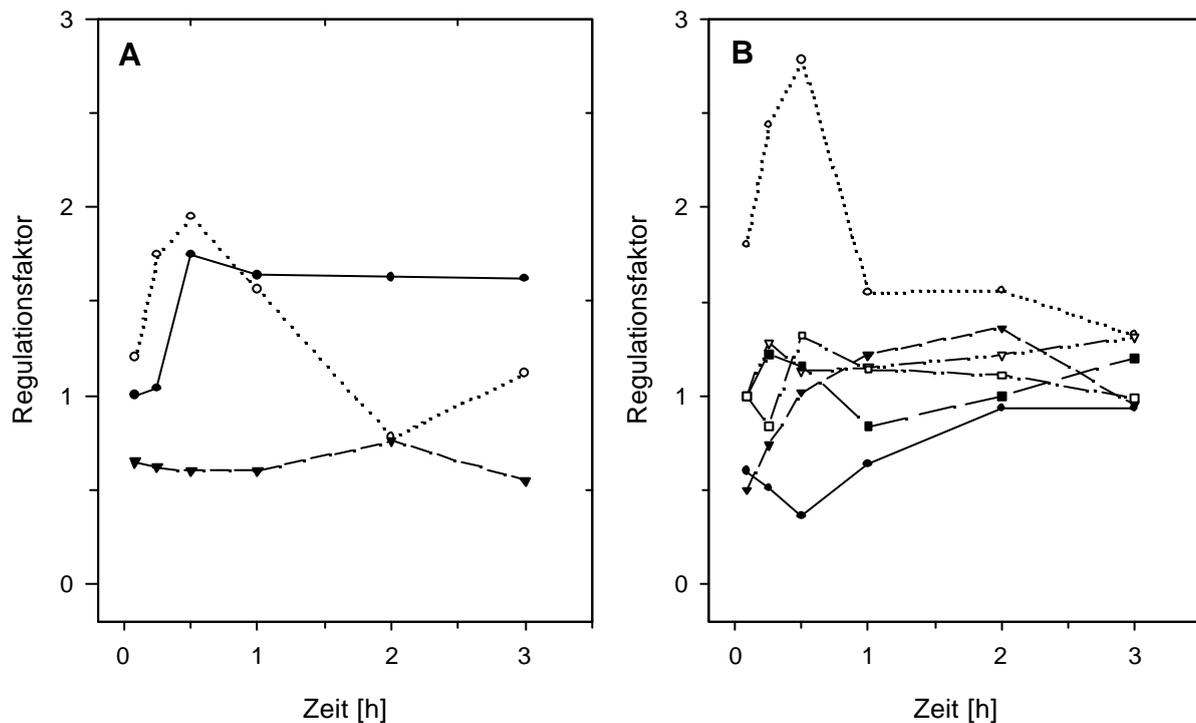


Abbildung 3-8: DNA-Microarray-Daten der Transkriptionsfaktoren wichtiger Gene der Osmoregulation nach einem Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg. Alle dargestellten Gene befinden sich im Hintergrundrauschen (*signal-to-noise ratio*) zwischen 3 und 1/3.

(A) ● *betP*; ○ *ectP*; ▼ *lcoP*; (B) ● *mscL*; ○ *proA*; ▼ *proB*; ▽ *proC*; ■ *glnA*; □ *otsA*.

Aus Gründen übersichtlicherer Darstellung wurde in Abbildung 3-8 auf *proP* verzichtet und die Induktionsfaktoren in Tabelle 3-8 aufgelistet.

Tabelle 3-8: Induktionsstärke von *proP* im DNA-Microarray.

	T ₅	T ₁₅	T ₃₀	T ₆₀	T ₁₂₀	T ₁₈₀
<i>proP</i>	2,1	3,2	5,3	10,9	19,5	2,3

Durch den hyperosmotischen Schock fand eine leichte Induktion einiger Gene (*betP*, *ectP*, *otsA*) statt. Für das Gen *IcoP* wurde keine Regulation beobachtet, obwohl in dieser Arbeit bereits eine Transkriptionssteigerung gezeigt wurde (siehe 3.1).

Unter den signifikant induzierten Genen befanden sich mehrere ABC- sowie sekundäre Transportergene und Gene, die für Enzyme der Aminosäure-, Membran- und Zellwandsynthese codieren. Reprimierte Gene betrafen wiederum ABC- sowie sekundäre Transportergene, Biosynthesegene des Zentral- und Energie-Stoffwechsels und Gene von Regulatoren sowie Transkriptionsfaktoren.

Die Daten der oft reproduzierten RNA-Hybridisierungsexperimente und der DNA-*Microarrays* waren nicht deckungsgleich. So wurde in RNA-Hybridisierungsexperimenten für die Gene *otsA* und *treS* drei- bzw. fünffache Induktion ermittelt (Wolf *et al.*, 2003), für *IcoP* und *betP* drei bzw. 11-fache Induktion (Tabelle 3-5 und Tabelle 3-7). Auch das zeitliche Muster der *proP*-Induktion stimmte nicht mit RNA-Hybridisierungsexperimenten aus dieser Arbeit überein (Tabelle 3-5 und Tabelle 3-7). Die Signalstärke der untersuchten Gene war in RNA-Hybridisierungsexperimenten, die der Qualitätskontrolle der RNA dienten (Abbildung 3-7), aber auch in allen anderen reproduzierten Experimenten (3.1) viel deutlicher als im DNA-*Microarray*-Experiment.

Durch einen zwischengeschalteten RT-PCR-Schritt wird im *Microarray* nicht die RNA selbst, sondern cDNA untersucht. Möglicherweise ergibt sich durch diesen Schritt eine Abschwächung des Signals schwach regulierter Gene.

3.2.2 Kontrolle der DNA-*Microarray*-Daten

Um die Daten sowohl der DNA-*Microarrays* aus Jülich als auch der eigenen RNA-Hybridisierungsexperimente zu verifizieren und in einen gemeinsamen Zusammenhang zu bringen, wurden für Kontrollexperimente *antisense*-RNA-Sonden von Genen hergestellt, die in DNA-*Microarray*-Analysen sehr deutliche Änderungen zeigten. Außerdem sollte ein Gen gefunden werden, welches eine unabhängige Kontrolle von der bisherigen 16S-rRNA-Standardsonde ermöglichte. Es wurden Gene ausgewählt, die zu möglichst vielen Zeitpunkten deutlich reguliert wurden bzw. keine Regulation zeigten.

Tabelle 3-9: Die für neue Sonden ausgewählten Gene gemäß den DNA-Microarray-Daten aus Jülich.

Gen	Name – Organismus	Regulation ^{*)}
<i>aro</i>	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase – <i>C. glutamicum</i>	?
<i>gcaD_Bs</i>	strong similarity to UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase – <i>B. subtilis</i>	?
<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase E1 – <i>C. glutamicum</i>	o
<i>gap</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – <i>C. glutamicum</i>	o
<i>cysN_Ec</i>	strong similarity to sulphate adenylyltransferase, large chain – <i>E. coli</i>	?
<i>mez</i>	malic enzyme – <i>C. glutamicum</i>	?
<i>nlpA_Ec</i>	strong similarity to lipoprotein-28 precursor – <i>E. coli</i>	?

^{*)} Legende: ? = Induktion; ? = Repression; o = keine Regulation.

Alle Sonden wurden in RNA-Hybridisierungsexperimenten kontrolliert. Hierzu wurde RNA verwendet, die auch in DNA-Microarray-Analysen untersucht worden war (vgl. Abbildung 3-7).

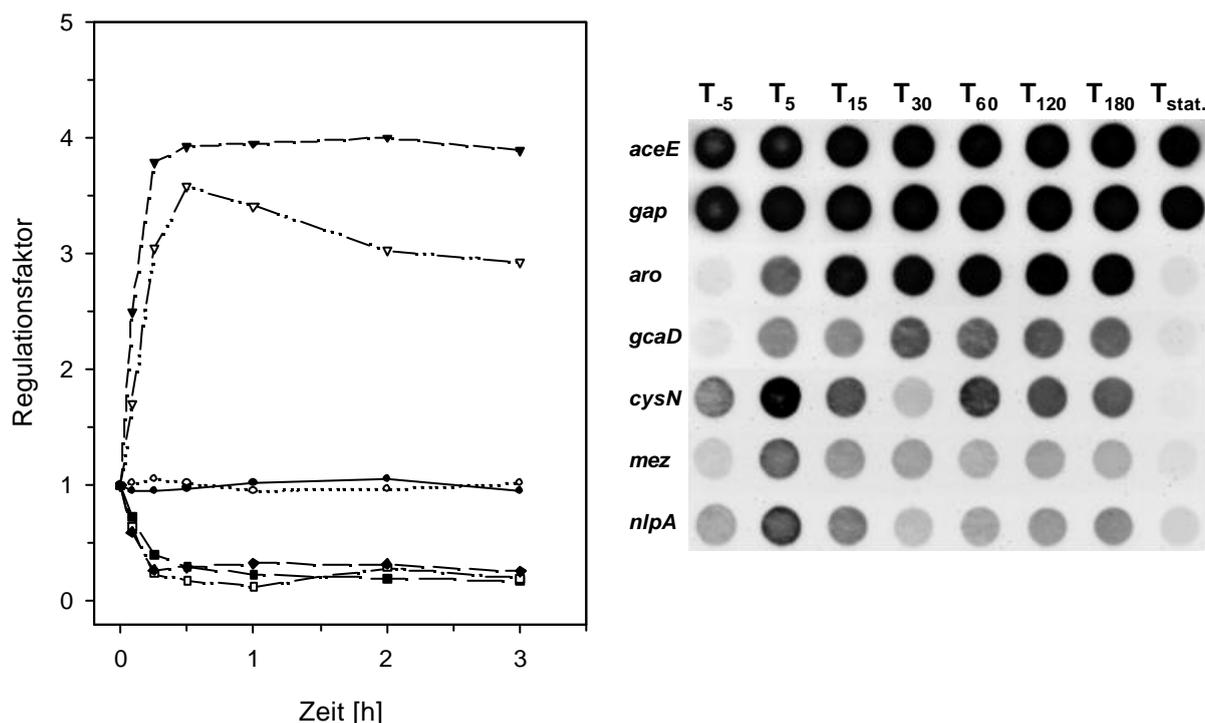


Abbildung 3-9: Regulationsfaktoren im DNA-Microarray und Transkriptionsänderung der neu konstruierten Sonden mit RNA von Wildtypzellen nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg zu verschiedenen Zeitpunkten (T_{xx}). ● *aceE*; ○ *gap*; ▼ *aro*; ▽ *gcaD*; ■ *cysN*; □ *mez*; ◆ *nlpA*.

Die Gene *aceE* und *gap* sollten nach einem hyperosmotischen Schock laut DNA-Microarray-Daten nicht reguliert werden, die Gene *aro* und *gcaD* sollten induziert werden. Diese Aussagen wurden reproduziert. Die laut DNA-Microarrays reprimierten Gene *cysN*, *mez* und *nlpA* zeigten im RNA-Hybridisierungsexperiment

ein uneinheitliches Muster von stärkeren und schwächeren Spots. Dies ließ sich nicht auf unterschiedliche RNA-Konzentrationen aufgrund der Präparation zurückführen. Die Gene *aceE* und *gap* wurden durch den hyperosmotischen Schock nicht reguliert ('housekeeping genes') und konnten anstelle von 16S-rRNA-Sonden zur Kontrolle gleichmäßiger RNA-Konzentrationen verwendet werden.

Anhand dieser Kontrolle der DNA-Microarrays über *antisense*-RNA-Sonden konnte festgestellt werden, dass nur besonders stark induzierte Gene, wie *proP*, *aro* und *gcaD*, im Microarray deutliche Daten außerhalb von Hintergrundwerten zeigten. Schwächer regulierte oder reprimierte Gene, wie z.B. *otsA* oder *mscL*, gingen im Hintergrund unter. Gegen diese Analysen spricht, dass *betP* in RNA-Hybridisierungsexperimenten 11-fach induziert wurde (Tabelle 3-5 und Tabelle 3-7), im Microarray jedoch keine Regulation zeigte. Dies könnte mit einer systematischen Abschwächung des Signals bei der Probenaufarbeitung zu begründen sein.

3.3 Untersuchung der Transkriptionsregulation einzelner Gene und Transporter

Wie in den letzten Abschnitten beschrieben wurde (3.1 und 3.2), sind die untersuchten Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* transkriptionsreguliert, weshalb untersucht werden sollte, welche Verbindung zwischen Transkriptions- und Translationsregulation besteht, um die Induktionsstärken der Gene zu quantifizieren.

Im Wildtypstamm mit vollständigem Gensatz existieren mehrere Carrier mit überlappenden Substratspektren (Abbildung 1-1), was eine Untersuchung individueller Transporter erschwerte. Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten konstruiert, die jeweils nur noch über ein Gen eines Transporters für kompatible Solute verfügten und so die Untersuchung des verbliebenen Gens bzw. Transporters ermöglichten. Mit Hilfe bereits vorhandener Deletionsplasmide (Peter, 1997; Peter *et al.*, 1998) konnten die Deletionsallele gegen die Wildtypallele durch die Technik des Allelaustauschs mit zweifacher homologer Rekombination (Schäfer *et al.*, 1994) ausgetauscht und fest im Genom von *C. glutamicum* verankert werden. Ein erfolgreicher Allelaustausch wurde mittels PCR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

In diesen Mutanten wurden im Vergleich zum Wildtyp die Änderungen der internen Aminosäurepools, die Transkriptionsregulation und die Veränderungen der

Transportraten jeweils ohne und mit einem hyperosmotischen Schock untersucht. Zusätzlich wurden die Proteinkonzentration von BetP und EctP durch Antikörpernachweis bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein neues Versuchs-Setup erprobt und etabliert (3.3.1).

3.3.1 Versuchs-Setup

Zellen wurden nach beschriebenem Animpfschema angezogen und anschließend unter drei unterschiedlichen Bedingungen (A, B, C) kultiviert. Nach Überimpfen auf frisches MMI-Medium konnte Kultur A ohne sonstigen Stress bis in die stationäre Phase wachsen, während die Kulturen B und C in der exponentiellen Phase osmotisch geschockt wurden (0,3 auf 1,8 osmol/kg). Kurz vor dem Schock wurde zu Kultur C 100 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Diese drei Bedingungen dienten der Abgrenzung der Grundaktivität sowie der basalen Transkription (A) von durch hyperosmotischen Schock induzierten Änderungen (B, C). Zu definierten Zeitpunkten T_x wurden Proben für die Analyse der Wachstumsparameter, der internen Aminosäurepools, des Transkriptionsmusters und der Transportraten aufbereitet.

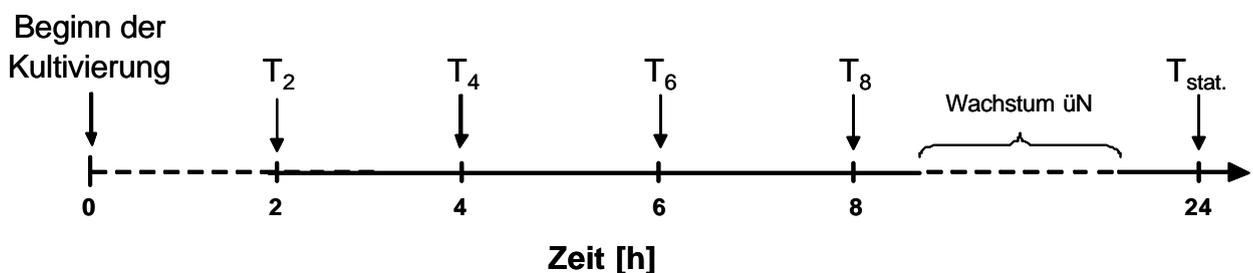


Abbildung 3-10: Zeitlicher Ablauf der Probenahmen von Zellen, die nicht osmotisch geschockt wurden (Bedingung A).

In Kultur A wurde eine Korrelation zwischen optischer Dichte (600 nm) und Biotrockenmasse erstellt. Dieser Wert war bisher nur für den Wildtyp (3.1.1) bestimmt worden. Der Faktor ist für die Berechnung der End-Biotrockenmasse einer Kultur und als Bezugsgröße für interne Aminosäurekonzentrationen wichtig.

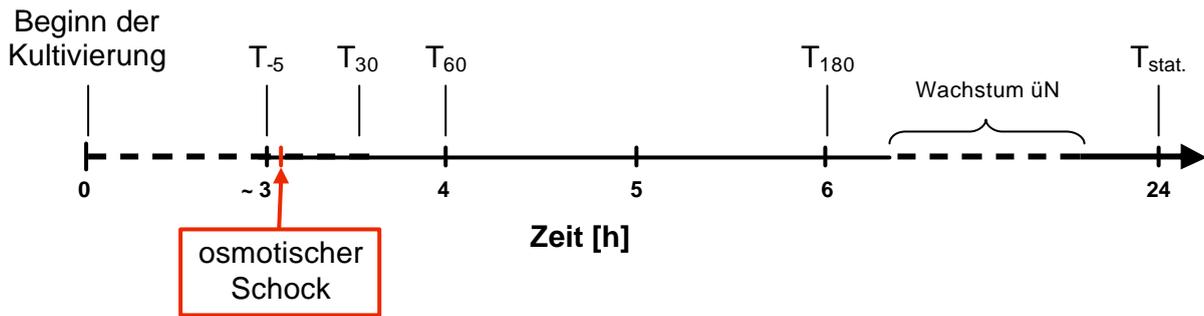


Abbildung 3-11: Zeitlicher Ablauf der Probenahmen von Zellen, die osmotisch von 0,3 auf 1,8 osmol/kg geschockt wurden (Bedingungen B und C).

Chloramphenicol inhibiert die Proteinbiosynthese und sollte in Kultur C nach Schock die Neusynthese von BetP, EctP, LcoP bzw. ProP nach Schock verhindern, so dass nur die zum Zeitpunkt des Schocks vorhandenen Transporter in den Aufnahmemessungen vermessen wurden. Auf Transkriptionsebene sollten sich keine Unterschiede ergeben. Hierdurch wurde kontrolliert, ob eine Steigerung in der Transportrate der Carrier durch Transkriptionsregulation oder Aktivierung vorhandener Transporterproteine erfolgte. Die Zugabe von Chloramphenicol zu Kultur C erfolgte kurz vor dem hyperosmotischen Schock, damit die Zellen zum Zeitpunkt des Schocks die gleiche Ausstattung an Transporterproteinen besaßen wie Zellen aus Kultur B. Den Zellen standen im Medium keinerlei compatible Solute zum Schutz gegen den hyperosmotischen Schock zur Verfügung. Anhand der Bestimmung interner Aminosäurepools sollten sich deshalb weitere physiologische Unterschiede darstellen lassen.

Tabelle 3-10: Alle Bedingungen sowie alle aufgenommenen Messwerte.

Kultur	A	B	C
Korrelationsfaktor OD ₆₀₀ ? BTM	+	---	---
Salzschock	---	bei T ₋₅ : 0,3 auf 1,8 osmol/kg	bei T ₋₅ : 0,3 auf 1,8 osmol/kg
Chloramphenicolzugabe	---	---	bei T ₋₅ : 100 µg/ml
Wachstumsdaten (BTM; μ_{max} ; t_D ; lag nach Schock)	bis T _{stat.}	bis T _{stat.}	bis T _{stat.}
Aminosäurepools (Glu, Gln, Pro)	T ₂ / 4/ 6/ 8/ stat.	T ₋₅ / 30/ 60/ 180/ stat.	T ₋₅ / 30/ 60/ 180/ stat.
Transkriptionsanalyse (RNA-Hybridisierungsexperiment)	T ₂ / 4/ 6/ 8/ stat.	T ₋₅ / 30/ 60/ 180/ stat.	T ₋₅ / 30/ 60/ 180/ stat.
Transportraten unter V _{max}	T ₂ / 4/ 6/ 8/ stat.	T ₋₅ / 30/ 60/ 180/ stat.	T ₋₅ / 30/ 60/ 180/ stat.

Zur maximalen Aktivierung der untersuchten Transporter wurden Aktivitätsmessungen unter früher bestimmten V_{\max} -Bedingungen durchgeführt (Peter *et al.*, 1996 und 1998). Um auszuschließen, dass Änderungen der Transporteraktivität durch Proteinmodifikationen vorliegen, wurde im Fall von BetP und EctP, für die Antikörper vorhanden waren, die Proteinbiosynthese mit einer unabhängigen Methode quantifiziert (3.3.3).

3.3.2 Einfluss der Waschbedingungen auf die Transportbedingungen

Für nachfolgende Experimente war es essentiell, die maximalen Aufnahmezeiten zu bestimmen, weshalb die Transporter unter V_{\max} -Bedingungen untersucht wurden. Da die Möglichkeit bestand, dass die Transportrate von der internen Konzentration an Prolin abhängt, wurde intern akkumuliertes Prolin, das neben Glutamat und Glutamin das dominanteste *de novo* synthetisierte kompatible Solut unter den getesteten Bedingungen darstellte, gemessen. Zum Vergleich wurde die Prolin-Aufnahmerate in Wildtypzellen, die kein Mal, einmal und zweimal nach den entsprechenden Versuchsvorschriften mit 0,3 osmol/kg KP_i -Puffer vor Beginn des Versuchs gewaschen wurden, bestimmt. Dieser Waschschrift induziert einen hypoosmotischen Schock mit Aktivierung von MscL und MscS (*mechanosensitive channels*), die in einem solchen Fall für das rasche Ausströmen kompatibler Solute aus dem Cytoplasma sorgen, wodurch die interne Konzentration an osmotisch wirksamen Substanzen sinkt und weniger Wasser in die Zelle strömt.

