

**Cytomics: Strategien von *Cupriavidus necator* JMP134
beim Umgang mit dem toxischen Substrat Phenol**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftliche Fakultät I
(Institut für Biologie)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Claudia Wiacek

geb. am: 13.08.1976 in: Wolfen

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. M. Schlömann
3. Prof. Dr. H. Harms

Tag der Verteidigung: 19.03.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011902

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011902>]

*Es sind nicht nur unsere Fähigkeiten die zeigen wer wir sind,
sondern unsere Entscheidungen.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zellantworten auf toxische aromatische Substanzen	1
1.1.1	aktive Adaptationsmechanismen	2
1.1.2	passive Adaptationsmechanismen	5
1.2	individuelle Zell- und Populationsantworten	7
1.2.1	Populationsheterogenität	7
1.2.2	Der bakterielle Zellzyklus	8
1.3	Die Analyse von Zellantworten	10
1.3.1	Proteomanalyse	10
1.3.2	Flowzytometrie	11
1.4	Der Modellorganismus <i>Cupriavidus necator</i> JMP134	15
1.4.1	Phenolmetabolismus	15
1.4.2	PHB-Synthese	16
1.4.3	Phenolassilationswege und PHB-Synthese	17
1.4.4	DNA-Synthese	18
1.5	Aufgabenstellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Mikroorganismen und Kultivierung	20
2.1.1	Nährlösungen	20
2.1.2	<i>Batch</i> -Kultivierung	20
2.1.3	Kontinuierliche-Kultivierung im Chemostat	21
2.1.4	Kontinuierliche-Kultivierung im pH-Auxostat	21
2.2.	Bestimmung der Biomassekonzentration	22
2.3	Substrat- und Produktbestimmung	22
2.3.1	Phenol	22
2.3.2	Ammoniumstickstoff	22
2.3.3	Hydroxymuconsäure-Semialdehyd	22
2.3.4	Polyhydroxybutyrat (PHB)	23
2.4	Proteomanalyse	24
2.4.1	Zellaufschluss	24

2.4.2	Proteinbestimmung	24
2.4.3	Trennung und Nachweis von Proteinen	25
2.4.3.1	Isoelektrische Fokkusierung (IEF)	25
2.4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	27
2.4.3.3	Proteinfärbungen und Entfärbung	28
2.4.3.4	Gelkonservierung	29
2.4.4	Auswertung der Proteinmuster	29
2.4.5.	Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie	30
2.5	Flowzytometrie	33
2.5.1	Zellernte und Zellfixierung	33
2.5.2	Färbungen	33
2.5.3	Flowzytometrische Messung	33
2.5.4	Auswertung der Messdaten	34
2.5.5	Sortieren von Zellen	34
2.5.6	Mikroskopie	35
2.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten	35
2.6.1	Zellaufschluss	35
2.6.2	Aktivitätsbestimmungen	35
2.6.2.1	Citrat-Synthase	35
2.6.2.2	Isocitrat-Lyase	36
2.6.2.3	Malat-Synthase	36
2.7	Chemikalien	37
3	Ergebnisse	37
3.1	Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten	37
3.1.1	Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten beim kontinuierlichen Wachstum im Chemostat	37
3.1.2	Wachstumsparameter beim kontinuierlichen Wachstum im pH-Auxostat	42
3.2	Proteomanalyse der Gesamtpopulation - Proteomdynamik beim Wachstum auf Phenol	45
3.2.1	Exprimierte Proteine beim Phenolmetabolismus via <i>ortho</i> -Weg	45
3.2.2	Exprimierte Proteine beim Phenolmetabolismus via <i>ortho</i> - und <i>meta</i> -Weg	51
3.2.3	Proteinexpression in Abhängigkeit der Phenolkonzentration: Vergleich Chemostat-pH-Auxostat	56