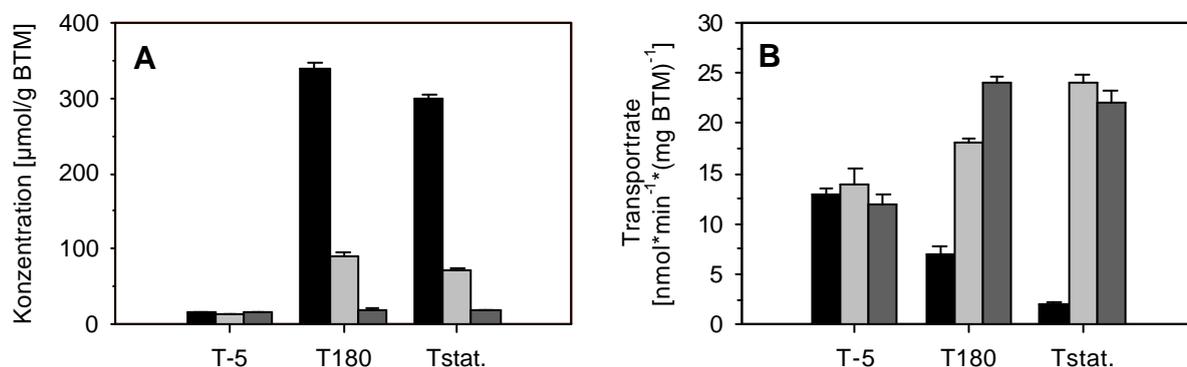


Abbildung 3-12: (A) Prolingehalt und (B) Prolin-Aufnahmerate von Wildtyp-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschschriffe mit 0,3 osM KP_i -Puffer. ■ kein Waschschrift; ■ ein Waschschrift; ■ zwei Waschschriffe.

Zum Zeitpunkt T_5 geerntete Zellen hatten kein Prolin akkumuliert (Abbildung 3-12). Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht geschockt und wurden deshalb durch Waschschriffe mit isoosmolaren KP_i -Puffer keinem hypoosmotischen Schock unterworfen. Es wurde keine signifikante Änderung des internen Prolin-pools und der Prolin-Aufnahmeraten beobachtet. Zum Zeitpunkt T_{180} war die interne Prolinkonzentration auf ca. $340 \mu\text{mol/g}$ BTM gestiegen, welche bis zum Zeitpunkt $T_{\text{stat.}}$ nur geringfügig sank. Die korrelierenden Transportmessungen zeigten deutlich, dass steigende Aufnahmeraten der Transporter ProP / EctP, den Prolin-Importern im Wildtyp, von der Anzahl der Waschschriffe und damit sinkender interner Prolinkonzentration abhängig waren. Entweder wird die intrazelluläre Prolinkonzentration oder ein anderes Signal, z.B. der Turgordruck oder eine bestimmte Membranspannung, über unbekannte Sensoren ermittelt und an die Transporter weitergegeben, welche dann in ihrer Aktivität moduliert werden. Deshalb wurden die Zellen vor allen Transportmessungen zwei Mal hypoosmolar gewaschen, um internes Prolin freizusetzen und die Transporter unter V_{max} -Bedingungen analysieren zu können.

3.3.3 Charakterisierung des WT & der Mutanten

Zur Bestimmung, ob die in den RNA-Hybridisierungsexperimenten beobachtete Transkriptionsregulation der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* (vgl. 3.1) auch in verstärkter Transportersynthese resultierte, wurde oben beschriebenes Versuchsschema verwendet (3.3.1).

Ergebnisse der Untersuchungen am Wildtyp und den Mutantenstämmen Cgl-*betP*, Cgl-*ectP*, Cgl-*lcoP* und Cgl-*proP* werden im Folgenden beschrieben.

Physiologische Parameter

Die Zellen wurden unter drei verschiedenen Bedingungen (A, B, C) nach beschriebenen Schema kultiviert (3.3.1). Durch Untersuchung physiologischer Parameter sollten phänotypische Unterschiede zwischen den Stämmen aufgezeigt und verglichen werden. Hierzu wurden verschiedene Parameter anhand der Wachstumskurven bestimmt.

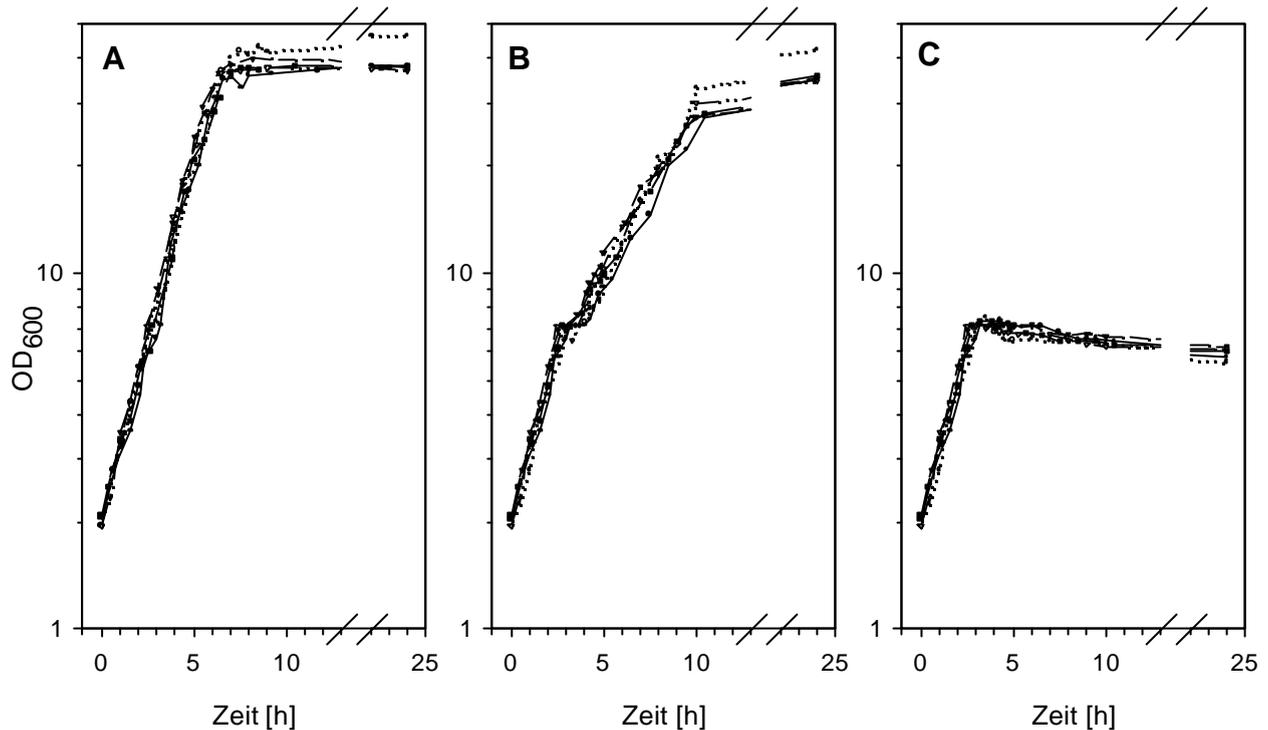


Abbildung 3-13: Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp und den Deletionsmutanten (A) ohne osmotischen Schock, (B) mit hyperosmotischem Schock in der exponentiellen Phase sowie (C) mit hyperosmotischem Schock in der exponentiellen Phase und Zugabe von 100 µg/ml Chloramphenicol. ● Wildtyp; ○ *Cgl-betP*; ▼ *Cgl-ectP*; ▽ *Cgl-icoP*; ■ *Cgl-proP*.

Tabelle 3-11: Wachstumsparameter von *C. glutamicum* Wildtyp und den Deletionsmutanten.

Stamm	Korrelationsfaktor K_F	End-BTM		Verdopplungszeit t_D		<i>lag</i> -Phase nach Schock
		[g/L]		[h]		
	BTM = $OD_{600} \times K_F$	- Schock	+ Schock	- Schock	+ Schock	[h]
WT	$0,36 \pm 0,01$	$13,7 \pm 0,4$	$12,5 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$
<i>Cgl-betP</i>	$0,26 \pm 0,03$	$12,1 \pm 0,5$	$10,6 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,2$
<i>Cgl-ectP</i>	$0,33 \pm 0,02$	$12,4 \pm 0,3$	$11,6 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$
<i>Cgl-icoP</i>	$0,34 \pm 0,01$	$12,6 \pm 0,3$	$11,7 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$
<i>Cgl-proP</i>	$0,34 \pm 0,02$	$12,9 \pm 0,4$	$12,1 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$

Aufgrund der guten Anpassung an das Medium über Nacht wuchsen die Stämme ohne erkennbare *lag*-Phase sofort exponentiell. Nach ca. sieben Stunden begann in ungeschockten Kulturen (Kultur A) die stationäre Phase, die mit einer End- OD_{600} von ~38 endete (Ausnahme: *Cgl-betP* erreichte $OD_{600} = \sim 46$). Unterschiedliche Korrelationsfaktoren gleichen diese Unterschiede aus, so dass alle Stämme vergleichbare End-Biotrockenmassen erreichten (Tabelle 3-11).

Durch hyperosmotischen Schock (Kultur B) wurde eine künstliche *lag*-Phase induziert. Exponentielles Wachstum begann stammabhängig 1 bis 1,5 h nach Schock.

Nach Osmoschock und Chloramphenicolzugabe (Kultur C) stellten die Zellen das Wachstum ein, in manchen Kulturen sank die Biotrockenmasse. Die End-Biotrockenmasse dieser Zellen lag unverändert bei 2-3 g/l. Ein Vitalitäts-Assay (2.2.4) zeigte, dass alle Zellen noch lebensfähig waren. Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass eine zu hohe Zahl toter Zellen für Aufnahmemessungen, RNA-Hybridisierungsexperimente oder Wachstumskurven verwendet wurden und deshalb Werte verfälschten.

Alle untersuchten Stämme zeigten ähnliche Wachstumsparameter. Gemäß Tabelle 3-11 erreichten geschockte Zellen eine um ca. 1 g/L niedrigere End-Biotrockenmasse als ungeschockte Zellen. Die Generationszeit verdoppelte sich aufgrund des Schocks. Die Mutanten wuchsen unter hyperosmotischen Schockbedingungen vergleichbar wie der Wildtyp.

Fraglich war, ob die Gendeletionen in den Mutantenstämmen Auswirkungen auf die Physiologie der Zellen hatten, weshalb die Aminosäurepools ohne Schock bestimmt wurden.

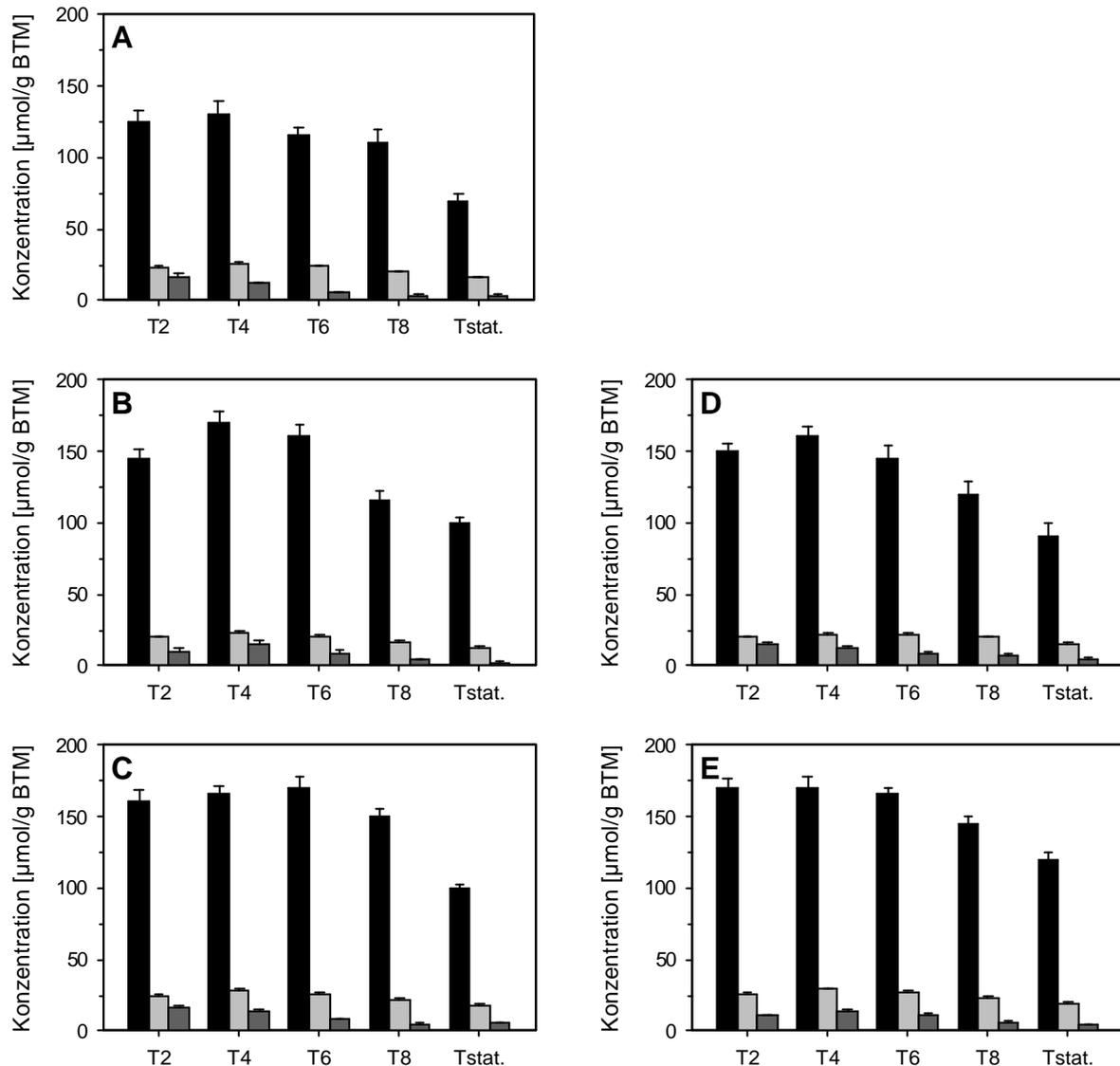


Abbildung 3-14: Interne Aminosäuren in *C. glutamicum* Wildtyp und den Deletionsmutanten. Zellen wurden auf MMI-Medium bei 0,3 osmol/kg kultiviert und nicht osmotisch geschockt. ■ Glutamat; □ Glutamin; ▒ Prolin. (A) Wildtyp; (B) *Cgl-betP*; (C) *Cgl-ectP*; (D) *Cgl-icoP*; (E) *Cgl-proP*.

Glutamat war, wie für *C. glutamicum* bereits bekannt war, in allen Mutanten recht hoch konzentriert (140-170 µmol/g BTM). Die Zellen benötigten im Verlauf der exponentiellen bis in die stationäre Phase immer geringere Konzentrationen der Aminosäure zur Aufrechterhaltung des Turgors. Die anfänglichen Glutamin- und Prolinkonzentration sanken kontinuierlich und lagen in der stationären Phase nahe der Nachweisgrenze. Anscheinend wurden diese Solute unter niederosmolaren Bedingungen (0,3 osmol/kg) sehr bedarfsgerecht synthetisiert. Die Aminosäurepools in Wildtypzellen und den Mutantenstämmen waren vergleichbar.

Schon bei Kultivierung auf schwach hyperosmotischem Medium änderten sich diese Konzentrationen gravierend (Wolf *et al.*, 2003), weshalb die Akkumulation von Glutamin, Glutamat und Prolin nach einem hyperosmotischen Schock analysiert wurde.

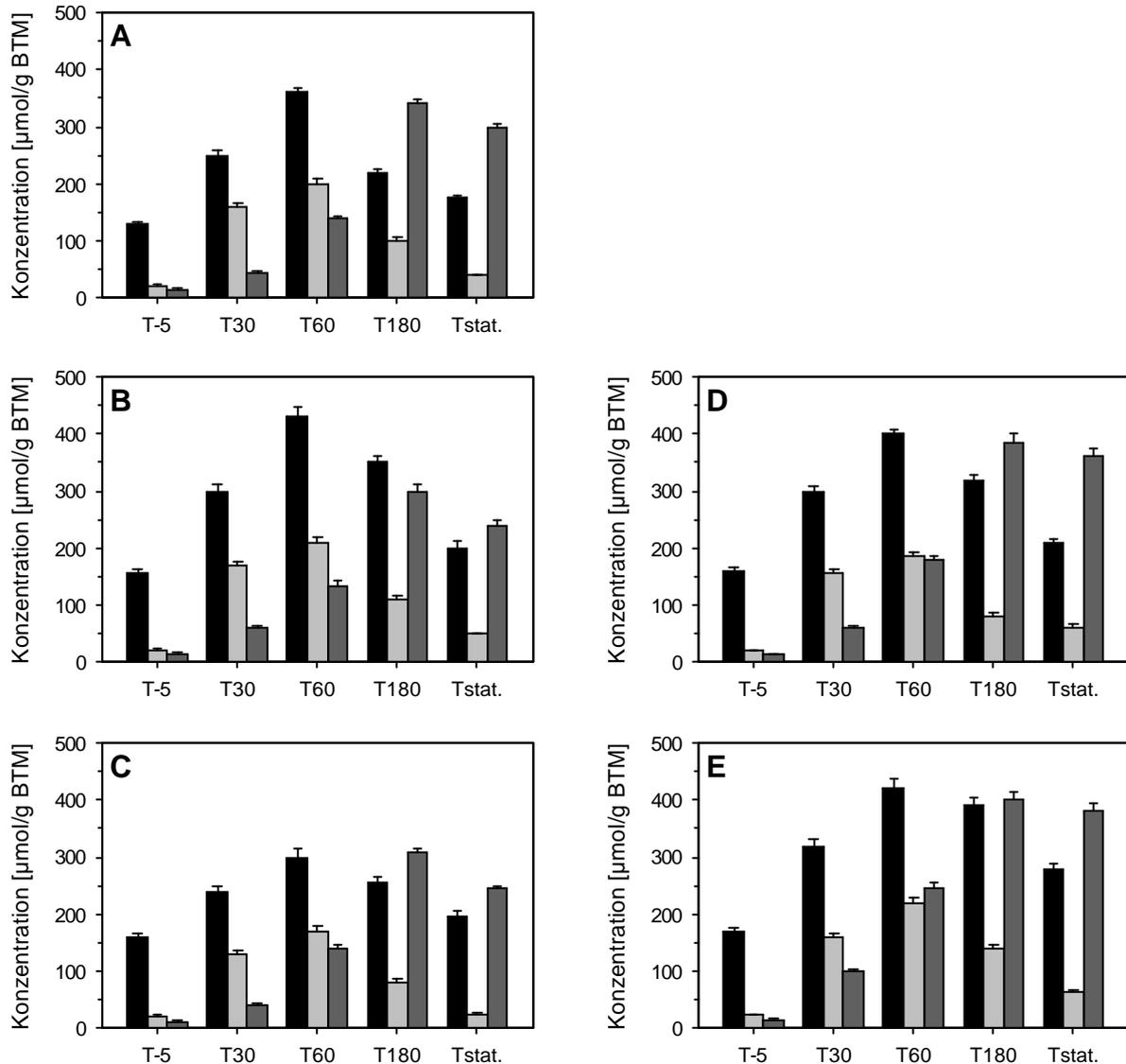


Abbildung 3-15: Interne Aminosäuren in *C. glutamicum* Wildtyp und den Deletionsmutanten. Zellen wurden auf MMI-Medium (0,3 osmol/kg) kultiviert und in der exponentiellen Phase auf 1,8 osmol/kg geschockt. ■ Glutamat; ■ Glutamin; ■ Prolin. (A) Wildtyp; (B) *Cgl-betP*; (C) *Cgl-ectP*; (D) *Cgl-icoP*, (E) *Cgl-proP*.

Obige Beobachtungen am Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen (siehe 3.1) korrelierten mit den Ergebnissen der Mutanten. Zuerst wurde Glutamat transient bis T₆₀ ca. 2- bis 3-fach akkumuliert und fungierte in der ersten Schockantwort als dominantes kompatibles Solut. *Cgl-proP* und *Cgl-betP* erreichten insgesamt die höchsten internen Glutamatkonzentrationen aller untersuchten Stämme (420-430 $\mu\text{mol/g BTM}$).

Glutamin war vor Schock nur in geringen Konzentrationen messbar (ca. 25 $\mu\text{mol/g}$ BTM). Es wurde nach Schock parallel zu Glutamat in geringeren absoluten Konzentrationen akkumuliert (Maximum bei T₃₀) und danach metabolisiert.

Glutamat wurde in der zweiten Schockantwort durch langsamer steigende Prolinkonzentrationen schrittweise ersetzt. Prolin lag in allen Kulturen vor Schock (T₋₅) in geringen Konzentrationen vor (= 15 $\mu\text{mol/g}$ BTM). Auf den Schock reagierten die Stämme mit 20- bis 30-facher Prolinakkumulation mit Maximum bei T₁₈₀. Prolin stellte bis in die stationäre Phase das dominante kompatible Solut dar.

Chloramphenicol-behandelte Zellen zeigten ähnliche Glutamat- und Glutamin-Pools wie unbehandelte Zellen (Daten im Anhang). Prolin wurde nur ca. sechsfach akkumuliert, im Gegensatz zu 23-facher Akkumulation ohne Chloramphenicolzugabe. Hier wirkte sich die Inhibition auf die Translation der *proABC*-mRNA deutlich aus, wohingegen dies bei Glutamat und Glutamin nicht der Fall war. Möglicherweise wurde die Aktivität der beteiligten Enzyme des Glutamin- und Glutamat-Stoffwechsel ohne *de novo* Synthese der Enzyme ausreichend gesteigert, wohingegen die Aktivitätssteigerung der Prolin-Enzyme (ProABC) nicht für die sonst beobachteten Konzentrationen nach einem hyperosmotischen Schock ausreichten.

Die durch hyperosmotischen Schock bewirkte deutliche Akkumulation von Glutamat, Glutamin und insbesondere Prolin (Abbildung 3-15) im Vergleich zu ungeschockten Zellen (Abbildung 3-14) zeigt die wichtige Rolle der *de novo* Synthese kompatibler Solute zur Adaptation von *C. glutamicum* an osmotische Stressbedingungen. Auch die Mutantenstämme zeigten zum Wildtyp vergleichbare Änderungen ihrer Aminosäurepools, so dass die Gendelektionen keinen starken Einfluss auf die physiologischen Parameter der Zellen hatten.

Transkription, Translation und Transportraten

Die Grundexpression der untersuchten Transportergene *betP*, *ectP*, *proP* und *lcoP* sollte im WT und in den Mutantenstämmen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase ohne osmotischen Schock untersucht werden.

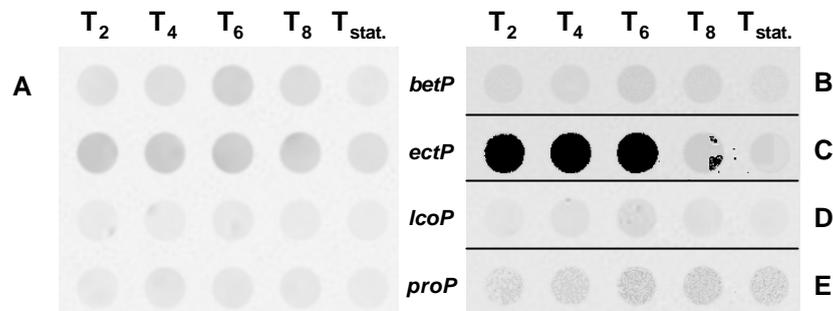


Abbildung 3-16: Abhängigkeit der Transkriptmenge der Gene *betP*, *ectP*, *proP* und *lcoP* von der Wachstumsphase. (A) Wildtyp; (B) *Cgl-betP*; (C) *Cgl-ectP*; (D) *Cgl-lcoP*; (E) *Cgl-proP*.

Die Transkription der Gene war, mit Ausnahme von *ectP*, zu allen Phasen des Wachstums sehr niedrig, was auf eine geringe Ausstattung der Zellen mit diesen Transportern bei niedriger externer Osmolalität hindeutet. In Verbindung mit der geringen internen Prolinkonzentration (Abbildung 3-14) kann darauf geschlossen werden, dass den Zellen zur Aufrechterhaltung des positiven Turgordrucks bei einer Osmolalität von 0,3 osmol/kg die Glutamatkonzentration von ca. 130-170 $\mu\text{mol/g}$ BTM ausreichte. Die Mutantenstämme verhielten sich zu den Wildtypzellen vergleichbar.

Die Transkription der Transportergene kurz vor und nach einem hyperosmotischen Schock sah folgendermaßen aus:

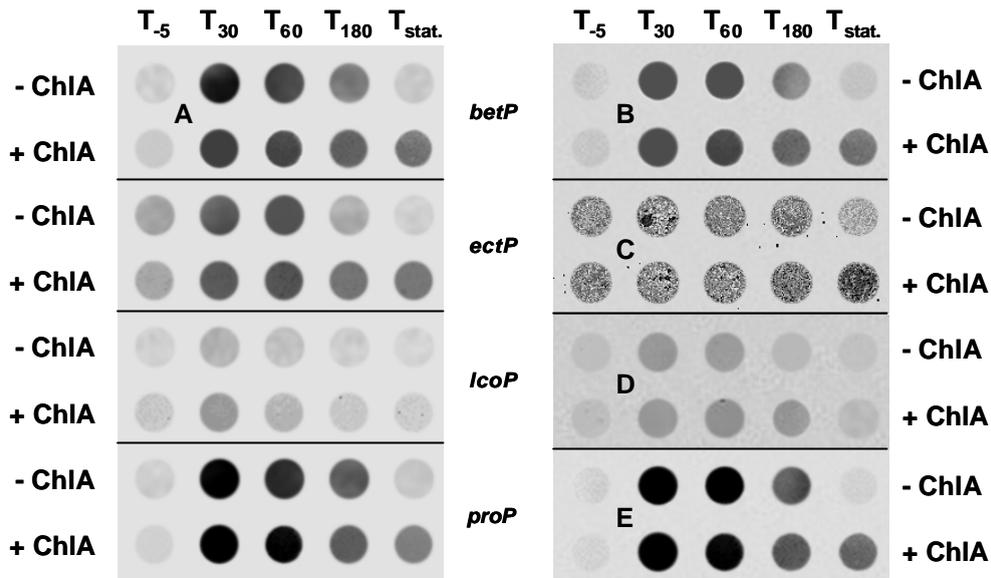


Abbildung 3-17: Änderungen des Transkriptionsmusters der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* im Wildtyp und den Deletionsmutanten nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg ohne (- ChIA) bzw. mit Zugabe von 100 µg/ml Chloramphenicol (+ ChIA). (A) Wildtyp; (B) Cgl-*betP*; (C) Cgl-*ectP*; (D) Cgl-*lcoP*; (E) Cgl-*proP*.

Tabelle 3-12: Maximale Induktionsfaktoren und -zeitpunkte der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP*.

Stamm	maximale Induktion			
	<i>betP</i>	<i>ectP</i>	<i>lcoP</i>	<i>proP</i>
WT	11,4 (T ₃₀)	2,4 (T ₃₀)	3,2 (T ₃₀)	15,1 (T ₃₀)
Cgl- <i>betP</i>	11,5 (T ₃₀)	---	---	---
Cgl- <i>ectP</i>	---	2,6 (T ₃₀)	---	---
Cgl- <i>lcoP</i>	---	---	3,2 (T ₃₀)	---
Cgl- <i>proP</i>	---	---	---	15,3 (T ₃₀)

Die Transkriptionsänderungen von Wildtyp und Mutanten unterschieden sich nur geringfügig und entsprachen grundsätzlich dem in Abbildung 3-4B dargestellten Muster. Alle untersuchten Gene zeigten eine Induktion der Genexpression durch den hyperosmotischen Schock. Vor-Schock-Level aller mRNAs waren bis auf *ectP* sehr niedrig. Maximale Level fanden sich zwischen 30 bis 60 Minuten nach Schock, danach sank die mRNA-Konzentration stärker (*ectP*, *lcoP*) oder schwächer bzw. langsamer (*betP*, *proP*). Das Transkriptionssignal von *lcoP* war sehr schwach und deutet darauf hin, dass nur geringe Konzentrationen der *lcoP*-mRNA vorhanden sind. *proP* und *betP* wurden am deutlichsten und längsten induziert (bis T₁₈₀). In der stationären Phase sank die mRNA-Konzentration aller Gene unbehandelter Zellen fast durchweg auf Vor-Schock-Werte, während Chloramphenicol-behandelte Zellen alle Gene außer *lcoP* noch deutlich exprimierten. Die Gendeletion bewirkte keine

Veränderungen des Transkriptionsmusters in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Nachdem die Transkription der untersuchten Gene in ungeschockten Zellen keine Änderungen zeigte (vgl. Abbildung 3-16), wurde untersucht, ob auch die Transportraten der Carrier BetP, EctP, IcoP und ProP unabhängig von der Wachstumsphase gleich blieben.

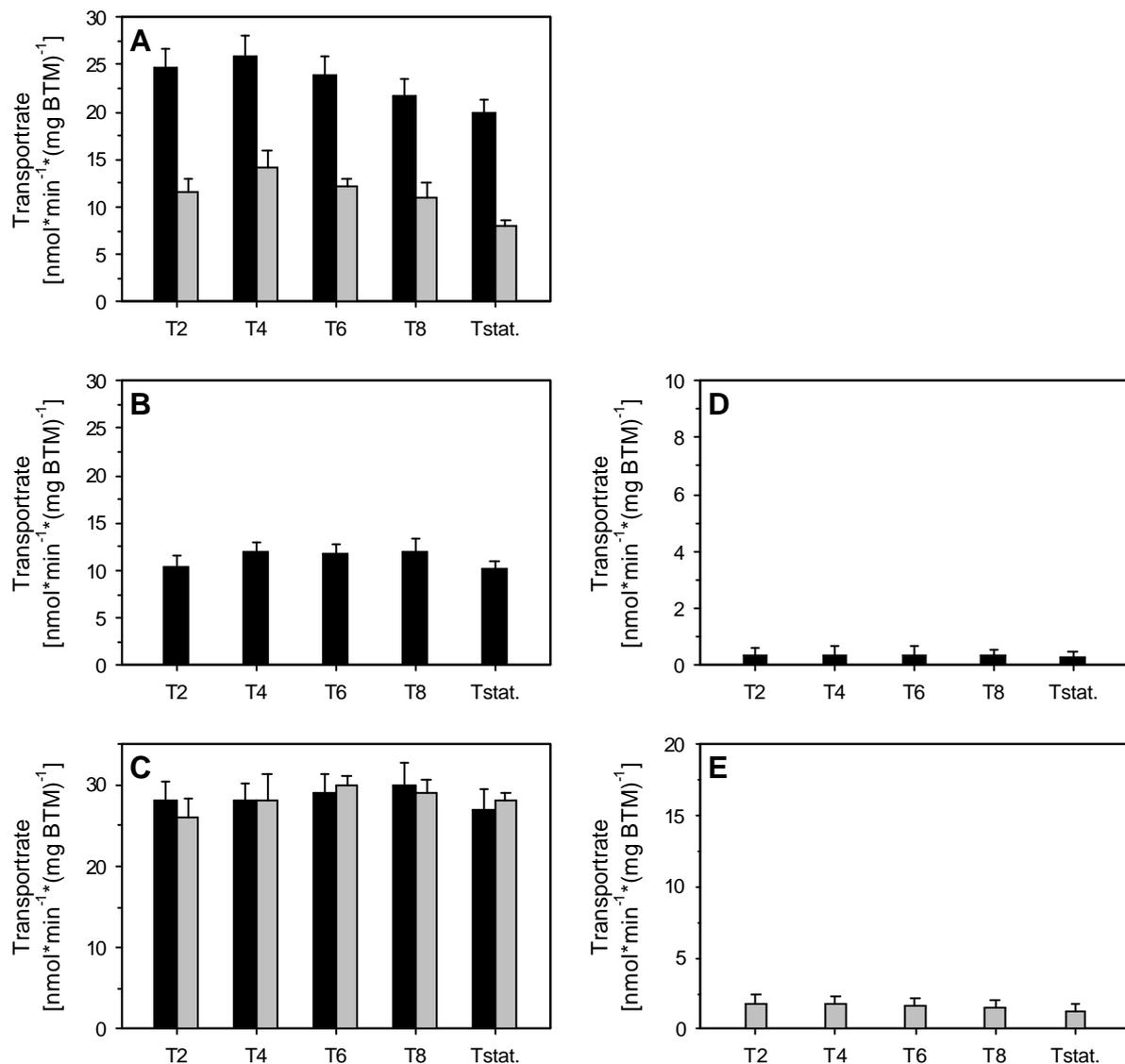


Abbildung 3-18: Aufnahmeraten der Transporter BetP, EctP, LcoP und ProP im Wildtyp und den Deletionsmutanten ohne osmotischen Schock. ■ Betain; ■ Prolin. (A) Wildtyp; (B) Cgl-betP; (C) Cgl-ectP; (D) Cgl-icoP; (E) Cgl-proP.

Die Aufnahmeraten aller Transporter blieben in engen Grenzen über den gesamten Zeitraum konstant. Das bedeutet, dass Änderungen der Transportraten nach

Osmoschock auf Regulationsphänomene zurückzuführen sind. Die Wildtypzellen zeigten trotz der niedrigen Osmolalität eine überraschend hohe Transportrate, wobei aufgrund redundanter Substratspektra der Transporter nur die Gesamtaufnahme untersucht werden kann. Die Zelle ist folglich auf potentiellen osmotischen Stress eingerichtet. In den Mutanten *Cgl-betP* und *-ectP* fanden sich ebenfalls hohe Transportraten, wobei in *Cgl-ectP* anscheinend höhere Konzentrationen von EctP als im Wildtyp vorhanden waren. LcoP und ProP waren in den untersuchten Mutanten *Cgl-lcoP* und *-proP* kaum vorhanden und zeigten nur geringe Transportraten.

Die Transporter BetP und EctP bilden anscheinend die Basis für die hohen Transportraten im Wildtyp, wohingegen LcoP und ProP unter diesen Bedingungen nicht relevant sind.

Die Veränderung der externen Osmolalität von 0,3 auf 1,8 osmol/kg hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Transportraten im Wildtyp, die zur maximalen Aktivierung der Transporter unter V_{max} -Bedingungen bestimmt wurden.

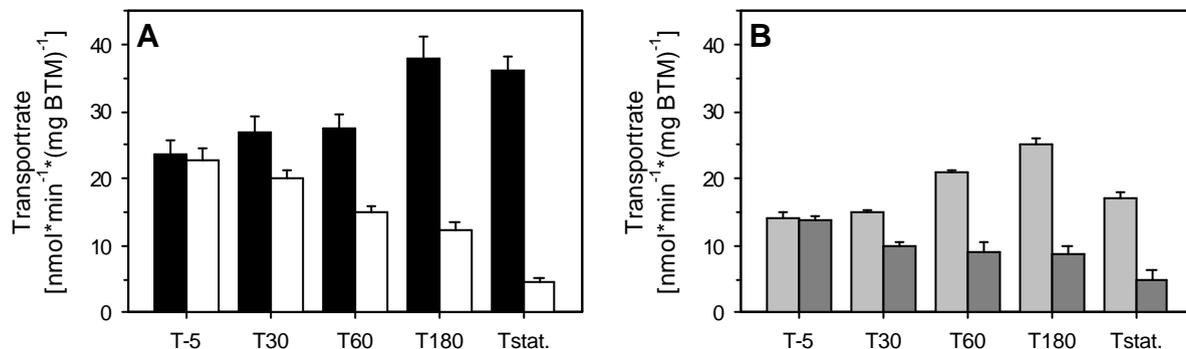


Abbildung 3-19: Änderung der Aufnahmezeiten im Wildtyp nach Osmoschock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg. (A) ■ / □ Betain -/+ 100 $\mu\text{g/ml}$ ChIA; (B) ■ / ■ Prolin -/+ 100 $\mu\text{g/ml}$ ChIA.

Die Prolin-Aufnahmerate im Wildtyp, welche sich aus den einzelnen Raten von EctP und ProP zusammensetzen kann, zeigte eine Verdopplung des Basalleveaus auf $26 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg BTM})^{-1}$, während die Aufnahmezeiten in Chloramphenicol-inhibierten Zellen bis in die stationäre Phase auf ein Drittel sank. Betain-Aufnahmeraten setzen sich aus den Raten von BetP, EctP und LcoP zusammen (siehe Abbildung 1-1). Diese Rate stieg um den Faktor 1,5 auf $37 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg BTM})^{-1}$, in Chloramphenicol-behandelten Zellen sank die Rate

kontinuierlich bis auf ein Sechstel der ursprünglichen Rate in der stationären Phase. Sinkende Raten hängen vermutlich mit Protein-*turnover* zusammen.

Diese Daten des Wildtyps lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Änderung der Transportraten der Prolin- und Betain-transportierenden Carrier auch transkriptionsreguliert ist. Es wurde untersucht, welcher Anteil davon auf die individuellen Carrier, die in den Mutantenstämmen untersucht wurden, entfallen.

Die Aufnahmeraten für Betain wurden in den Stämmen *Cgl-betP*, *-ectP* und *-lcoP*, die Raten für Prolin in *Cgl-ectP* und *-proP* jeweils unter V_{max} -Bedingungen untersucht.

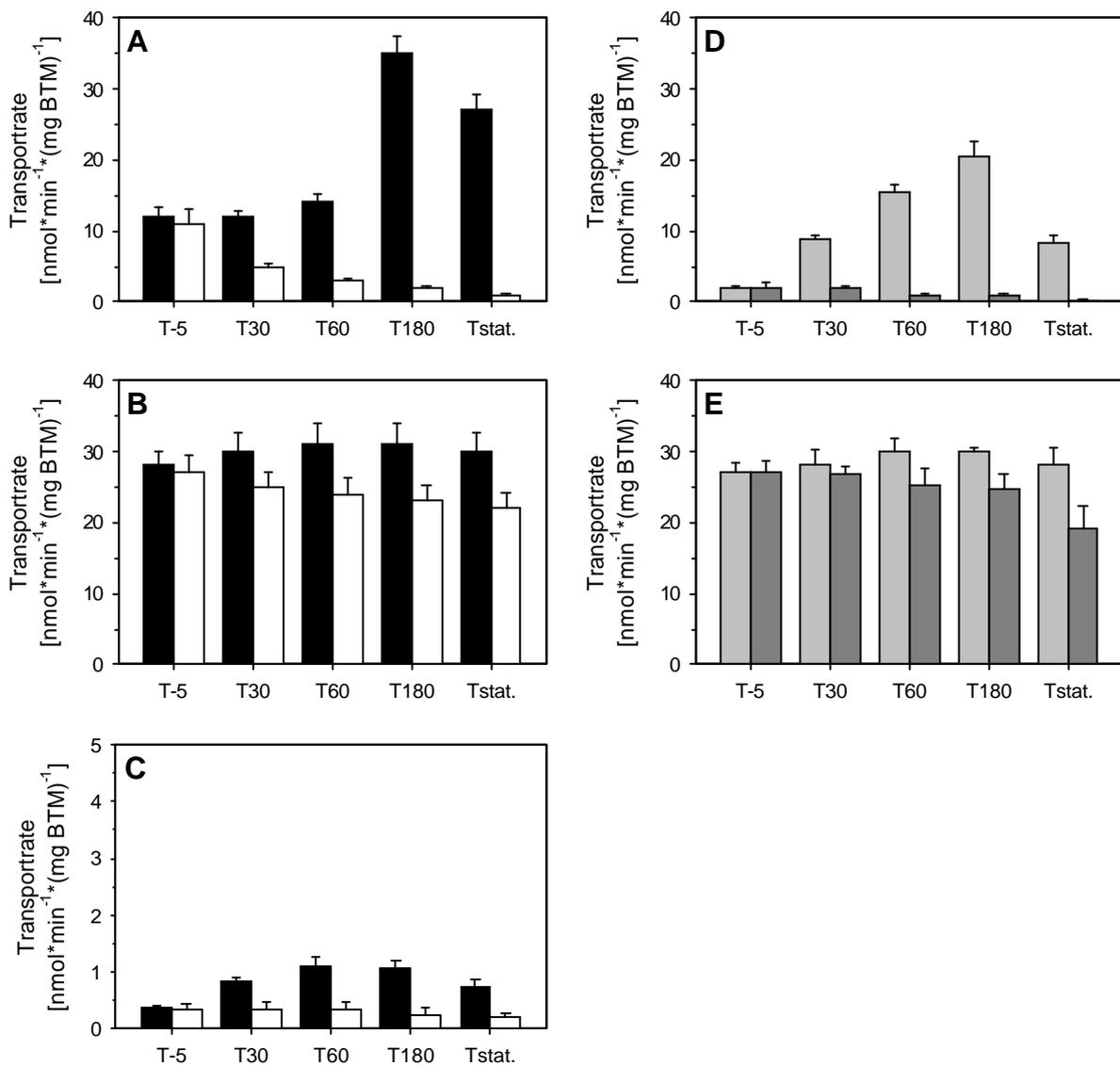


Abbildung 3-20: Änderung der Betain-Aufnahmeraten in den Deletionsmutanten (A) *Cgl-betP*, (B) *Cgl-ectP* und (C) *Cgl-lcoP* sowie der Prolin-Aufnahmeraten in (D) *Cgl-proP* und (E) *Cgl-ectP* nach Osmoschock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg.

■ / □ Betain \pm 100 $\mu\text{g/ml}$ ChIA; ■ / □ Prolin \pm 100 $\mu\text{g/ml}$ ChIA.