3.3	Flowzytometrische Charakterisierung - Populationsdynamik beim Wachstum auf Phenol	61
3.3.1	Populationsdynamik während der <i>Batch</i> -Kultivierung	62
3.3.2	Populationsdynamik während der Chemostat-Kultivierung	65
3.3.3	Populationsdynamik während der pH-Auxostat-Kultivierung	67
3.3.4	Populationsdynamik während der <i>Batch</i> -Rekultivierung	71
3.4	Proteomanalyse der Subpopulationen	74
3.4.1	Einfluss von Zellfixierung, Zellfärbung, Lagerung und Zellrückgewinnung auf die Proteomanalyse	74
3.4.2	Analyse der Subproteome	81
4	Diskussion	86
4.1	Adaptionsmechanismen auf Populationsebene	86
4.1.1	Die Entgiftung von Phenol: Wachstum <i>versus</i> PHB-Synthese	86
4.1.2	molekulare Analyse der globalen Adaptionsmechanismen	88
4.1.2.1	Identifizierte aktive Mechanismen	89
4.1.2.2	Identifizierte passive Mechanismen	94
4.2	Adaptionsmechanismen auf Subpopulationsebene	97
4.2.1	DNA-Sicherungsmodus und PHB-Synthese bei nicht toxischen Phenolkonzentrationen	98
4.2.2	DNA-Sicherungsmodus und PHB-Synthese bei toxischen Phenolkonzentrationen	100
4.2.3	molekulare Charakterisierung der Subpopulationen	103
5	Zusammenfassung	105
6	Literatur	107
7	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BTS	Biomassetrockensubstanz
C_0	Ausgangskonzentration
C_R	Substratrestkonzentration
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfonat
CoA	Coenzym A
CV	<i>Coefficient of variation</i>
d	Durchmesser/ Schichtdicke der Küvette
D	Durchflussrate
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCE	Dichlorethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ESI	Elektrospray Ionisierung
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid
FSC	<i>Forward Side Scatter</i>
GC	Gas Chromatographie
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
g	Erdbeschleunigung oder Generationszeit [h]
HMS	Hydroxymuconsäure-Semialdehyd
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokkusierung
IMP	Inosinmonophosphat
IPG	<i>immobilized pH Gradient</i>
kDa	Kilodalton
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
m.I.	<i>mean Intensity</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NAD(P)/ NAD(P)H	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (Phosphat)

OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Polyhydroxybuttersäure
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
q_p	spezifische Produktbildungsrate [$g_{PHB}/g_{Substrat} \cdot h$]
q_s	spezifische Substratverbrauchsrate [$g_{BTS}/g_{Substrat} \cdot h$]
rel. F.	<i>relative Fluorescence</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>Side Scatter</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
TEMED	N,N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität [$\mu\text{mol Substratumsatz}/\text{min}$]
v/v	<i>volume per volume</i>
V	Volt
Vh	Volt Stunden
w/v	<i>weight/volume</i>
μ	Wachstumsgeschwindigkeit [h]
ε	Extinktionskoeffizient

1 Einleitung

Ein breites Spektrum an Chemikalien hat auf Grund industrieller Aktivitäten, landwirtschaftlichen Einsatzes und deren häuslichen Gebrauches, ihren Weg ins Ökosystem gefunden. Viele dieser Substanzen stellen für die Umwelt eine erhebliche Belastung dar.

Phenol und seine Derivate (z. B. Nitro-, und Chlorphenole) gehören nach der *priority pollutants list* der U.S. EPA zu den *priority pollutants* [U.S. EPA 1996]. Phenole sind die charakteristischen Schadstoffe in Abwässern aus der Petrochemie, Textilindustrie, Pharmazie und Gerbereien sowie aus der Kohlevergasung [Swoboda-Colberg 1995]. Obwohl phenolische Verbindungen auch in Pflanzen vorkommen, und sie so einem natürlichen *turnover* unterliegen, sind sie zu einem ernstem Problem geworden, seitdem der Mensch in großem Maßstab zu ihrer Entstehung und Freisetzung beiträgt und so die Balance von Bildung und Abbau verändert. Da diese Substanzen schon in kleinen Konzentrationen toxisch sein können, ist eine Behandlung belasteter Wässer und damit kontaminierter Böden erforderlich. Mikroorganismen können ein breites Spektrum dieser Substanzen metabolisieren oder sogar mineralisieren und bieten daher eine attraktive Alternative zu den etablierten physikalischen oder chemischen Verfahren.

Obwohl viele Mikroorganismen in der Lage sind, Phenole metabolisch oder cometabolisch abzubauen, sind diese Stoffe auch für sie toxisch. Sie führen zur Inhibierung verschiedener Zellprozesse [Sikkema et al. 1995, Segura et al. 1999, Ramos et. al 2002] und gegebenenfalls zum Tod. Mikroorganismen verfügen jedoch über diverse Adaptationsmechanismen, die ein Überleben nach Einwirkung dieser toxischen Substanzen ermöglichen. Die Kenntnis dieser Mechanismen bietet Lösungsansätze zur Erweiterung der Leistungsgrenzen von Schadstoffabbauern, was eine Optimierung von biologischen Sanierungsprozessen unterstützt.