Tabelle 3-13: Maximale Steigerung der Transportraten von BetP, EctP, LcoP und ProP nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg (zu Abbildung 3-19 und 3-20).

Stamm	maximale Steigerung der Transportrate	
	Betain	Prolin
WT	1,6 x	1,8 x
Cgl- <i>betP</i>	2,9 x	---
Cgl- <i>ectP</i>	1,1 x	1,1 x
Cgl- <i>lcoP</i>	2,8 x	---
Cgl- <i>proP</i>	---	10,2 x

Die Aufnahmeraten vor dem Schock entsprachen den Daten aus ungeschockten Zellen (vgl. Abbildung 3-18). Durch den hyperosmotischen Schock wurden die meisten Transportraten deutlich beeinflusst. ProP (Abbildung 3-20D) zeigte die deutlichste Steigerung. Durch den Schock stieg die Transportrate von niedrigen Werten zehnfach an. Die Aufnahmerate von BetP (Abbildung 3-20A) erreichte drei Stunden nach Osmoschock (T_{180}) mit ca. $35 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg BTM})^{-1}$ ihr Maximum, was einer Verdreifachung entspricht. Die Aufnahmerate von LcoP (Abbildung 3-20C) lag vor dem Schock bei sehr geringen Werten fast im Hintergrund, allerdings ließ sich eine ungefähr dreifache Steigerung der Rate mit Maximum bei T_{60} feststellen. Die Aufnahmerate von EctP (Abbildung 3-20B, E) blieb fast konstant, was darauf schließen lässt, dass das mRNA-Signal (vgl. Abbildung 3-17) nicht translatiert wurde. Chloramphenicol-behandelte Zellen zeigten keine Steigerung der Transportraten. Die Aufnahmeraten blieben nach Schock konstant (Abbildung 3-20B, C, E) bzw. sanken bis auf Hintergrundwerte ab (Abbildung 3-20A, D). Sinkende Transportraten können durch Protein-*turnover* erklärt werden.

Wie im Wildtyp war auch in den Mutanten die Änderung der Transportraten als Folge eines hyperosmotischen Schocks transkriptionsreguliert. Gravierende Änderungen ließen sich bei BetP und insbesondere bei ProP (zehnfache Steigerung) feststellen. Die Rate von BetP (und in geringerem Maße ProP) setzt sich aus Induktion und *turnover* zusammen, wie der Vergleich mit inhibierten Zellen erkennen lässt.

Auch wenn die Transportraten im Stamm Cgl-*ectP* höher waren als im Wildtyp, können die Daten mit den Mutanten verglichen werden. Die im Wildtyp beobachtete Steigerung der Transportrate geschieht folglich auf Grund der Transkriptionsregulation von BetP und ProP, welche zusätzlich zur gleich bleibenden Rate von EctP sowie der ebenfalls schon hohen Rate von BetP unter osmotischem

Stress kompatible Solute importieren können. Ebenso ist der Protein-*turnover* im Wildtyp diesen beiden Transportern zuzuschreiben. LcoP scheint unter diesen Bedingungen keine große Bedeutung zu haben, worauf schon die schwache Transkription in RNA-Hybridisierungsexperimenten hindeutet (vgl. Abbildung 3-17).

Zur Quantifizierung der durch Osmoschock translatierten Proteinkonzentration wurde in den Transport-Assays Chloramphenicol zu Kontrollkulturen gegeben. Durch Inhibition der Proteinbiosynthese können keine neuen Transporterproteine synthetisiert werden. Das bedeutet, dass ein Anstieg der Transportraten in nicht inhibierten Zellen auf verstärkte *de novo* Synthese von Transportproteinen zurückzuführen ist. Dies ist jedoch kein vollständiger Beweis. Möglicherweise können aktivierende Modifizierungen der Transporterproteine, die durch andere Proteine vermittelt werden, ebenfalls inhibiert sein. Zur Unterstützung der Daten im Transport-Assay wurde deshalb die Änderung der Proteinkonzentration im *Western Blot* nach einem hyperosmotischen Schock untersucht. Für ProP und LcoP waren keine Antikörper vorhanden, weshalb der Antikörpernachweis nur für BetP und EctP durchgeführt wurde. Hierzu wurden der Wildtyp sowie die beiden Deletionsmutanten *Cgl-betP* und *Cgl-ectP* analysiert.

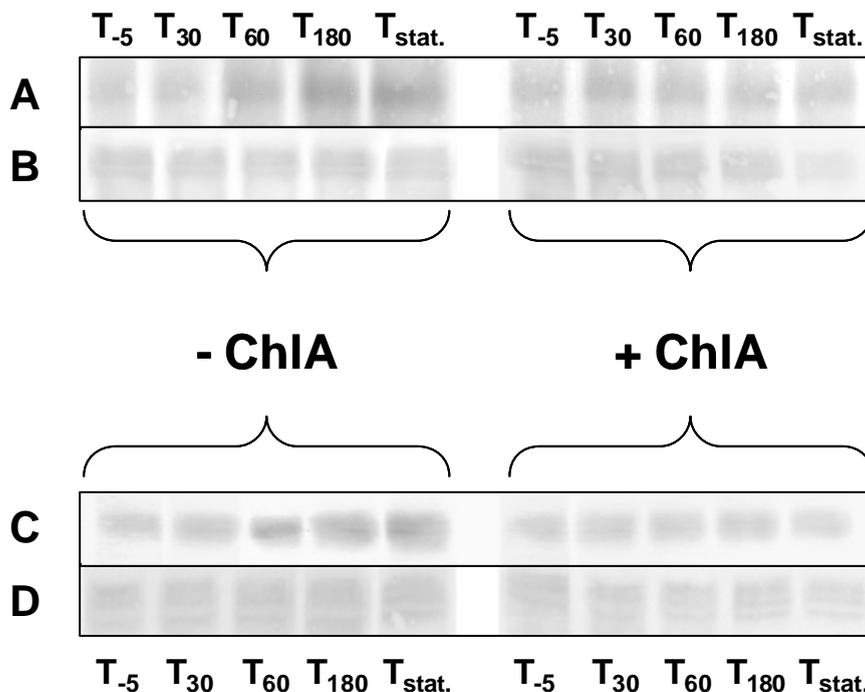


Abbildung 3-21: Änderung der Proteinkonzentrationen im Wildtyp, *Cgl-betP* und *Cgl-ectP* nach einem hyperosmotischen Schock ohne (- ChIA) bzw. mit Zugabe von 100 µg/ml Chloramphenicol (+ ChIA). (A) Wildtyp BetP; (B) Wildtyp EctP; (C) *Cgl-betP* BetP; (D) *Cgl-ectP* EctP.

Tabelle 3-14: Änderungen der Proteinkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg im Wildtyp und den Deletionsmutanten *Cgl-betP* und *Cgl-ectP* ohne (- ChIA) bzw. mit Zugabe von 100 µg/ml Chloramphenicol (+ ChIA).

Stamm	maximale Steigerung der Proteinkonzentration									
	BetP (-/+ ChIA)					EctP (-/+ ChIA)				
	T ₋₅	T ₃₀	T ₆₀	T ₁₈₀	T _{stat.}	T ₋₅	T ₃₀	T ₆₀	T ₁₈₀	T _{stat.}
WT	1,0/1,0	1,7/1,1	3,1/1,0	4,2/1,0	3,3/0,9	1,0/1,0	1,0/1,0	0,9/0,9	1,1/0,9	1,2/0,7
Cgl-betP	1,0/1,0	1,3/1,1	3,5/1,1	4,3/1,1	3,8/1,0	-	-	-	-	-
Cgl-ectP	-	-	-	-	-	1,0/1,0	1,0/0,9	1,1/0,9	1,1/0,9	1,1/0,8

Durch den Antikörpernachweis konnte gezeigt werden, dass BetP maximale Konzentrationen drei Stunden nach Schock erreichte, während die EctP-Konzentration sich nur sehr geringfügig änderte. Diese Daten korrelieren mit den Transportmessungen. Der in den Transportmessungen beobachtete Protein-*turnover* von BetP zeigte sich im Western Blot nur schwach, während im Gegensatz zu den Transportmessungen die EctP-Konzentration sank.

Vergleich zwischen Deletionsmutanten und dem Wildtyp

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit bestimmten Steigerungen der Induktion, Translation und Transportraten aus den Tabellen 3-5, 3-7, 3-12 bis 3-14 zusammengefasst.

Tabelle 3-15: Änderungen der Induktion der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* und der Transporterkonzentrationen sowie Transportraten von BetP, EctP, LcoP und ProP nach einem hyperosmotischen Schock. Die grafische Auswertung und Quantifizierung der RNA-Hybridisierungsexperimente und *Western Blots* erfolgte mit der Software AIDA (siehe 2.4.4). Für die Transporterkonzentrationen wurden keine Fehler angegeben, weil die Daten nur doppelt repliziert wurden.

Induktion = RNA-Hybridisierungsexperimente; Konz. = Proteinkonzentration (*Western Blots*); Tr.-Rate = Transportrate; n.d. = Daten nicht bestimmt..

		exp. Phase	Schock	T ₃₀	T ₆₀	T ₁₈₀	T _{stat.}
betP	Induktion	1		11,5 ± 0,4	10,8 ± 0,5	7,1 ± 0,4	1,1 ± 0,2
BetP	Konz.	1		1,3	3,5	4,3	3,8
	Tr.-Rate	1		1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,2
ectP	Induktion	1		2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1
EctP	Konz.	1		1,0	1,1	1,1	1,1
	Tr.-Rate	1		1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1
lcoP	Induktion	1		3,2 ± 0,4	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1
LcoP	Konz.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Tr.-Rate	1		2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,3	1,8 ± 0,2
proP	Induktion	1	15,3 ± 0,7	14,9 ± 0,7	10,2 ± 0,5	1,3 ± 0,2	
ProP	Konz.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Tr.-Rate	1	4,5 ± 0,3	7,5 ± 0,5	10,2 ± 0,6	4,4 ± 0,3	

Anm.: Alle Faktoren beziehen sich relativ auf die erste Spalte (exponentielle Wachstumsphase der Zellen vor Schock), die auf den Wert 1 gesetzt wurde. Die Transportrate unterteilt sich in Betain- und Prolin-Aufnahmerate. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Aktivität von EctP nur einfach angegeben, weil die Raten für beide Solute (Betain & Prolin) fast identisch sind. Für LcoP und ProP konnten mangels eines Antikörpers keine Transporterkonzentrationen nachgewiesen werden.

Die Transkription wurde nicht vollständig in Protein übersetzt. Ein eindeutiger Faktor dieser Reduktion kann nicht erkannt werden. Vermutlich wird die Translation auf einer weiteren Ebene reguliert, so dass die translatierte Proteinkonzentration geringer ist als die Transkriptmenge und Transkriptions- und Translationsmaxima nicht kurz nacheinander auftreten, sondern mit einer Verzögerung von ca. zwei bis drei Stunden.

Untersuchungen an *C. glutamicum* MH20-22B-*proP-IcoP*

Nach früheren Beobachtungen wurden unter anderen als den hier beschriebenen Anzuchtbedingungen in einer Deletionsmutante des Produktionsstammes *C. glutamicum* MH20-22B-*proP-IcoP* hohe Prolin-Aufnahmeraten gemessen, im baugleichen Wildtypabkömmling *Cgl-proP-IcoP* lagen diese Werte jedoch im Hintergrund (Rönsch, 2000). In beiden Stämmen wurden *betP*, *ectP* und *putP* deletiert, so dass nur *proP* vorhanden war. Eine Deletion von *IcoP* erfolgte nicht, weil das Gen zu diesem Zeitpunkt noch nicht entdeckt war. Prolinaufnahme konnte somit ausschließlich über ProP erfolgen, LcoP importiert nur die kompatiblen Solute Glycinbetain und Ectoin. Die deutlichen Unterschiede deuteten auf unbekannte Mutationen im Elternstamm MH20-22B hin, der durch ungerichtete chemische Mutagenese erlangt worden war (Schrumpf *et al.*, 1992). Andererseits wurde eine fehlerhafte Konstruktion der Dreifach-Deletionsmutante *Cgl-proP-IcoP* oder Unterschiede in der Transkriptionsregulation beider Stämme in Betracht gezogen. Bisherige Untersuchungen im Wildtyp (vgl. 3.1) zeigten, dass ein hyperosmotischer Schock die Transkription von *proP* am stärksten von allen Transportern für kompatible Solute induzierte, weshalb verstärkte Prolinaufnahme über diesen Carrier sowohl im Wildtyp als auch in der Dreifachmutante zu erwarten wäre.

Die Aufnahmeraten wurden nach einer Kultivierung von 18 Stunden in BHI-Vollmedium in stationären Zellen überprüft.

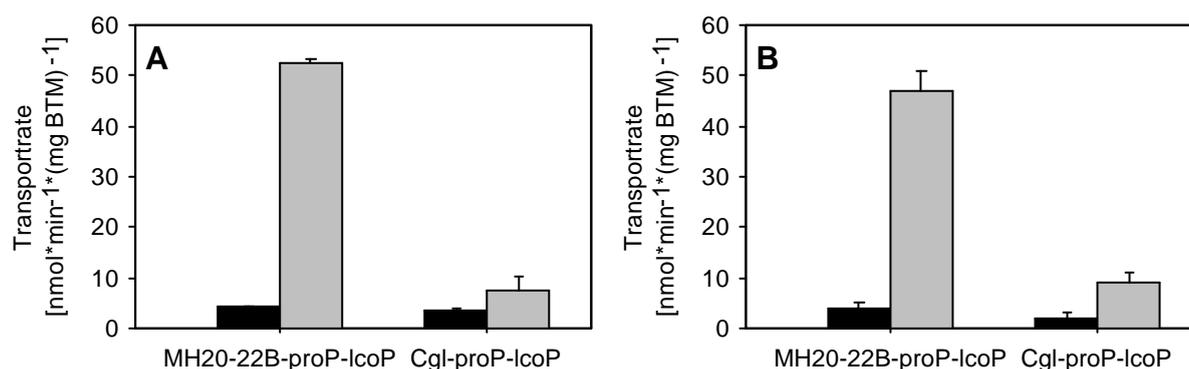


Abbildung 3-22: Aufnahmeraten stationärer Zellen von MH20-22B-*proP-IcoP* und *Cgl-proP-IcoP*. (A) Daten von H. Rönsch (2001); (B) reproduzierte eigene Daten. ■ Betainrate; ■ Prolinrate.

In Abbildung 3-22 sind die früher bestimmten Daten (Rönsch, 2001) und eigene Messungen im Vergleich aufgeführt. Durch Transportmessungen nach dem bisherigen Schema konnten die Daten reproduziert werden.

Gründe für die Abweichungen zwischen obigen Daten könnten in unterschiedlicher Transkription der Gene in stationären Zellen oder im verwendeten Medium liegen. Deshalb wurden die Versuche in MMI-Minimalmedium mit exponentiell wachsenden Zellen beider Stämme wiederholt und das Wachstumsverhalten, die Transkription sowie die Transportraten der Carrier bestimmt.

Untersuchungen zum Wachstumsverhalten sollten Aufschluss über den physiologischen Zustand der Zellen vor und nach einem hyperosmotischen Schock geben.

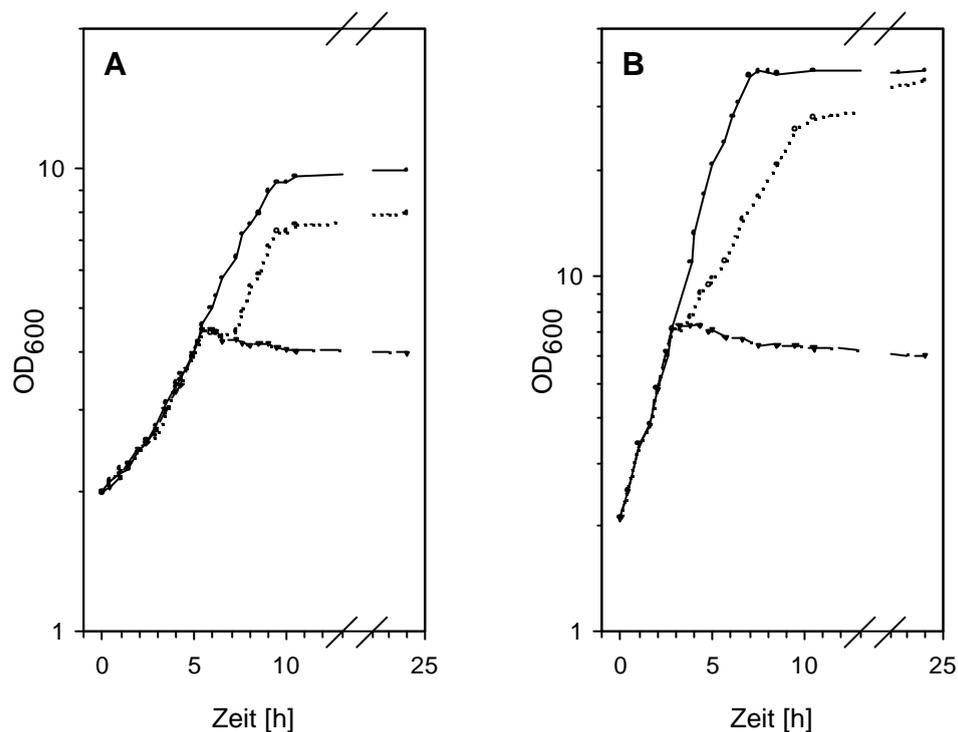


Abbildung 3-23: Wachstum von (A) MH20-22B-*proP-IcoP* und (B) *Cgl-proP-IcoP* vor und nach einem hyperosmotischen Schock. ● ohne osmotischen Schock; ○ mit hyperosmotischem Schock; ▼ mit hyperosmotischem Schock und Zugabe von 100 µg/ml Chloramphenicol.

Vor dem hyperosmotischen Schock wuchsen die Zellen beider Kulturen mit identischer Wachstumsrate bis in die exponentielle Phase.

Auffällig war, dass dieser Stamm auf MMI-Minimalmedium langsamer ($t_D = 2,9$ h) und weniger dicht wuchs (End- $OD_{600} = 10,5$) als die Mutante des Wildtypstammes *C. glutamicum* ATCC13032 auf dem gleichen Medium (bis $OD_{600} = \sim 38$; $t_D = \sim 1,5$ h). Dies deckte sich mit der Beobachtung, dass schon der 'Elternstamm' *C. glutamicum* MH20-22B schlechter wuchs als der Wildtyp und dessen Abkömmlinge. Dieser Stamm wurde kommerziell als Lysin-Produktionsstamm verwendet und verwendet einen Großteil der Stoffwechselenergie zur gewünschten Lysinsynthese (Schrumpf

et al., 1992). Die Analyse interner Aminosäuren zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen MH20-22B-*proP-IcoP* und *Cgl-proP-IcoP* sowie dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

C. glutamicum MH20-22B-*proP-IcoP* wurde bisher nur biochemisch charakterisiert (Rönsch, 2000). Die Untersuchung der Transkriptionsmuster in dieser Arbeit war die erste Analyse von Transkriptionsdaten in diesem Stamm. Anhand der Transkriptionsdaten des Wildtyps (siehe 3.1) konnte überprüft werden, wie weit sich die Muster deckten. Deshalb wurden die Gene osmotisch regulierter Transporter untersucht, wobei insbesondere die Transkriptionsmuster von *IcoP* und *proP* von Interesse waren, weil die anderen Transportergene deletiert worden waren.

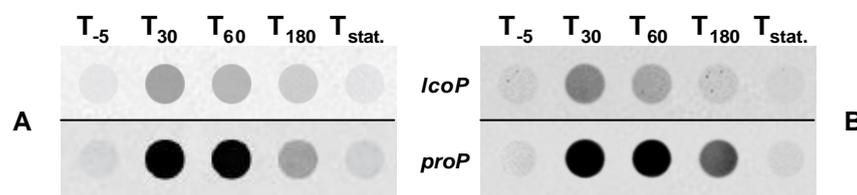


Abbildung 3-24: Änderungen der Transkription von *IcoP* und *proP* von (A) *C. glutamicum* MH20-22B-*proP-IcoP* und (B) *Cgl-proP-IcoP* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg.

Die Transkriptionsmuster der beiden Mutanten in diesem RNA-Hybridisierungsexperiment entsprachen Ergebnissen eines hyperosmotischen Schocks von 0,3 auf 1,8 osmol/kg im Wildtyp (vgl. Abbildung 3-17A).

Die sowohl im Wildtyp als auch in diesen Stämmen beobachtete Induktion der Transportergene sollte sich in vermehrter Transportersynthese und damit steigenden Transportraten äußern. Kontrollkulturen mit Chloramphenicol dienten der Kontrolle dieser transkriptionsregulierten Steigerung. Die Aufnahmerate der Carriers ProP wurde in beiden Mutanten bezüglich des kompatiblen Soluts Prolin unter V_{max} -Bedingungen vermessen.

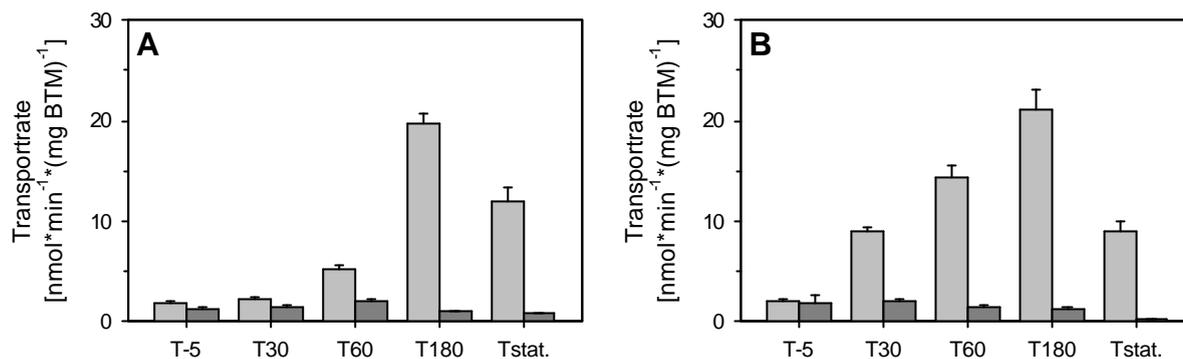


Abbildung 3-25: Änderung der Prolin-Aufnahmeraten von (A) *C. glutamicum* MH20-22B-*proP-IcoP* und (B) *Cgl-proP-IcoP* nach Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg. ■ / ■ Prolinrate -/+ 100 µg/ml Chloramphenicol.

ProP reagierte deutlich auf den Schock. Zuerst stieg die Transportrate nur leicht (T₋₅ bis T₆₀). Drei Stunden nach Schock erreichte die Aufnahmerate eine ca. elffache Steigerung im Vergleich zu ungeschockten Zellen. In ihrer Biosynthese durch Chloramphenicol inhibierte Zellen zeigten nur geringfügige Änderungen der Transportrate innerhalb der Standardabweichung. Die beobachtete Steigerung der Transportrate von ProP konnte demnach nur über Neusynthese von Transporterproteinen verlaufen. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse sowie den Daten aus den anderen untersuchten Stämmen. Somit konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Unterschiede unter den ursprünglichen Bedingungen (vgl. Abbildung 3-22; Rönsch, 2001) auf die verschiedenen Wachstumsstadien der Zellen zum Zeitpunkt der Messungen zurückzuführen sind. Unter gleichartigen Bedingungen zeigte die Produktionsmutante MH20-22B keine Unterschiede zu *Cgl-proP-IcoP*.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass gravierende Änderungen der Umweltbedingungen von *C. glutamicum* durch hyperosmotischen Schock zeitlich fein abgestimmte Reaktionen zur Akkumulation von kompatiblen Soluten hervorrufen. Die untersuchten Systeme zur Aufnahme und *de novo* Synthese dieser Substanzen werden sowohl auf Transkriptions- als auch auf Aktivitätsebene reguliert, um sinkenden Turgordruck auszugleichen und zelluläres Wachstum, welches nach einem Schock zum Erliegen kommt, wieder aufnehmen zu können.

4.1 Osmoregulation von *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock

Unterschiedliche Veränderungen der Umweltbedingungen in den natürlichen Habitaten von Bodenbakterien, wie Temperatur und Trockenheit, verursachen Schwankungen in der Wasseraktivität, d.h. der Osmolalität. Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Schockdifferenz sowie Verfügbarkeit von Nährstoffen und kompatiblen Soluten im Medium differenzierte Reaktionen der Zellen bewirken. Die Bedeutung dieser Faktoren wurde im ersten Teil der Arbeit untersucht.

4.1.1 Abhängigkeit der Regulation von Umweltfaktoren

Mediumzusammensetzung

C. glutamicum ist, im Gegensatz zu *E. coli*, unbegeißelt und hat deshalb nicht die Möglichkeit, eine Verbesserung der Ernährungslage durch aktive Fortbewegung zu bewirken. Somit ist es passiv auf Standortwechsel durch Verschleppung, Wegschwemmen etc. oder auf Nährstoffeintrag durch ähnliche Faktoren angewiesen. Hohe Nährstoffkonzentrationen andererseits bewirken eine Erhöhung der externen Osmolalität, ein besonders in bioverfahrenstechnischen Prozessen bekanntes Problem. Durch Wachstumsexperimente auf verschiedenen Minimalmedien konnte gezeigt werden, dass einerseits eine gute Versorgung mit Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle gutes Wachstum bewirkt (CgXII-Medium), andererseits die resultierende höhere Osmolalität Wachstumslimitierungen im direkten Vergleich mit einem Medium geringerer Nährstoffkonzentrationen verursacht

(MMI-Medium). Dies äußerte sich in Unterschieden der Wachstumsraten, der stationären Zellzahl und dem Korrelationsfaktor zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse. Trotz besserer Nährstoffversorgung spielt die höhere Osmolalität für das zelluläre Wachstum und die Konzentration interner Aminosäuren eine wichtige Rolle.

Grundosmolalität, Schockstärke & Endosmolalität

Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation zellulärer Prozesse in *C. glutamicum* durch die Grundosmolalität bestimmt wird. Zellen, die bei gleicher Nährstoffversorgung auf einem Medium mit höherer Grundosmolalität wuchsen, zeigten sowohl Veränderungen der Wachstumsparameter (Verdopplungszeit, End-Biotrockenmasse) als auch höhere Konzentrationen *de novo* synthetisierter Aminosäuren mit osmoprotektiver Wirkung (Glutamat, Glutamin, Prolin). Glutamat reichte unter niederosmolaren Bedingungen (0,3 osmol/kg) zur Aufrechterhaltung des Turgordrucks aus und glich die positive Ladung von Kaliumionen aus. Wächst das Bakterium dagegen auf höherosmolarem Medium (0,9 osmol/kg), so werden neben erhöhten Glutamat- zusätzlich Glutamin- und Prolin-pools aufgebaut, die den Effekt des Glutamats unterstützen. Auf Transkriptionsebene wurde eine stärkere Induktion insbesondere von *ectP*, aber auch der anderen untersuchten Carriergene *betP*, *IcoP* und *proP* unter erhöhter Grundosmolalität nachgewiesen. *C. glutamicum* ist also unter permanentem hyperosmotischem Stress mit Transportern dieser Substanzen, deren schnellere und energetisch günstigere Aufnahme gegenüber der Neusynthese bevorzugt wird (Wood, 1999), gut ausgestattet. Dies ist aus evolutiver Sicht sinnvoll, denn in natürlichen Habitaten stehen Bodenbakterien durch Pflanzenexsudate und verrottendes Pflanzenmaterial ausreichende Konzentrationen kompatibler Solute zur Verfügung (Welsh, 2000). Somit besitzt *C. glutamicum* ein System, welches an die natürlichen Bedingungen sehr gut angepasst ist und auf Änderungen der äußeren Bedingungen schnell reagieren kann, wenn bei plötzlichen Änderungen der osmotischen Verhältnisse kompatible Solute akkumuliert werden müssen.

Es wurde untersucht, wie die Transkriptionsregulation von unterschiedlich starken hyperosmotischen Schocks abhängt. Hierzu wurden die Faktoren Grundosmolalität des Mediums, absolute Schockdifferenz und Endosmolalität des Mediums variiert. Ein Einfluss der Endosmolalität auf die Transkriptionsstärke der Gene *betP*, *ectP*,

icoP und *proP* konnte bei unterschiedlicher Schockstärke ausgeschlossen werden. Ein schwacher Schock von 0,3 auf 0,9 osmol/kg bewirkte eine moderate Akkumulation von Aminosäuren und deutliche, im Vergleich zu höheren Schockstärken aber schwache Induktion der untersuchten Gene. Das Wachstum wurde nach kurzer *lag*-Phase wieder aufgenommen und verlief fast wie unter Vor-Schock-Bedingungen.

Stärkere Schockdifferenzen bewirkten eine stärkere Reaktion aller analysierten Faktoren (Wachstumsparameter, Aminosäureakkumulation, Stärke der Transkription). Auffällig war eine in der ersten metabolischen Schockantwort erfolgende transiente Akkumulation von Glutamat. Aufgrund seiner zentralen Rolle im Stoffwechsel kann Glutamat besonders schnell synthetisiert werden. Zur Vermeidung einer zu starken Akkumulation des Gegenions K^+ , welches in hohen Konzentrationen negative Effekte auf zelluläre Prozesse hat, wird Glutamat durch Prolin ersetzt, welches in Abhängigkeit von der absoluten Schockstärke akkumuliert wurde und bis in die stationäre Phase das wichtigste intrazelluläre kompatible Solut war. Prolin stellt die beste Möglichkeit für *C. glutamicum* dar, sich bei Wachstum auf Minimalmedium ohne externe kompatible Solute dem erhöhten osmotischen Druck anzupassen und weiter zu wachsen. Die Steigerung der Prolinsynthese erfolgte ca. 30 bis 60 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock. Die Glutaminantwort verlief in einem ähnlichen Zeitrahmen wie die verstärkte Glutamatsynthese, wenn es auch in geringeren Konzentrationen akkumuliert wurde. Dies hängt mit der engen Kopplung von Glutamat und Glutamin auf der Ebene der Stickstoff-Fixierung zusammen. Auf Transkriptionsebene wurde eine sehr starke Induktion von *proP* sowie *betP* beobachtet. Die Produkte dieser Gene (ProP und BetP) stellen hochaffine Transporter für die kompatiblen Solute Prolin und Glycinbetain dar und spielen eine wichtige Rolle in der Aufnahme kompatibler Solute unter permanentem hyperosmotischen Stress (siehe unten, 4.1.3). Die Transkription von *ectP* wurde nach Schock ebenfalls deutlich induziert. Weiter unten diskutierte Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die erhöhte Transkription nicht in gesteigerter Transporterkonzentration resultierte, so dass aus bisher unbekanntem Gründen das Signal nicht prozessiert wird. Aufgrund früherer Aktivitätsmessungen von EctP wurde geschlossen, dass das Gen *ectP* konstitutiv exprimiert würde (Peter *et al.*, 1998). Deshalb wird der Carrier, der ein großes Substratspektrum und relativ niedrige Affinität für seine Substrate hat (siehe Abbildung 1-1), als Notfallsystem von

C. glutamicum gegen hyperosmotischen Stress angesehen (Peter *et al.*, 1998). Eine untergeordnete Rolle in der Osmoregulation scheint *lcoP* zu spielen. Das Gen wurde nur schwach induziert, obwohl es offensichtlich aufgrund der osmotischen Verhältnisse reguliert wurde.

Ein besonders starker Schock von 0,3 auf 2,4 osmol/kg war für die Zellen deutlich schlechter zu verkraften als die anderen Schockbedingungen. Nach einer sehr langen *lag*-Phase wurde exponentielles Wachstum mit deutlich verringerter Wachstumsrate beobachtet. Die Aminosäureakkumulation zeigte die höchsten Werte aller untersuchten Bedingungen. Die Transkriptionsregulation setzte verzögert im Vergleich zu den anderen Bedingungen ein. Die Stärke der Transkription war zudem schwächer als in Zellen, die von 0,3 auf 1,8 osmol/kg bzw. von 0,9 auf 2,4 osmol/kg geschockt wurden. Dies hängt mit den Auswirkungen des Schocks zusammen, der für die Zellen so stark war, dass alle zellulären Prozesse verzögert abliefen. Die Zellen konnten den Schock schließlich über starke Aminosäureakkumulation kompensieren.

Durch diese Untersuchung verschiedener Schockstärken wurden Standardbedingungen für weitere Versuche, in denen die Transkriptionsregulation der Transportsysteme analysiert wurde, ausgewählt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Osmolalität vor einem hyperosmotischen Schock als auch die absolute Schockdifferenz einen Einfluss auf das Verhalten der Zelle ausübten. Um die Reaktionen der Zellen auf osmotische Änderungen im Medium genau zu untersuchen, musste bei niedrigen Osmolalitäten gearbeitet werden, weshalb Kultivierung auf CgXII-Medium mit erhöhter Grundosmolalität (0,8 osmol/kg) im Vergleich zu MMI-Medium (0,3 osmol/kg) nicht geeignet war. Um eindeutige Reaktionen der Zellen auf hyperosmotischen Schock bezüglich der internen Aminosäurezusammensetzung und der mRNA-Transkriptmenge zu erkennen, musste die Schockstärke zudem einen gewissen Schwellenwert überschreiten, der bei einem Schock von 0,3 auf 0,9 osmol/kg nicht gegeben war. Eine zu starke Änderung der Osmolalität von 0,3 auf 2,4 osmol/kg zeigte zu starke Auswirkungen auf zelluläre Prozesse, so dass diese Bedingungen ebenfalls nicht geeignet waren. Deshalb wurden für alle weiteren Untersuchungen standardisierte Bedingungen gewählt: Schock der Zellen von 0,3 auf 1,8 osmol/kg sowie Kultivierung der Zellen auf MMI-Medium.

Bedeutung kompatibler Solute

Die Akkumulation kompatibler Solute nach einem hyperosmotischen Schock durch Aufnahme aus der Umgebung wird der *de novo* Synthese vorgezogen (Wood, 1999). Aufgrund des reichhaltigen Vorkommens solcher Substanzen im Boden (Lynch und Whipps, 1990) bedeutet die Nutzung externer Quellen eine energetisch bessere und schnellere Adaptation an die Stress-Situation. Vergleichende Untersuchungen an Zellen, denen entweder keine kompatiblen Solute oder Glycinbetain bzw. Prolin im Medium zur Verfügung standen, sollten Einflüsse auf das Wachstumsverhalten und die Transkriptionsregulation zeigen.

Die Zugabe von Betain bzw. Prolin nach einem hyperosmotischen Schock führte zu einer Verbesserung des Wachstums von *C. glutamicum*. Die Gene der osmotisch regulierten Transporter wurden durch Zugabe von Betain oder Prolin schwächer, kürzer und schneller induziert als ohne externe kompatible Solute. Die negativen Auswirkungen der Osmolalitätserhöhung wurden also schneller kompensiert, weshalb keine so starke Induktion der Transkription wie ohne kompatible Solute vonnöten war.

Ein positiver Effekt von extern verfügbaren kompatiblen Soluten auf die Adaptation von Mikroorganismen an hyperosmolare Bedingungen wurde auch in *E. coli* und *Bacillus subtilis* beobachtet (Kempf und Bremer, 1998; Bremer und Krämer, 2000). Die Regenerationszeit nach einem hyperosmotischen Schock war unter diesen Bedingungen kürzer und die interne Akkumulation *de novo* synthetisierter Osmoprotektiva war geringer als ohne Zugabe kompatibler Solute. In *C. glutamicum* zeigten sich deutlich Effekte externer Solute auf das Wachstum, die Konzentration interner Aminosäuren und das cytoplasmatische Volumen besonders bei hohen Osmolalitäten von 2,5 osmol/kg (Rönsch, 2000). Insbesondere die Konzentration von intrazellulärem Prolin, dem wichtigsten *de novo* synthetisierten kompatiblen Solut, war bei extern verfügbarem Betain deutlich reduziert (Rönsch, 2000). Durch die Zugabe kompatibler Solute zum Medium wurde die Transkriptionsstärke der in dieser Arbeit untersuchten Gene verringert, weshalb in weiteren Versuchen keine kompatiblen Solute supplementiert wurden.

4.1.2 Stärke der Regulation

Aufgrund der Charakterisierung der Schockantwort von *C. glutamicum* waren die Systeme, die an der Adaptation beteiligt sind, bekannt. So wurde eine Induktion der Biosynthesegene für Prolin (Ley, 2001), eine Steigerung der Prolin- (Rönsch, 2000) und Trehaloseakkumulation (Wolf *et al.*, 2003), eine Aktivitätsregulation von BetP und EctP (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1996) sowie die Transkriptionsregulation der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* (diese Arbeit) als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock nachgewiesen. Unklar war hingegen, in welcher Stärke die dazugehörigen Gene reguliert werden und ob es noch andere Gene gibt, deren Transkription einer osmotischen Kontrolle unterliegen. Um diese Gene und Regelkreise zu identifizieren und die Regulationsstärke zu quantifizieren, wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die verwendete RNA geschockter Zellen mittels Wachstumsanalysen, Aminosäurebestimmungen und RNA-Hybridisierungsexperimenten auf ihre Qualität überprüft. Stets ergab sich eine reproduzierbare Antwort von *C. glutamicum* auf einen hyperosmotischen Schock von 0,3 auf 1,8 osmol/kg. Die Auswertungen der DNA-Microarrays zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit den RNA-Hybridisierungsexperimenten. Alle bekannten Gene der Osmoschockantwort, mit Ausnahme von *proP*, lagen im Hintergrundrauschen (*signal-to-noise ratio*). Andere Gene, deren Zusammenhang mit der Osmoregulation unklar ist, wurden hingegen deutlich reguliert.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse beider Methoden wurden Gene, die in den Microarrays deutliche Änderungen in der Transkription zeigten (*aceE*, *aro*, *cysN*, *gap*, *gcaD*, *mez* und *nlpA*), durch RNA-Hybridisierungsexperimente untersucht. Auch in diesem Fall ließen sich die Transkriptionsdaten nur schwer in Einklang bringen mit den DNA-Microarray-Daten. Solange Gene im DNA-Microarray nicht reguliert oder induziert wurden (*aceE*, *aro*, *gap*, *gcaD*), stimmten die Daten überein, bei reprimierten Genen (*cysN*, *mez*, *nlpA*) jedoch nicht.

Es wurde beobachtet, dass verschiedene DNA-Microarrays qualitative Unterschiede zeigten und sich deshalb schwankende Signalstärken ergaben (M. Silberbach, Universität zu Köln, pers. Mitteilung). Conway und Schoolnik (2003) beschrieben eine Abschwächung der Signale in DNA-Microarrays um den Faktor 2 bis 10 im Vergleich zu *real-time* PCR-Analysen. Bei Untersuchungen zur Osmostressantwort in *E. coli* wurden durchschnittliche Induktionsfaktoren von 3 bis 10 gemessen (Weber und Jung, 2002). Diese Faktoren waren jedoch im Vergleich zwischen den Daten der

DNA-*Microarrays* und RNA-Hybridisierungsexperimente deutlich erniedrigt, und manche Gene wurden im *Microarray* überhaupt nicht nachgewiesen (Weber und Jung, 2002). Deutliche Unterschiede zwischen beiden Methoden zeigten sich bei den osmotisch induzierbaren Genen *kdpA* und *kdpC*, die für Teile eines Kaliumaufnahmesystems codieren (im *Microarray* sechsmal schwächer), sowie *proX*, welches für das periplasmatische substratbindende Protein des ABC-Transportsystems ProU codiert (im *Microarray* 20-mal schwächer; Weber und Jung, 2002). Eine systematische Abschwächung des Signals durch den zwischengeschalteten RT-PCR-Schritt aufgrund unaufgelöster Sekundärstrukturen der mRNA ('black box phenomenon') wurde von Arfin *et al.* (2000) diskutiert. Vielleicht reagiert *C. glutamicum* aber grundsätzlich auf einen hyperosmotischen Schock dieser Stärke nur relativ moderat. In *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde nach einem hyperosmotischen Schock bei Biosynthesegenen für kompatible Solute 20-fache Transkriptionssteigerung gemessen, andere Gene wurden unter diesen Stressbedingungen teilweise 50 bis 100-fach induziert (Kanesaki *et al.*, 2002). Zusätzlich könnten die strengen Auswertungskriterien (*colour swap*; *signal-to-noise ratio*) dazu führen, dass die DNA-*Microarray*-Analysen keine signifikante Induktion bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten Gene ergaben. Fraglich ist, welcher der beiden Methoden der Vorzug in der Interpretation zu geben ist. Die Daten der RNA-Hybridisierungsexperimente der Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* stimmten gut mit den physiologischen Daten überein (siehe 3.1 und 3.3). Dies gilt auch für die Gene *proABC*, für die eine Übereinstimmung zwischen RNA-Hybridisierungsexperimenten und quantitativer *real-time* PCR gezeigt wurde (Ley, 2001), weshalb den Daten der RNA-Hybridisierungsexperimente größere Bedeutung zugemessen wurde.

4.1.3 Vergleich zwischen Deletionsmutanten und dem Wildtyp

Durch die Untersuchung der transkriptionellen und physiologischen Reaktion auf hyperosmotischen Schock konnte eine Induktion und Aktivierung der Systeme der Osmoregulation in *C. glutamicum* Wildtypzellen gezeigt werden. Die Auswirkungen dieser Transkriptionsänderung auf die Transporterkonzentration sollten analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Deletionsmutanten Cgl-*betP*, -*ectP*, -*lcoP* und -*proP* konstruiert, die jeweils nur noch ein Gen für einen Transporter kompatibler Solute besaßen. So konnte jedes Gen und der korrespondierende Transporter einzeln untersucht werden und im Wildtyp auftretende redundante Effekte ausgeschlossen werden.

Physiologische Parameter

Diese Stämme wurden zunächst physiologisch charakterisiert, um phänotypische Unterschiede aufzuzeigen. Alle Stämme erreichten etwas geringere End-Biotrockenmassen als der Wildtyp. Ansonsten waren alle Wachstumsparameter bei einer Osmolalität von 0,3 osmol/kg und nach Erhöhung auf 1,8 osmol/kg, mit Ausnahme von *Cgl-betP*, ähnlich. Dieser Stamm erreichte eine höhere End-OD₆₀₀. Aufgrund des geringeren Korrelationsfaktors lag die End-Biotrockenmasse aber bei ähnlichen Werten wie in den anderen Stämmen. Die Zellen von *Cgl-betP* zeigten bei mikroskopischer Betrachtung keine veränderte Größe oder andere morphologische Unterschiede.