1.1 Zellantworten auf toxische aromatische Substanzen

Die Zellantworten auf einen Stressor, wie z. B. Phenol, können auf unterschiedlichen Hierarchieebenen analysiert werden. Eine übergeordnete Funktion übernimmt das Cytom, das alle, eine Zelle betreffende, Vorgänge untersucht. Es vereinigt die Erkenntnisse aus Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolomuntersuchungen und untersucht deren Dynamik. Das Konzept von Cytomics [Valet et al. 2004] ist nicht nur aufschlussreich im Bezug auf höhere Organismen, sondern gewinnt zunehmend auf dem Gebiet der Mikrobiologie an Bedeutung, da die Akzeptanz, dass

Bakterienzellen sich ähnlich wie eukaryotische Pflanzen-, Tier- oder Säugetierzellen als Individuen verhalten, zunimmt.

Unabhängig von den Hierarchieebenen können die Strategien, die von Mikroorganismen angewandt werden, um sich vor toxischen aromatischen Substanzen zu schützen, vielfältig sein. Man kann dabei zwischen aktiven und passiven Mechanismen unterscheiden. Während sich aktive Mechanismen direkt mit dem Stressor auseinandersetzen, richten sich passive Mechanismen nicht gegen den ursächlichen Stressor, sondern reparieren durch ihn entstandene Schäden.

1.1.1 aktive Adaptationsmechanismen

i) Der produktive Abbau

Der produktive Abbau von toxischen aromatischen Substraten ist ein aktiver Adaptionsmechanismus [Benndorf 2000], da er eine Möglichkeit der Detoxifizierung von für Zellen giftigen Substanzen darstellt. Der Abbau, oder zumindest eine Umwandlung in einen für die Zelle weniger toxischen Stoff, sorgt unmittelbar für eine Abnahme der Konzentration des Stressors. Die meisten degradativen Enzyme sind jedoch nicht konstitutiv vorhanden, sondern werden erst in Gegenwart der Substanz induziert.

Viele Mikroorganismen, wie Bakterien [Bayly und Wigmore 1973, Gurujeyalakshmi et al. 1989, Rahalkar et al. 1993, Yap et al. 1999, Che et al. 2004], Hefen [Santos und Linardi 2001, Fialova et al. 2004] und Algen [Semple und Cain 1996] sind in der Lage Phenol oder dessen Derivate abzubauen. Die dazu genutzten Abbauewege sind seit langem bekannt [Ornston und Stanier 1966a, b, Johnson und Stanier 1971, Harwood et al. 1999]. Der charakteristischste von Bakterien und Hefen genutzte Weg der Phenolassimilation ist die Hydroxylierung des Phenols zu Catechol und die anschließende Ringöffnung via *ortho*- oder *meta*-Spaltung (Abb. 1). Beiden Wegen gemein ist die vorgeschaltete Hydroxylierung des Phenols durch eine Monooxygenase, der Phenolhydroxylase. Sie unterscheiden sich jedoch im nächsten Abbauschritt. Im *ortho*-Weg erfolgt die Ringspaltung intradiol und *cis, cis*-Muconat entsteht, welches über 3-Oxo adipat abgebaut wird und durch eine CoA-Transferase aktiviert und in Succinat und Acetyl-CoA gespalten wird. Im *meta*-Weg erfolgt die Ringspaltung extradiol zwischen einem hydroxylierten und einem nicht hydroxylierten C-Atom. Als Spaltprodukt entsteht 2-Hydroxymuconsäure-Semialdehyd. Dieses kann entweder durch die Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Hydrolase, unter Abspaltung von Formiat zu Oxopent-4-enoat umgesetzt, oder durch die Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase über Oxalacrylat und Oxopent-4-enoat zu den Intermediaten Pyruvat und Acetaldehyd abgebaut werden.