Die internen Aminosäurekonzentrationen der Stämme waren ebenfalls vergleichbar. Der hyperosmotische Schock bewirkte die typische transiente Glutamatakkumulation von 120 bis 150 µmol/g BTM auf 350 bis 400 µmol/g BTM, gefolgt von steigenden Prolinkonzentrationen, das schließlich das dominierende kompatible Solut darstellte. Durch Steigerung der Glutamatkonzentration gleicht die Zelle K⁺-Ionen aus, die als erste Antwort auf einen hyperosmotischen Schock in die Zelle einströmen (Burger, 2001; Botzenhardt, 2004). Außerdem wird der durch den Schock sinkende Turgor durch Glutamat wieder aufgebaut. Kontrollkulturen, die zusätzlich zum Salzschock mit Chloramphenicol versetzt wurden, zeigten aufgrund der Inhibition ihrer Proteinbiosynthese kein Wachstum. Die Akkumulation von Glutamat und Glutamin verlief identisch zu normal geschockten Zellen, während Prolin nur in sehr geringen Konzentrationen akkumuliert wurde. Vermutlich waren alle Glutamat- und Glutamin-Biosyntheseenzyme in ausreichender Menge vorhanden und stark auf der Ebene der Aktivität reguliert, während es für die Prolinsynthese nach Schock erforderlich ist, dass neue Biosyntheseenzyme synthetisiert werden. Später wurde Glutamat wieder abgebaut, obwohl die Zellen kein Prolin akkumuliert hatten. Dieses Signal schien also unabhängig von der Dauer der osmotischen Belastung reguliert zu werden.

Auf physiologischer Ebene zeigten die untersuchten Stämme nur geringe phänotypische Unterschiede und deuteten auf keine gravierenden Veränderungen aufgrund der mehrfachen Gendeletion hin, weshalb sie für vergleichende Analysen der einzelnen Gene und Transporter geeignet waren.

Transkriptionskontrolle der Transporteraktivität

Die Bestimmung der Transkriptionsmuster von *C. glutamicum* zeigte die Reaktion der Transportergene nach einem hyperosmotischen Schock auf Transkriptionsebene. Durch die Änderung der Transportraten konnten die Transporterkonzentrationen bestimmt und durch Vergleiche mit Chloramphenicol-inhibierten Zellen quantifiziert werden. Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass modifizierende Enzyme (Kinasen) ebenfalls transkriptionsreguliert sind und deren Neusynthese durch Chloramphenicol gehemmt wird, weshalb die Konzentrationen der Transporter BetP und EctP zusätzlich über *Western Blots* quantifiziert wurden.

Unter nieder-osmolaren Bedingungen von 0,3 osmol/kg wurden die Gene *betP*, *lcoP* und *proP* in den Deletionsmutanten nur schwach exprimiert, *ectP* etwas stärker. Trotzdem konnten die Substrate Betain oder Prolin über die Transporter BetP und EctP mit überraschend hoher Geschwindigkeit akkumuliert werden. Für EctP war eine hohe Transportrate unter aktivierenden Bedingungen bereits bekannt (Peter *et al.*, 1998), für BetP jedoch noch nicht. LcoP und ProP zeigten geringe Aufnahmeleistungen ihrer Substrate, so dass beide Transporter möglicherweise unter anderen Bedingungen stärker synthetisiert werden.

Unter osmotischen Stressbedingungen konnte gezeigt werden, dass die Transkription aller Gene reguliert wurde. Die Gene *proP* und *betP* wurden am stärksten induziert, (15- bzw. 10-fach). Dies ging mit starker Neusynthese der Transporter ProP und BetP einher, deren Transportrate deutlich anstieg. Das Gen *lcoP* wurde nur schwach exprimiert, aber nach dem Schock induziert. Die Translation von LcoP wurde ebenfalls gesteigert, aber der Anstieg der Transportraten blieb im Vergleich zu den anderen Transportern BetP und EctP sehr gering, was auf eine untergeordnete Rolle dieses Systems in der Osmoregulation hindeutet. Das Gen *ectP* wurde zwar dreifach induziert, die Transportrate von EctP stieg jedoch nur geringfügig. Aufgrund ähnlicher Beobachtungen bei der biochemischen Charakterisierung wurde dieser Transporter als konstitutiv exprimiert interpretiert (Peter *et al.*, 1998). Die dargestellten RNA-Hybridisierungen sprechen gegen diese Interpretation. Die transkribierte *ectP*-mRNA wird vermutlich kaum translatiert. Eine Begründung hierfür steht noch aus.

Aufgrund unterschiedlicher Proteinstabilität gingen in Chloramphenicol-behandelten Kontrollkulturen des Wildtyps und der Mutanten Cgl-*betP* und Cgl-*proP* die BetP- und

ProP-Aufnahmeraten zurück. Dies wurde sichtbar gemacht, indem in diesen Zellen die Translation inhibiert wurde. In Westernblot-Analysen, die zusätzlich zur Kontrolle der Transportmessungen durchgeführt wurden, sank die Proteinkonzentration von BetP und EctP jedoch nur wenig (Tabelle 3-14). Dies könnte auf Konzentrationsschwankungen der Proteine im Western Blot oder auf die generelle physiologische Verfassung der Zellen in den Transportmessungen zurückzuführen sein.

Mit Ausnahme von *ectP* wurde somit das erhöhte mRNA-Signal auch in höhere Proteinkonzentrationen translatiert und somit die Transportraten transkriptionsreguliert gesteigert. Allerdings wurden die Gene schon 30 Minuten nach Schock maximal induziert, während maximale Transportraten bzw. Proteinkonzentrationen erst drei Stunden nach Schock erreicht wurden, als die Zellen schon wieder deutlich exponentiell wuchsen. Das heißt, dass die Akkumulation von kompatiblen Soluten über die Transporter für die Zelle nicht essentiell ist. Für die Überwindung des Schocks und exponentielles Wachstum reichen bereits die neusynthetisierten Aminosäuren aus. Offensichtlich nimmt die Zelle den hohen Aufwand der Transportersynthese trotzdem in Kauf, was durch Anpassung an das natürliche Habitat im Laufe der Evolution erklärt werden kann (siehe hierzu 4.1.4). Der in der stationären Phase beobachtete Rückgang der Transporteraktivität und -konzentration deutet auf Proteinabbau hin. In dieser Wachstumsphase können die Zellen aufgrund limitierender Umweltfaktoren (Nährstoffmangel, unphysiologischer pH-Wert, Sauerstoffmangel, Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte) nicht weiter wachsen. Das zelluläre Volumen verringert sich, die Zellteilung kommt zum Erliegen, und somit sinkt die benötigte Konzentration kompatibler Solute zur Aufrechterhaltung des Turgors, der für die Zellteilung essentiell ist (Koch, 1983; Höltje, 1998; Rönsch, 2000).

Durch Vergleich der Transkriptionsmuster mit den Transportraten konnte somit gezeigt werden, dass die Änderung der Transportaktivitäten von BetP, LcoP und ProP nach einem hyperosmotischen Schock transkriptionskontrolliert verläuft. Die Translation aller Transporter wurde durch einen weiteren unbekanntem Regulationsmechanismus verzögert, so dass maximale Induktion und maximale Proteinkonzentrationen nicht zeitlich direkt aufeinander folgen. Mögliche Gründe für diese Beobachtung wären schneller Abbau der mRNA, bevor sie translatiert wurde, ineffektive Translation aufgrund der Stresssituation (Weber und Jung, 2002),

schneller Protein-*turnover* oder schlechtere Transportleistung bereits vorhandener Transporter aufgrund von geringem Turgordruck (Roth *et al.*, 1985a und 1985b). Houssin *et al.* (1991) hat beschrieben, dass Transporter in Zellen mit erniedrigtem Turgor aufgrund von Änderungen der physikochemischen Eigenschaften der Zellmembran (Fluidität, Faltungen, erniedrigte Membranspannung) nicht mit voller Aktivität arbeiten. Diese Befunde treffen jedoch nicht auf die hier gewählten Bedingungen zu, da zum Zeitpunkt maximaler Transportersynthese bereits positives Wachstum und restaurierter Turgordruck aufgrund neusynthetisierter Aminosäuren herrschte.

C. glutamicum MH20-22B-proP-IcoP

Aufgrund von Beobachtungen aus früheren Arbeiten (Rönsch, 2000) bestand Anlass zu der Annahme, dass das Fehlen eines oder mehrerer Transportergene zu kompensatorischen Effekten führt, die im Wildtyphintergrund nicht erkannt wurden. Hierzu wurden Untersuchungen an zwei baugleichen Mutanten (*Cgl-proP-IcoP* und *MH20-22B-proP-IcoP*) durchgeführt, in denen unterschiedliches Expressionsverhalten von *proP* erstmalig beschrieben worden war (Rönsch, 2000).

Unter den ursprünglichen Bedingungen zeigte die Produktionsstamm-Mutante wesentlich höhere Prolin-Aufnahmeraten als der vom Wildtyp abgeleitete *Cgl-proP-IcoP*. Dieser Effekt wurde auf transkriptionsregulierte Steigerung der Transporterkonzentration zurückgeführt, die anscheinend in *Cgl-proP-IcoP* nicht stattfand. Der Grund war unbekannt. Genauere Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigten diese früheren Daten. Im gewählten Versuchs-Setup fiel auf, dass sich die Zellen aufgrund unterschiedlicher Verdopplungszeiten in verschiedenen Wachstumsphasen befanden und somit Unterschiede im physiologischen Zustand der Zellen bestanden. Zudem erreichten die Mutanten vollkommen unterschiedliche End-Biotrockenmassen, und auch der Korrelationsfaktor unterschied sich deutlich, so dass hier zusätzlich ein Fehler in der bei Transportmessungen untersuchten Zellzahl auftrat. Vermutlich konnte die Produktionsmutante in der spätexponentiellen Wachstumsphase die Transporterkonzentration noch steigern, wohingegen die Wildtypmutante, die sich bereits mehrere Stunden in der stationären Phase befand, aufgrund verringerter Transporterkonzentration kaum noch Prolin aufnehmen konnte.

In einem modifizierten Versuchs-Setup wurden die Zellen unter gleichartigen physiologischen Verhältnissen kultiviert und die Daten erneut überprüft.

Unter diesen optimierten Bedingungen konnte gezeigt werden, dass sowohl in *MH20-22B-proP-IcoP* als auch in *Cgl-proP-IcoP* die Transportrate von ProP anstieg. Da alle Versuche unter V_{\max} -Bedingungen stattfanden, konnte anhand von Kontrollexperimenten mit Chloramphenicol-behandelten Zellen gezeigt werden, dass diese Steigerung nicht auf der Ebene der Aktivität stattfand. In Verbindung mit Analysen der Transkriptionsmuster kann darauf geschlossen werden, dass die Änderung der Transportraten ebenso wie im Wildtyp transkriptionskontrolliert verläuft.

4.1.4 Bedeutung der Transporter für die Osmostress-Adaptation

Die Gene *betP*, *IcoP*, *proP* zeigten eine sehr geringe, *ectP* eine etwas stärkere konstitutive Transkription und Translation unter niederosmolaren Bedingungen von 0,3 osmol/kg. Die einzelnen Transporter verhielten sich vor und nach einem Schock sehr differenziert.

BetP zeigte trotz sehr niedrigen Transkriptionslevels unter aktivierenden V_{\max} -Bedingungen hohe Transportraten. Durch Schock wurde die Transporterkonzentration und damit die Transportrate signifikant erhöht, allerdings erst mit einer Verzögerung von drei Stunden. Vermutlich wird die Translation der *betP*-mRNA durch eine weitere Ebene der Regulation verzögert. Obwohl das Gen *ectP* durch einen hyperosmotischen Schock induziert wurde, änderte sich die Transporterkonzentration von EctP nicht. Auch hier scheint ein weiterer, unbekannter Regulationsmechanismus die Translation zu verhindern, oder aber EctP unterliegt einem hohen Protein-*turnover*, der ständig durch Neusynthese kompensiert wird. Diese beiden Transporter (BetP und EctP) bilden unter moderaten osmotischen Bedingungen ein Notfallsystem von *C. glutamicum* gegen hyperosmotische Änderungen, die im natürlichen Habitat unter Umständen schnell eintreten können. In freier Natur wachsen Bodenbakterien nur selten exponentiell, sondern befinden sich lange Zeit in ruhenden Phasen (Hecker und Völker, 2001). Unter solchen Bedingungen ist ein System, welches ohne Umwege über transkriptionelle Aktivierung konstitutiv arbeitet, überlebenswichtig. Bisher wurde nur für EctP eine solche Notfallrolle postuliert (Peter *et al.*, 1998).

Aufgrund der geringen Transportkapazität stellt sich die Frage nach der physiologischen Rolle von LcoP. Bedingungen, unter denen LcoP höhere Transportraten aufweist, sind noch nicht gefunden worden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die externe Verfügbarkeit von Betain der Mutante Cgl-*lcoP* trotz der hier bestimmten geringen Transportraten einen Wachstumsvorteil verschaffte (S. Morbach, Universität zu Köln, pers. Mitteilung). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 41 % zu BetP (Peter *et al.*, 1996) und von 34 % zu EctP (Peter *et al.*, 1998) kann vermutet werden, dass *lcoP* evolutionär aus einer Genduplikation hervorgegangen ist. Bisher bedeutete dieses zusätzliche Gen keinen Selektionsnachteil oder sogar einen Vorteil im Bestreben, kompatible Solute im Falle hyperosmotischer Bedingungen so effektiv wie möglich zu akkumulieren.

ProP wurde nur durch hyperosmotischen Schock transkriptionskontrolliert aktiviert. Wie im Falle der anderen Transporter scheint die Translation reguliert zu werden, was zu verzögerter Änderung der Proteinkonzentration führt. ProP ist der am stärksten induzierbare osmoregulierte Transporter von *C. glutamicum*. Diese Reaktion lässt darauf schließen, dass Prolin im natürlichen Lebensraum in ausreichender Konzentration vorkommt. Analysen von Bodenproben zeigten, dass Prolin in geringer Konzentration unter 1 % aller Aminosäuren vorkommt (Lynch und Whipps, 1990; Klöppner, 1999). Für die Akkumulation reichen dem hochaffinen Transporter ($K_M = 48 \mu\text{M}$) solche Konzentrationen aus. Zusätzlich kann die lokale Konzentration von Prolin höher sein. Häufig eintretende hypoosmotische Bedingungen (Regen, Überschwemmung) aktivieren mechanosensitive Kanäle (MscL und MscS in *C. glutamicum*), die einen Großteil der internen kompatiblen Solute freisetzen. Durch kumulatives Auftreten von Bodenbakterien, die Prolin als Osmoprotektivum synthetisieren und verwenden (*C. glutamicum*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp. u.a.), ist die lokale Prolinkonzentration in unmittelbarer Nähe der Zellen erhöht (Welsh, 2000). Es wäre aber auch denkbar, dass dieser Transporter zum Re-Import des zellintern hochkonzentrierten kompatiblen Soluts für Verluste durch unbekannte *leaks* zuständig ist. Für OpuE, dem osmoregulierten Prolin-Aufnahmesystem aus *Bacillus subtilis*, wurde eine solche Bedeutung beschrieben (von Blohn *et al.*, 1997; Moses, 1999).

Es wurde beobachtet, dass trotz wiedererlangten Turgors aufgrund *de novo* synthetisierter kompatibler Solute und Nicht-Verfügbarkeit dieser Substanzen im Medium die Transkription der Transportergene induziert wird, obwohl die Zellen

wieder exponentielles Wachstum erreicht hatten. Anscheinend ist es unter permanentem osmotischen Stress, der z.B. bei Austrocknung des Bodens lange dauern kann, für die Zelle vorteilhaft, höhere Transporterkonzentrationen zu besitzen, um im Falle von extern verfügbaren kompatiblen Soluten diese sofort zu importieren, da Aufnahme dieser Substanzen der Neusynthese bevorzugt wird (Wood, 1999).

Dieses ausgeklügelte System hoher Akkumulationsraten kompatibler Solute durch *de novo* Synthese sowie über konstitutiv aktive bzw. transkriptionskontrollierte Transporter ist ein gutes Beispiel für die gute Anpassung von Organismen an die in ihrem Habitat herrschenden Umweltbedingungen im Laufe der Evolution.

4.2 Modell der Regulation nach einem hyperosmotischen Schock in *C. glutamicum*

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten kann ein generelles Schema der Reaktion von *C. glutamicum* auf hyperosmotischen Stress erstellt werden. Es wurde gezeigt, dass *C. glutamicum* zu diesem Zweck alle bekannten Systeme aktiviert, um kompatible Solute zu akkumulieren und damit den positiven Turgordruck zu restaurieren, der für weiteres Zellwachstum und Teilung notwendig ist. Ein Notfallsystem, bestehend aus BetP und EctP, sorgt im Falle extern verfügbarer kompatibler Solute für eine schnelle Adaptation. Außerdem werden sowohl Stoffwechselwege zur *de novo* Synthese von Aminosäuren und Trehalose genutzt als auch Transportsysteme für außerhalb der Zelle vorhandene kompatible Solute aktiviert und zusätzlich auf Transkriptionsebene induziert. Ein weiterer Regulationsmechanismus verhindert eine sofortige, maximale Translation der erhöhten Transkriptmenge. Alle Reaktionen sind in ihrer Stärke von der Schockhöhe, einer vorherigen Adaptation an die herrschende Osmolalität sowie von der Verfügbarkeit externer Solute abhängig.

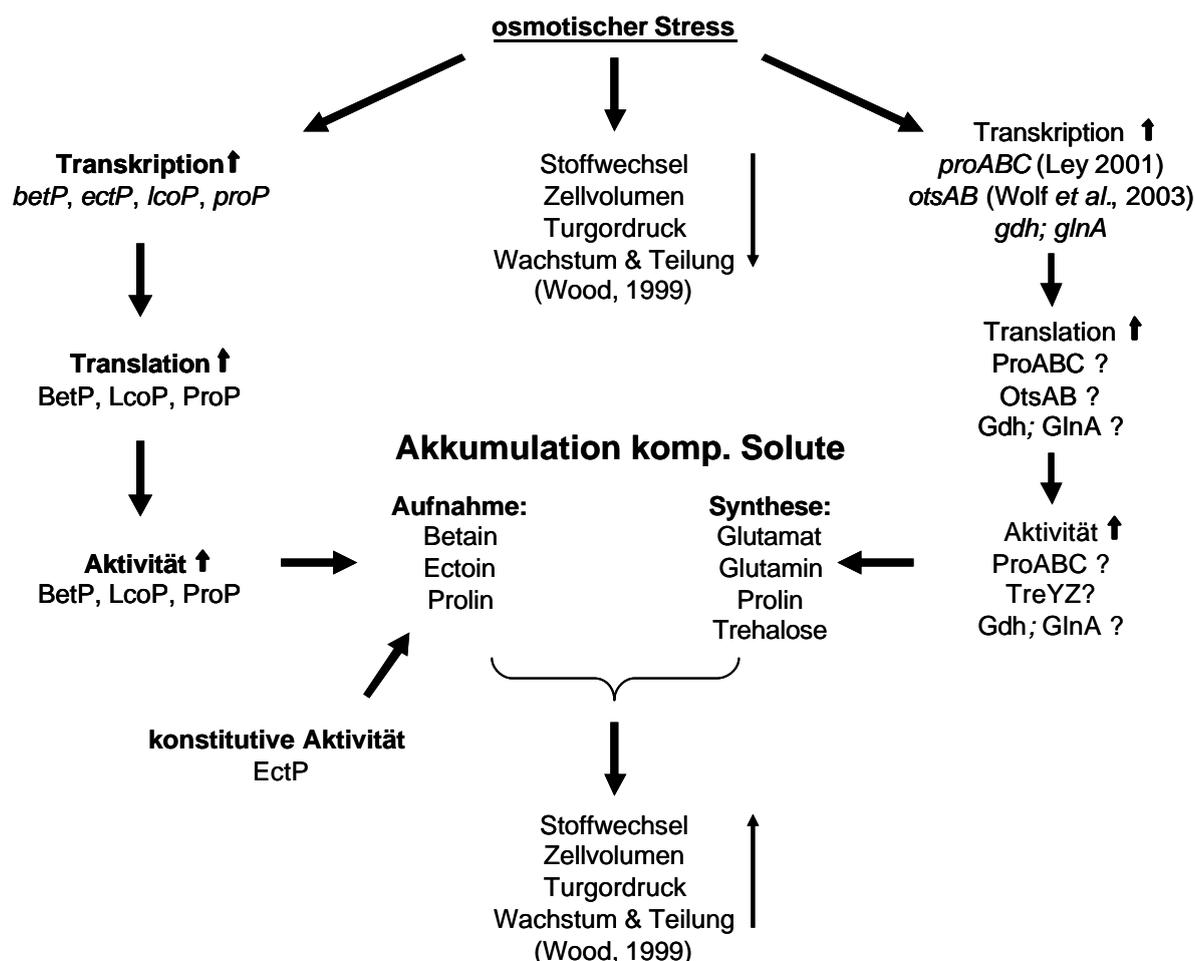


Abbildung 4-1: Modell der Regulation von *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock. In dieser Arbeit untersuchte Systeme (links) wurden durch bekannte Systeme (rechts) ergänzt.