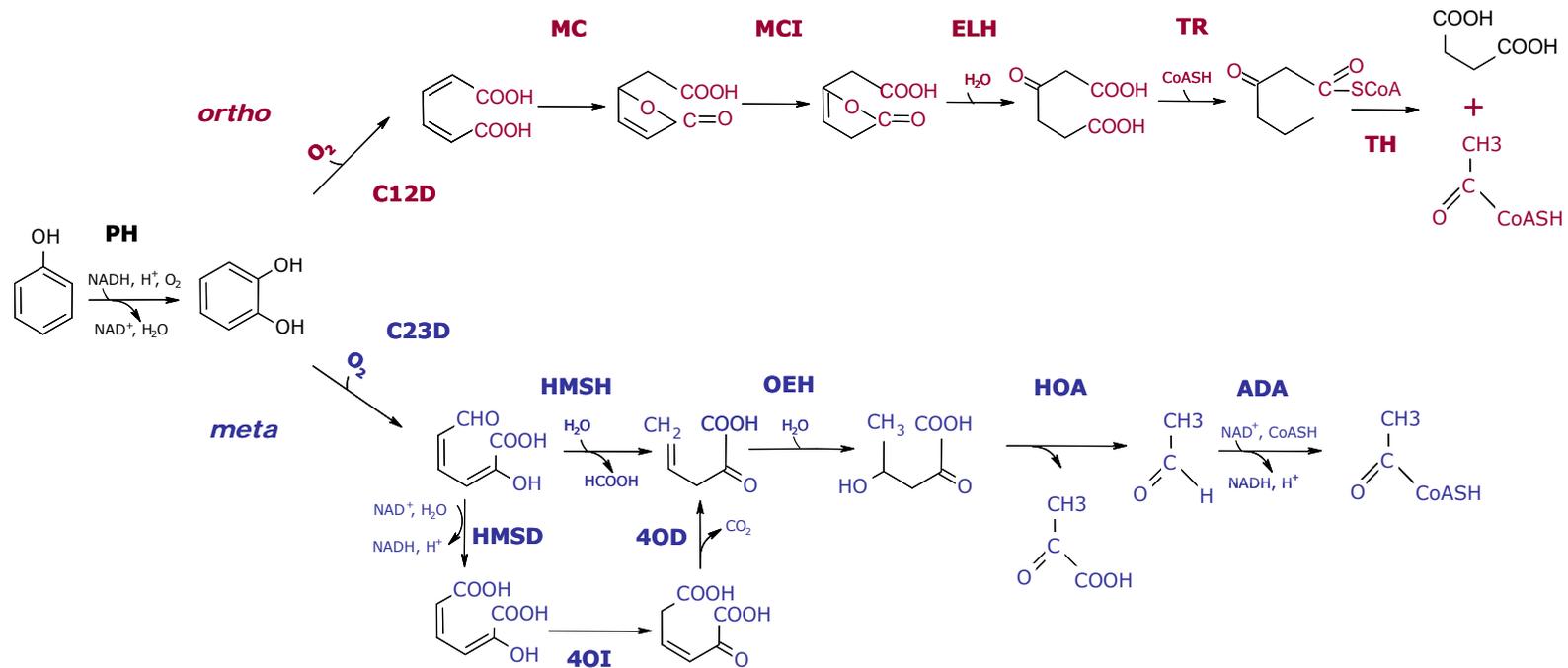


Abb. 1: Phenolassimilationswege in Mikroorganismen, PH: Phenolhydroxylase, **ortho-Weg** C12D: Catechol-1,2-Dioxygenase, MC: Muconat lactonisierendes Enzym, MCI: Muconolacton-Isomerase, ELH: Oxadipat-Enollacton-Hydrolase, TR: Oxadipat-Succinyl-CoA-Transferase, TH: Oxadipat-CoA-Thiolase. **meta-Weg** C23D: Catechol-2,3-Dioxygenase, HMSH: Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Hydrolase, HMSD: Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase, 4OI: 4-Oxalcrotonat-Isomerase, 4OD: 4-Oxalcrotonat-Decarboxylase, OEH: 2-Oxopent-4-Enoat-Hydratase, HOA: 4-Hydroxy-2-Ketovalerat-Aldolase, ADA: Acetaldehyd-Dehydrogenase [nach Johnson und Stanier 1971, Arai et al. 2000].

Das entstandene Acetaldehyd wird anschließend durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase und CoA zu Acetyl-CoA umgesetzt. Die Intermediate beider Abbauewege können anschließend für Wachstum und Vermehrung genutzt werden.

ii) Induktion von Efflux-Pumpen

Die Induktion von Efflux-Pumpen stellt ebenfalls einen aktiven Adaptionsmechanismus dar, mit dem Bakterien ihre Toleranz gegenüber toxischen aromatischen Substanzen erhöhen können [Fukumori et al. 1998, Li et al. 1998, Ramos et al. 2002]. Die *multidrug resistance* (MDR) Efflux-Pumpen katalysieren u.a. aktiv die Extrusion aromatischer Substanzen vom Cytoplasma oder Periplasma aus der Zelle heraus ins umgebende Medium. Alle bisher in Gram-negativen Bakterien identifizierten Efflux-Pumpen gehören zur RND (*resistance-nodulation-cell division*) Familie [Ramos et al. 2002], welche den MDR Efflux-Pumpen zugeordnet werden, und transportieren die Substanzen durch beide Membranen in einem einzigen energiegekoppelten Schritt [Koronakis et al. 2000]. Die