4.3 Abschließende Betrachtungen

Die erhebliche Redundanz und differenzierte Regulation bezüglich der Akkumulation kompatibler Solute nach einem hyperosmotischen Schock in *C. glutamicum* hängt vermutlich mit der evolutiven Anpassung an die Lebensbedingungen dieses Organismus zusammen. Die im natürlichen Habitat vorkommenden Schwankungen insbesondere der osmotischen, aber auch sonstiger Bedingungen erfordern eine hohe Stressresistenz und schnelle Adaptationsfähigkeit. Dies manifestiert sich in der Anwesenheit von vier, sich in ihren Substratspektren überschneidenden Transportsystemen sowie der Nutzung von hauptsächlich dem Primärstoffwechsel zuzurechnenden Synthesewegen zur Anpassung an hohen osmotischen Stress.

Unter Laborbedingungen führte das Fehlen eines oder mehrerer Transporter zu keinen Wachstumsphänotypen. Dies hängt u.a. mit der Fähigkeit des Bakteriums

zusammen, durch *de novo* Synthese hohe Konzentrationen kompatibler Solute im Zellinnern zu akkumulieren, weshalb in Notsituationen (keine externe Verfügbarkeit dieser Solute) die vorhandenen Stoffwechselwege ausreichen.

Es ist davon auszugehen, dass *C. glutamicum* im natürlichen Habitat ausreichende Konzentrationen kompatibler Solute vorfindet (Welsh, 2000). Außerdem beschränkt sich osmotischer Stress nicht nur auf hyper-, sondern auch hypoosmolare Bedingungen, die in stetem Wechsel (Sonnenschein/Trockenheit oder Regen/Überschwemmung) mit anderen Stressarten auftreten können. Ein Laborsystem kann häufig nur einen bestimmten Ausschnitt dieser Bedingungen darstellen und einen kleinen Aspekt der Regulation beleuchten. Eine Adaptation an langsame Austrocknung des Bodens, wie sie in der Natur eher zu vermuten ist als ein abrupter Schock, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Dies stellt einen Ansatzpunkt für künftige Studien dar.

5 Zusammenfassung

C. glutamicum ist als unbewegliches Bodenbakterium häufig wechselnden osmotischen Bedingungen ausgesetzt. Es schützt sich gegen hyperosmotischen Stress durch die Akkumulation kompatibler Solute. Zu diesem Zweck synthetisiert es die Aminosäuren Glutamat, Glutamin und Prolin *de novo* und aktiviert Transporter für den Import der kompatiblen Solute Betain, Ectoin und Prolin. Bisher war eine Regulation dieser Transportsysteme nur auf Aktivitätsebene nachgewiesen worden (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1996 und 1998; Steger, 2002). Deshalb wurde die Änderung der Transkriptionsmuster der Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* mittels RNA-Hybridisierungsexperimenten sowie die hierdurch bewirkte vermehrte Transportersynthese mittels Bestimmung der Transportraten und Antikörpernachweisen nach einem hyperosmotischen Schock untersucht. Aufgrund redundanter Substratspektren der Transporter im Wildtyp wurden Deletionsmutanten konstruiert, denen je vier der fünf vorhandenen Importer für kompatible Solute fehlten, um jedes Gen bzw. jeden Transporter individuell zu analysieren.

Anhand der Untersuchungen des Wildtyps und vergleichender Analysen der Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass bei geringer externer Osmolalität

- a) die Gene *betP*, *lcoP* und *proP* nur schwach und *ectP* etwas stärker konstitutiv exprimiert werden
- b) BetP und EctP unter aktivierenden Bedingungen überraschend hohe Transportraten zeigen
- c) die Aminosäure Glutamat in hohen Konzentrationen vorliegt, um den für Gram-positive Bakterien typischen Turgordruck von ca. 20 bar aufrecht zu erhalten.

Durch Analysen des Wildtyps und der Mutanten nach einem hyperosmotischen Schock konnte gezeigt werden, dass

- a) die Transportergene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* auf der Ebene der Transkription reguliert werden
- b) die Transportraten und die Transporterkonzentrationen von BetP, LcoP und ProP, nicht jedoch von EctP, transkriptionskontrolliert deutlich ansteigen

- c) die Aminosäuren Glutamat und Glutamin in der ersten Schockantwort stets nur transient akkumuliert und später durch Prolin ersetzt werden, welches das vorrangige kompatible Solut bei permanentem osmotischem Stress darstellt und den notwendigen Turgor bis in die stationäre Phase aufrecht erhält
- d) trotz bevorzugter Aufnahme kompatibler Solute aus energetischen Gründen die negativen Auswirkungen eines Schocks allein durch die Neusynthese endogener Aminosäuren überwunden werden können
- e) ein im Medium herrschender Mangel an kompatiblen Soluten die Transkription der Transportergene nicht unterbindet, d.h. dass entweder kein Signal über herrschende Zustände außerhalb der Zelle wahrgenommen und verarbeitet wird oder dass unter permanenter osmotischer Belastung gerade diese Systeme reguliert werden, um im Falle von plötzlicher Verfügbarkeit der Substrate gerüstet zu sein
- f) kurzfristige Erholung der Zellen aufgrund der synthetisierten Aminosäuren stattfindet und exponentielles Wachstum fortgeführt wird.
- g) zwischen Transkriptions- und Aktivitätsebene eine Abschwächung des Signals stattfindet

Weiterhin wurde im Wildtyp eine Anhängigkeit der Stärke der Transkriptionsregulation sowohl von der Schockdifferenz als auch der Grundosmolalität des Mediums gezeigt. Eine Korrelation zwischen der Stärke der Transkriptionsregulation und der Endosmolalität konnte dagegen ausgeschlossen werden. Die Verfügbarkeit von kompatiblen Soluten im Medium bewirkte eine schnellere und kürzere Transkriptionsdauer der untersuchten Gene *betP*, *ectP*, *lcoP* und *proP* sowie eine Verringerung der Induktionsstärke im Vergleich zu Zellen ohne kompatible Solute. Ein positiver Effekt war auch auf die Regenerationsfähigkeit und das Wachstumsverhalten nach dem Schock festzustellen.

6 Anhang

Tabelle 6-1: Induktionsfaktoren signifikant regulierter Gene der DNA-Microarray-Analysen (zu Kapitel 3.2).

ORF Nr.	Name des ORF	Gruppe	T5	T15	T30	T60	T120	T180
33	Similarity to panC (<i>C. glutamicum</i>)	amino acids / vitamines	1,41					3,87
164	Rv0837c (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	0,32					
195	strong similarity to sulfate adenylyltransferase, large chain (<i>E. coli</i>)	central metabolism / energy	0,73	0,42	0,31	0,23	0,21	0,18
198	hypothetical protein	unknown	0,67	0,21	0,06	0,18	0,37	0,30
239	CTPDA_Ec (<i>E. coli</i>)	diverse	1,05	2,91	3,07		1,67	1,98
277	strong similarity to hypothetical protein Rv3808c (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	2,21	1,04	3,52	1,46	1,84	1,82
289	similarity to transcription regulator farR (<i>E. coli</i>)	regulation	0,46	0,46	0,51	0,32	0,53	0,59
306	Rv1069c_Mt (<i>B. caldolyticus</i>)	central metabolism / energy	0,32	0,25	0,24	0,32	0,29	0,41
376	Heavy metal transporting ATPase (<i>Archeaoglobus fulgidus</i>)	transport	0,30	0,27		0,31		
456	hypothetical protein	unknown	1,50	3,30	2,92	2,09	1,07	1,27
489	hipO_Bs* (<i>B. subtilis</i>)	diverse	0,96	2,91	5,78	1,86	1,71	1,91
531	abrB_Ec (<i>E. coli</i>)	transport	1,21	4,84		0,65	0,35	
575	gltD (<i>C. glutamicum</i>)	amino acids / vitamines	1,53	3,42	2,22	1,78	1,13	1,72
591	yjdL_Ec (<i>E. coli</i>)	transport	1,90	2,06	3,65	2,94	1,90	
651	recR_Bs! (<i>B. subtilis</i>)	diverse	1,43	3,27	3,23	2,40	1,90	1,96
660	hypothetical protein	unknown	0,93	2,03	1,21	0,27	0,29	0,37
661	leuA (<i>C. glutamicum</i>)	amino acids / vitamines		1,42	0,96	0,28	0,26	0,49
662	leuA (<i>C. glutamicum</i>)	amino acids / vitamines	1,25	2,54	1,10		0,29	0,42
698	pbp1_Ml (<i>M. leprae</i>)	diverse	2,39	3,81	4,00	2,54	2,38	2,26
701	whiB_Sc (<i>S. coelicolor</i>)	diverse	1,29	4,42	1,60	1,08	1,32	1,22
702	questionable ORF	unknown	1,30	3,21	1,47	1,21	1,52	1,46
705	shiA_Ec (<i>E. coli</i>)	transport	1,67	4,99	1,69	0,98	1,11	
727	Rv3661_Mt (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	0,81	2,33	3,01		1,71	1,08
738	<i>C. glutamicum</i>	unknown	0,55	0,56	0,51	0,33	0,40	0,65
851	CuATP_Eh (<i>Enterococcus hirae</i>)	transport	0,30	0,22	0,26	0,39	0,47	0,69
879	Rv0495c (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	1,35	1,55	1,60	1,49	1,58	3,06
921	strong similarity to probable membrane protein Rv0528 (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	1,19	0,31	1,44	1,30	1,07	1,36
922	similarity to cytochrome c-type synthesis protein ccsA (<i>C. reinhardtii</i> chloroplast)	central metabolism / energy	0,82	0,26	0,96	1,05	0,93	1,13
927	arsR_Sa* (<i>Staphylococcus aureus</i>)	diverse		0,49	0,27			
928	Hypotetical protein45.1 kD protein (<i>E. coli</i>)	unknown	0,33	0,55	0,40	0,43		0,47
971	copB (<i>Enterococcus hirae</i>)	transport	0,29	0,51	0,18		0,37	0,50
1080	yidE_Ec (<i>E. coli</i>)	unknown	0,29	0,14	0,16	0,37	0,32	0,50
1121	carbB_Mc (<i>Mucor circinelloides</i>)	diverse	1,09	0,17	1,02	3,48	2,12	1,54
1123	crtB (<i>M. marinum</i>)	diverse	1,03	0,40	1,06	3,56	1,90	1,54
1136	strong similarity to lipoprotein-28 precursor gcaD (<i>E. coli</i>)	diverse	0,61	0,27	0,31	0,33	0,32	0,26
1155	questionable ORF	unknown	0,63	1,22		0,32	0,27	

Tabelle 6-1: Fortsetzung

ORF Nr.	Name des ORF	Gruppe	T5	T15	T30	T60	T120	T180
1160	Rv1130_Mt (M. tuberculosis)	unknown	1,89	9,28		1,23	1,35	1,28
1161	bcpA_Smh (S. hygroscopicus)	central metabolism / energy	0,72	3,05	0,65		0,72	0,70
1162	C-S_Ms (M. smegmatis)	central metabolism / energy	1,83	5,44	3,30		1,10	
1258	Halobacterium sp.	unknown	1,04	0,30	1,40	0,97	1,08	1,25
1272	hypothetical 30.5K precursor (Enterococcus faecalis)	unknown	0,60	0,29		0,48	0,42	0,51
1478	Rv1117_Mt (M. tuberculosis)	unknown	0,45	0,57	0,30	0,37	0,30	0,33
1482	strong similarity to hypothetical 30.2 kd protein in idh-deoR intergenic region (E. coli)	unknown		0,54	0,56	3,29	0,58	
1503	AatRNA-H_Ec (E. coli)	diverse	1,54	1,80	2,52		1,37	1,51
1513	strong similarity to UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase gcaD_Bs (B. subtilis)	diverse	1,73	3,05	3,58	3,41	3,03	2,93
1546	C. glutamicum	unknown	1,77	4,18	3,45	1,40	1,16	
1567	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase aro (C. glutamicum)	amino acids / vitamins	2,6	3,79	3,93	3,95	4,02	3,89
1568	uppS_Mcl (Micrococcus luteus)	diverse	1,12	3,13	2,83	2,38	2,78	2,60
1578	pat_Smv* (S. viridochromogenes)	diverse	1,53	2,03	3,12	2,46	1,59	1,47
1583	ycsG_Bs (B. subtilis)	transport	1,68	5,27			0,67	
1584	questionable ORF	unknown	1,63	0,99	3,98			
1585	strong similarity to putative gntR-family transcriptional regulator (S. coelicolor)	regulation	1,24	3,05	3,31		1,55	
1658	ykoE_Bs (B. subtilis)	unknown	1,37	0,31	0,24	0,68	1,75	3,14
1672	questionable ORF	unknown	1,79	1,77	0,80	3,70	0,60	1,22
1678	Rv1157c_Mt* (M. tuberculosis)	unknown	0,36	0,33	0,36	0,37	0,56	0,46
1721	TcmA_Smg (S. glaucescens)	transport	0,52	1,72	1,09		1,06	
1727	hypothetical protein	unknown			5,75		1,70	
1729	hypothetical protein	unknown	1,06	3,56		1,52	0,95	2,63
1765	hypothetical protein	unknown	0,32	0,58	0,75	0,47	0,45	0,53
1766	etrA_Shp* (Shewanella putrefaciens)	regulation	0,30	0,27	0,19	0,20	0,29	0,50
1800	rho_Mcl (Micrococcus luteus)	diverse	1,02		4,58	1,10	0,51	1,95
1802	hemK (E. coli)	diverse	2,85	1,44	4,39		0,73	2,07
1873	hypothetical protein	unknown	2,28	1,82	1,74	2,21	1,57	
1875	Rv0046c_Mt (M. tuberculosis)	unknown	1,16	2,26	2,38	1,57	1,51	1,37
1876	similarity to hypothetical protein (C. glutamicum)	unknown	1,37	2,29	2,14	3,11	2,26	2,39
1888	mez (C. glutamicum)	central metabolism / energy	0,65	0,24	0,18	0,13	0,29	0,23
1917	AnthPR-T (C. glutamicum)	diverse	2,08	1,49	2,47	2,40	2,26	2,13
1918	PRAnth-Iso (C. glutamicum)	diverse	1,64	1,27	1,58	1,80	1,70	1,71
1919	Trp-Syna (C. glutamicum)	amino acids / vitamins	0,97	0,80	1,53	1,22	1,14	1,40
1933	SCI11.36c (S. coelicolor) / T120 ytnM (B. subtilis)	unknown	0,48	0,19	0,14	0,20	0,35	0,34
1934	J12_Sc (S. coelicolor)	unknown		0,27	0,20		0,42	
1996	Rv2917 (M. tuberculosis)	diverse	1,17	1,06	1,82	1,37	1,57	1,45
2000	sigB (C. glutamicum)	regulation	0,35	0,43	0,54	0,40	0,39	0,32
2004	Rv2712c (M. tuberculosis)	unknown	0,99	1,49	1,39	2,00	2,96	2,97
2042	gluC (C. glutamicum)	transport	1,09	2,42	2,48	0,85	1,33	1,39
2093	oppA_Ec! (E. coli)	diverse	0,84	2,90		1,43	2,27	2,08

Tabelle 6-1: Fortsetzung

ORF Nr.	Name des ORF	Gruppe	T5	T15	T30	T60	T120	T180
2095	strong similarity to oligopeptide ABC transporter (permease) oppC (<i>B. subtilis</i>)	transport	0,99	1,40		2,00	2,09	1,65
2152	thiF_Ec (<i>E. coli</i>)	amino acids / vitamines	2,78	0,96	2,01	3,16	4,28	3,76
2256	PAB0608_Pya (<i>Pyrococcus abyssi</i>)	diverse	0,78	0,43	0,33	0,43	0,68	0,74
2269	oleB_Sma (<i>S. antibioticus</i>)	diverse	1,83	3,43	1,71	1,04	0,91	1,29
2306	strong similarity to hypothetical protein Rv2169c (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	0,59	0,64	0,49	0,32	0,42	0,39
2329	P45 (<i>L. monocytogenes</i>)	diverse	1,87	0,26		0,91	0,85	1,09
2330	questionable ORF	unknown	0,94	0,23	0,24	0,77	0,96	1,02
2338	questionable ORF	unknown		0,56	0,62		0,46	
2346	strong similarity to probable sulfate permease - <i>Pseudomonas</i> sp.	transport		3,21	3,01	4,82	1,31	
2347	hypothetical protein	unknown	3,41		0,56	0,53	0,84	
2348	questionable ORF	unknown	1,33	3,77	1,03	0,18	1,38	0,55
2349	questionable ORF	unknown	1,69	3,13	1,27		1,59	
2350	hypothetical protein	unknown	1,83	3,40	3,08		2,10	
2380	hisG (<i>C. glutamicum</i>)	diverse	2,01	1,01	3,21		0,32	1,86
2417	scc77.24_Sc (<i>S. coelicolor</i>)	unknown	1,61	3,55	2,90		2,08	
2426	weak similarity to glucuronide repressor (<i>E. coli</i>)	regulation	1,78	3,14	2,90	2,19	2,12	1,72
2433	pacL_Sy! (<i>Synechococcus</i> sp.)	transport	0,28	0,21	0,31	0,35	0,45	0,63
2444	strong similarity to oleandomycin resistance protein oleB (<i>S. antibioticus</i>)	diverse	2,17	1,19	1,07	3,28	1,19	
2451	similarity to capreomycin acetyltransferase (<i>S. capreolus</i>)	diverse		0,58	0,81	3,68	0,81	
2480	ammonium transporter amt (<i>C. glutamicum</i>)	transport	2,78	1,11			0,60	
2487	gap (<i>C. glutamicum</i>)	central metabolism / energy	1,02	1,06	1,02	0,96	0,97	1,02
2533	hemU (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	transport	1,71	1,15	0,99		3,39	2,08
2536	ARO1_Sac* (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	amino acids / vitamines	3,22	2,08	5,12	3,70	2,62	2,15
2537	Rv2553c_Mt (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown	1,59	1,47	3,39	0,85	0,32	1,43
2579	hypothetical protein	unknown	0,21	0,55	0,43	3,28	1,26	0,58
2596	hypothetical protein	unknown	2,16	2,03	1,35	1,19	1,05	
2680	cmcT (<i>S. clavuligerus</i>)	transport		1,63	3,15		0,95	
2703	rshE protein (<i>E. coli</i>)	diverse	0,58	0,46	0,53	0,33	0,33	0,32
2705	<i>C. glutamicum</i>	unknown	0,74	0,48	0,52	0,36	0,39	0,32
2736	leuD (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	amino acids / vitamines	4,16	2,24	1,82	3,45	4,73	
2740	hypothetical protein	unknown	0,88	0,20		0,78	0,78	0,94
2754	hypothetical protein	unknown	0,33	0,29	0,07	0,10	0,21	0,45
2792	acetolactate synthase small chain ilvN - (<i>C. glutamicum</i>)	central metabolism / energy	1,90	3,03	2,13	1,36	1,80	1,60
2793	ilvB (<i>C. glutamicum</i>)	central metabolism / energy	1,82	3,87	1,60	1,32		1,62
2858	strong similarity to hypothetical protein Rv0807 (<i>M. tuberculosis</i>)	unknown		1,21	1,34		3,18	1,47
2887	sucD (<i>C. glutamicum</i>)	central metabolism / energy	0,31	2,32	2,11			

Tabelle 6-1: Fortsetzung

ORF Nr.	Name des ORF	Gruppe	T5	T15	T30	T60	T120	T180
2890	cysK (B. subtilis)	amino acids / vitamines	0,46	0,23			0,54	0,38
2923	Rv3129_Mt (M. tuberculosis)	unknown	0,37	0,30	0,35	0,42	0,29	0,42
2929	nrdH (C. glutamicum)	diverse	1,16	3,09	2,17	1,48	1,20	1,16
2930	nrdI protein (C. glutamicum) [truncated]	diverse	1,09	3,18	2,23	1,52	1,22	1,15
2965	appF_Bs (B. subtilis)	transport	0,93	0,56	0,22	0,48	0,70	0,57
2969	nikB_Ec (E. coli)	transport	0,58	0,34		0,30	0,42	0,37
2970	appA_Bs (B. subtilis)	transport	0,56	0,23	0,15	0,33	0,58	0,42
2978	metB (C. glutamicum)	amino acids / vitamines	0,69	0,44	0,33	0,35	0,63	0,50
3027	strong similarity to maltose regulon repressor mall (E. coli) [putative frameshift]	regulation		0,70		3,74	0,49	
3033	oppA_St* (Salmonella typhimurium)	diverse	0,92	0,93	3,89	0,86	1,82	0,33
3061	proA (C. glutamicum)	amino acids / vitamines	0,93	2,98	3,28	1,43	1,30	1,16
3152	arsR-family Rv2358 (M. tuberculosis)	regulation	0,33	0,40	0,39	0,24	0,23	0,38
3194	pyruvat-dehydrogenase component E1 aceE - (C. glutamicum)	central metabolism / energy	0,96	0,95	0,98	1,02	1,06	0,95
3234	TM1010_Tm (Thermotoga maritima)	unknown	0,58	0,49	0,26	0,50	0,70	0,79
3241	hypothetical protein	unknown	0,58	0,33	0,40	0,50	0,59	0,82
3303	Rv0485_Mt (M. tuberculosis)	diverse	0,47	0,25	0,22	0,40	0,72	0,62
3317	S. coelicolor	unknown	0,95	0,99	1,65		0,85	5,68
3392	Isr2_Mt* (M. tuberculosis)	diverse	0,18	0,27	0,36	0,28	0,22	0,28
3443	proC (E. coli)	unknown			3,22		2,94	
3444	proP (C. glutamicum)	transport	2,09	3,20	5,32	10,94	19,46	2,31
3449	Homo sapiens	unknown	1,24	3,69			1,55	
3452	U2266k (M. leprae)	unknown	0,37	0,31	0,44	0,23	0,38	0,44
3508	SC4A7.14_Sc (S. coelicolor)	unknown	1,26	3,89	2,77		1,31	
3515	ImrB (B. subtilis)	transport	0,43		2,09		3,33	1,23
64895	AX064895.fas.0.102 (Patent)	central metabolism / energy	0,29	0,22	0,22	0,25	0,39	0,53
66177	AX66177 (C. glutamicum) Patent	regulation	0,52	0,75	0,59	0,22	0,15	0,18
66575	6657575.fas.0.75 (patent)	diverse	1,70	1,06	1,83	2,08	3,38	2,64
69134	AX069134.fas..0.88 (Patent)	transport	0,64	0,45	0,48	0,21	0,35	0,32

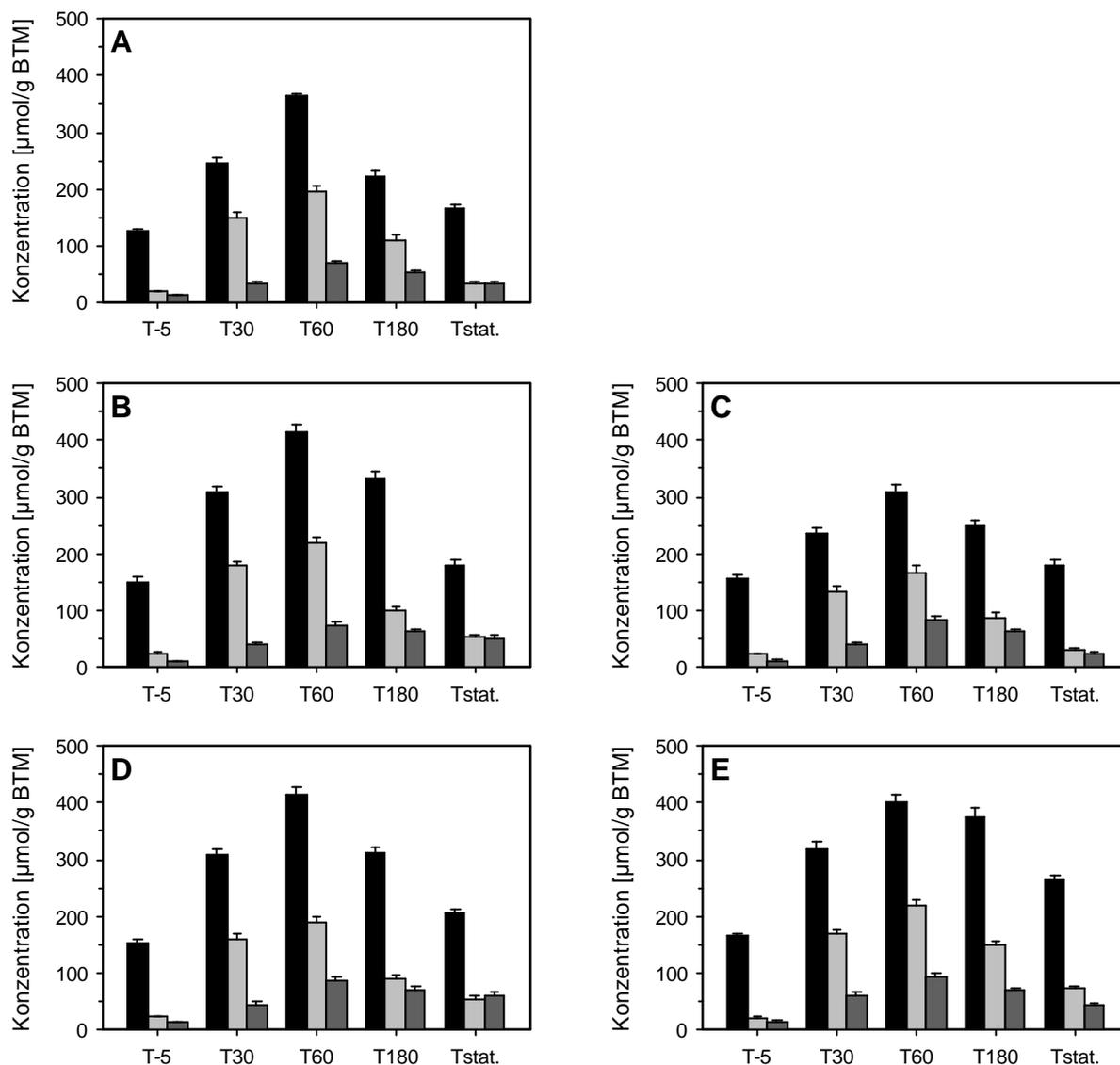


Abbildung 6-1: Interne Aminosäuren in *C. glutamicum* Wildtyp und den Deletionsmutanten (zu Abbildung 3-15). Zellen wurden auf MMI-Medium (0,3 osmol/kg) kultiviert und in der exponentiellen Phase auf 1,8 osmol/kg geschockt. Kurz vor dem Schock erfolgte Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ ChIA. ■ Glutamat; □ Glutamin; ▒ Prolin. (A) Wildtyp; (B) *Cgl-betP*; (C) *Cgl-ectP*; (D) *Cgl-icoP*; (E) *Cgl-proP*.

7 Literatur

- Abe, S., Takayama, K. & Kinoshita S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Alia, N., Hayashi, H., Sakamoto, A. & Murata, N. (1998).** Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycine betaine. *Plant J.* **16**: 155-161.
- Arakawa, T. & Timasheff, S.N. (1985).** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* **47**: 411-414.
- Arfin, S.M., Long, A.D., Ito, E.T., Toller, L., Riehle, M.M., Paegle, E.S. & Hatfield, G.W. (2000).** Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J. Biol. Chem.* **275**: 29672-29684.
- Barbour, E.A. & Priest, F.G. (1986).** The preservation of *Lactobacilli*: a comparison of three methods. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**: 68-71.
- Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M. & Rees, D.C. (2002).** Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* **298**: 1582-1587.
- Bayles, D.O. & Wilkinson, B.J. (2000).** Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 23-27.
- Beckers, G. (2004).** AmtR - ein globaler Repressor der Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Benaroudj, N., Lee, D.H. & Goldberg, A.L. (2001).** Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**: 24261-24267.
- Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A. & Ghazi, A. (1996).** Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* **151**: 175-187.
- Blohn, von, C., Kempf, B., Kappes, R.M. & Bremer, E. (1997).** Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor s^B. *Mol. Microbiol.* **25**: 175-187.

- Bohnert, H.J. (1995).** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Botzenhardt, J. (2004).** Regulation des Betainimporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress. Dissertation, Universität zu Köln.
- Bovell, C.R., Packer, L. & Hergerson, R. (1963).** Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochem. Biophys. Acta* **75**: 257-266.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bremer, E. & Krämer, R. (2000).** Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: *Bacterial Stress Response*, Storz, G. & Hengge-Aronis, R. (Hrsg.), ASM, Washington, D.C., 79-97.
- Britton, K.L., Stillman, T.J., Yip, K.S., Forterre, P., Engel, P.C. & Rice, D.W. (1998).** Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.* **273**: 9023-9030.
- Brown, A.D. (1963).** The peripheral structures of Gram-negative bacteria. IV. The cation sensitive dissolution of the cell membrane of the halophilic bacterium, *Halobacterium halobium*. *Biochim. Biophys. Acta* **75**: 425-435.
- Brown, A.D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803-846.
- Brown, A.D., Kylie, F., Mackenzie, F. & Singh, K.K. (1986).** Selected aspects of microbial osmoregulation. *FEMS Microbiology Reviews* **39**: 31-36.
- Burg, M., Kwon, E. & Kültz, D. (1997).** Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 437-455.
- Burger, U. (2002).** Struktur und Funktionsanalysen am osmotisch regulierten Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A. & Richarme, G. (1999).** Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* **145**: 2543-2548.

- Canovas, D., Fletcher, S.A., Hayashi, M. & Csonka, L.N. (2001).** Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **183**: 3365-3371.
- Chang, G., Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T. & Rees, D.C. (1998).** Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**: 2220-2226.
- Conway, T., Schoolnik, G.K. (2003).** Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol. Microbiol.* **47(4)**: 879-89.
- Csonka, L.N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Csonka, L.N. & Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, pp. 1210-1223. Edited by N. F. *et al.*, Washington DC: ASM Press.
- Culham, D.E., Tripet, B., Racher, K., Voegelé, R.T., Hodges, R.S. & Wood, J.M. (2000).** The role of the carboxy terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *J. Mol. Recognit.* **13**: 309-322.
- da Costa, M.S., Santos, H. & Galinski, E.A. (1998).** An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **61**: 117-153.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E.P. (1988).** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**: 348-357.
- Elcock, A.H. & McCammon, J.A. (1998).** Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **280**: 731-748.
- Farwick, M., Siewe, R.M. & Krämer, R. (1995).** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 4690-4695.
- Fletcher, S.A. & Csonka, L.N. (1998).** Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 307-317.

- Fletcher, S.A., Rhodes, D. & Csonka, L.N. (2001).** Analysis of the effects of osmoprotectants on the high osmolality-dependent induction of increased thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **18**: 345-354.
- Gadd, G.M., Chalmers, K. & Reed, R.H. (1987).** The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 249-254.
- Galinski, E.A. & Trüper, H.G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.
- Galinski, E.A. (1995).** Osmoadaptation in Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 273-328.
- Glaasker, E., Konings, W.N. & Poolman, B. (1996).** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**: 575-82.
- Gowrishankar, J. & Manna, D. (1996).** How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. *Genetica* **97**: 363-378.
- Grammann, K., Volke, A. & Kunte, H.J. (2002).** New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *J. Bacteriol.* **184**: 3078-3085.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.
- Gratzfeld-Huesgen, A. (1999).** Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysates using the Agilent 1100 series HPLC. Agilent technical note, Agilent technologies, Waldbronn, Deutschland.
- Grothe, S., Krogsrud, R.L., McLellan, D.J., Milner, J.L. & Wood, J.M. (1986).** Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **166**: 253-259.
- Hecker, M., Schumann, W. & Völker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 417-428.
- Hecker, M. & Völker, U. (2001).** General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* **44**: 35-91.

- Heide, van der, T. & Poolman, B. (2000).** Osmoregulated ABC transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7102-7106.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. & Boos, W. (1991).** Trehalose synthesis genes are controlled by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 7918-7924.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K. & Takano, H. (1990).** Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1386-1391.
- Höltje, J.V. (1998).** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 181-203.
- Hohmann, S. (1997).** Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. *In*: S. Hohmann & W.H. Mager (Herausg.), *Yeast stress responses*, S. 101-145. Springer, New York.
- Houssin, C., Eynard, N., Shechter, E. & Ghazi, A. (1991).** Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**: 76-84.
- Inoue, H., Nojime, H. & Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O.B. & Strom, A.R. (1992).** Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*. Evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J. Bacteriol.* **174**: 889-898.
- Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S.I., Mikami, K. & Murate, N. (2002).** Salt stress and Hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **290**: 339-348.
- Kappes, R.M. & Bremer, E. (1998).** Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and gamma-butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**: 83-90.
- Kappes, R.M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. & Bremer, E. (1999).** Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the

uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**: 203-216.

Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.

Kemble, A.R. & McPherson, H.T. (1954). Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem.* **58**: 46-59.

Kempf, B. & Bremer, E. (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 16701-16713.

Kempf, B. & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.

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.

Killham, K. & Firestone, M.K. (1984). Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces* indigenous to saline soils. *Appl. Environ. Microbiology* **47**: 301-306.

Klöpffer, U. (1999). Assimilation von Glutamat, Aspartat und ihrer Amide durch Pseudomonaden. Dissertation, Universität Marburg.

Ko, R., Tombras, L. & Smith, G.M. (1994). Glycine Betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **176**: 426-431.

Koch, A.L. (1983). The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microb. Physiol.* **24**: 301-366.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.

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

- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J. & Strom, A.R. (1991).** DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.
- Lamark, T., Rokenes, T.P., McDougall, J. & Strom, A.R. (1996).** The complex *bet* promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J. Bacteriol.* **178**: 1655-1662.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A. & Booth, I.R. (1999).** Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *Embo J.* **18**: 1730-1737.
- Ley, O. (2001).** Bedeutung der Prolin-Biosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1990).** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **121**: 1-10.
- Mazur, P. (1968).** Survival of fungi after freezing and dessication. In: *The Fungi*, pp. 325-394. Edited by G.C. Ainsworth & A.S. Sussman. New York: Academic Press.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T. & Epstein, W. (1994).** Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 1911-1917.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L. & Hanson, A.D. (1999).** Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120**: 945-950.
- Mellis, J., Wise, A. & Villarejo, M. (1995).** Two different *Escherichia coli proP* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J. Bacteriol.* **177**: 144-151.
- Miller, K.J., & Wood, J.M. (1996).** Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-36.
- Millner, J.L., Grothe, S. & Wood, J.M. (1988).** Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **263**: 14900-14905.

- Moe, P.C., Blount, P. & Kung, C. (1998).** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol. Microbiol.* **28**: 583-592.
- Möker, N. (2002).** Einfluss von Zwei-Komponenten-Systemen auf die Osmoregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Morbach, S. & Krämer, R. (2002).** Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *ChemBioChem.* **3**: 384-397.
- Morris, C.E. (1990).** Mechanosensitive ion channels. *J. Membrane Biol.* **113**: 93-107.
- Moses, S. (1999).** Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolin-Verwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation, Universität Marburg.
- Mullis, K., Faldoma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nolden, L. (2001).** Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Nottebrock, D. (2000).** Mechanosensitive Kanäle in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Nottebrock, D., Meyer, U., Krämer, R., & Morbach, S. (2003).** Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microb. Lett.* **218**: 305-309.
- Özcan, N. (2003).** Kälteadaptation osmoregulierter Transportsysteme in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Oren, A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 334-348.
- Peter, H. (1997).** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Peter, H., Burkovski, A. & Krämer, R. (1996).** Isolation, characterisation, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J. Bacteriol.* **178**: 5229-5234.

- Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C. & Krämer, R. (1997).** Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low affinity uptake system for compatible solutes. *Arch. Microbiol.* **168**: 143-151.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. & Morbach, S. (1998).** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing and characterization of the Proline/Ectoine uptake system, ProP and the Ectoine/Proline/Glycine betaine carrier EctP. *J. Bacteriol.* **180**: 6005-6012.
- Poolman, B. & Glaasker, E. (1998).** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**: 397-407.
- Potts, M. (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755-805.
- Read, S.M., & Northcote, D.H. (1981).** Minimization of variation in the response of different proteins to the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- Roberts, M. F. (2000).** Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front. Biosci.* **5**: 796-812.
- Rönsch, H. (2000).** Untersuchungen zum Einfluss der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Roth, W.G., Leckie, M.P. & Dietzler, D.N. (1985a).** Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 434-441.
- Roth, W G., Porter, S.E., Leckie, M.P., Porter, B.E., Dietzler, D.N. (1985b).** Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically Schocked *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 442-449.
- Rübenhagen, R., Rönsch, H., Krämer, R. & Morbach, S. (2000).** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**: 735-741.

- Rübenhagen, R., Morbach, S. & Krämer, R. (2001).** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J.* **20**: 5412-5420.
- Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R. & Ghazi, A. (1999).** Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **181**: 1673-1676.
- Sackin, H. (1995).** Mechanosensitive channels. *Annu. Re. Physiol.* **57**: 333-353.
- Saier, M.H. Jr., Eng, B.H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D.A., Hutchinson, W.J., Jack, D.L., Lai, E.C., Liu, H.J., Nusinew, D.P., Omar, A.M., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Quan, J.A., Sliwinski, M., Tseng, T.T., Wachi, S. & Young, G.B. (1999).** Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 1-56.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, USA.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H. & Pühler, A. (1990).** High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-1666.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schleyer, M., Schmid, R. & Bakker, E.P. (1993).** Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Arch. Microbiol.* **160**: 424-431.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-Lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571.
- Schuster, R. (1988)** Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated pre-column derivatization and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **431**: 271-284.

- Simon R., Priefer U. & Pühler A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technology* **1**: 784 - 791.
- Spiegelhalter, F. & Bremer, E. (1998).** Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol. Microbiol.* **29**: 285-296.
- Steger, R. (2002).** Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Sukarev, S., Betanzos, M., Chiang, C.S. & Guy, H.R. (2001).** The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* **409**: 720-724.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M.J., Booth, I.R. & Higgins, C.F. (1987).** Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.* **168**: 805-814.
- Tatzelt, J., Prusiner, S.B. & Welch, W.J. (1996).** Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo J.* **15**: 6363-6373.
- Varela, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M. & Stephanopoulos, G. (2002).** Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 547-555.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. & Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 504-544.
- Welsh, D.T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 263-290.
- Whatmore, A.M., Chudek, J.A. & Reed, R.H. (1990).** The effects of osmotic shock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2527-2535.
- Wolf, A. (2002).** Trehalosesynthese in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Wolf, A., Krämer, R. & Morbach, S. (2003).** Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **49**: 1119-1134.

Wood, J.M. (1988). Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J. Memb. Biol.* **106**: 183-202.

Wood, J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.

Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Krämer, R., Poolman, B., van der Heide, T. & Smith, L.T. (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* **130**: 437-460.

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. & Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Leuten bedanken, die stets für mich da waren bzw. sind und mir Hilfe geleistet haben, wo immer sie nötig war.

Herrn Prof. Dr. R Krämer danke ich für die gesamte Zeit, beginnend im Studium, als mich schon seine Vorlesung fasziniert hat, bis zum Ende dieser Arbeit sowie die engagierte und konstruktive Zusammenarbeit an allen Themenbereichen um Transportprozesse und Mikroorganismen im allgemeinen und speziellen.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Langer bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats trotz akuten Zeitmangels und die sehr freundliche Atmosphäre.

Bei Susanne Morbach möchte ich mich sehr für die Einweisung in molekularbiologische Zusammenhänge und ein tolles Arbeitsklima in der 'Osmogruppe' bedanken.

Die Osmogruppe: Johannes Botzenhardt, Jorge Carpinelli, Henrike Gebhardt, Eva Glees, Oliver Ley, Ute Meyer, Nina Möker, Nuran Özcan, Dirk Schiller und die 'Ehemaligen' Udo Burger, Hendrik Rönsch, René Rübenhagen, Ralf Steger und Andreas Wolf haben durch lustige und intensive Zusammenarbeit die Laborzeit angenehm gemacht. Auch den Kollegen der anderen Arbeitsgruppen danke ich für übergreifende und sachdienliche Diskussionen und Hilfestellungen. An auswärtiger Unterstützung danke ich Takeru Ishige und Volker Wendisch vom Forschungszentrum Jülich für die Arbeit an den DNA-*Microarrays*.

Besonders danken möchte ich:

Eva Glees, die mir bei der Erstellung der Western Blots sehr stark unter die Arme gegriffen hat,

Ute Meyer für die tolle Unterstützung bei den Mutantenkonstruktionen,

Gabi Sitek, der guten Seele des Hauses, die immer ein offenes Ohr hatte und viele Gespräche außerhalb und innerhalb der Arbeit ermöglichte ,

Kince Benova für 'gute Laune pur' und viele nette Gespräche,

Arthur Reuter für interessante Fachgespräche zum Thema 'Computer',

Johannes Botzenhardt für die absolut kollegiale Arbeit im gemeinsamen Labor,

Rolf Hecker für eine Freundschaft, die weit über die Betreuung der Diplomarbeit hinausgeht,

Lothar Samel, der mich, wie auch ich ihn, wieder auf die Beine gestellt hat, als es notwendig war,

Horst Kals und Kerstin Ziegler, die mir stets die treuesten Freunde sind,

Stephan Weinand und Andrea Marchis, dem besten Bruder und der besten Schwägerin der Welt,

meinen zwei Familien (Weinand, Urbach), die mir zu allen Zeiten den Rücken gestärkt haben und auch sonst für mich da sind,

meinen gesamten Freunden und Bekannten, die hier aufzuzählen den Rahmen sprengen würde, die vollständig hinter und bei mir stehen und mein Leben für mich perfekt machen,

und nicht zuletzt meinem Schatz und Heiligtum Caro, die eine überirdische Energie und Kraft aufbringt, um mich zu unterstützen und mir der Beistand ist, den ein Naturwissenschaftler und Freigeist braucht.

Danke Euch allen!

Erklärung

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

Keine Teilpublikationen

Datum:

Unterschrift: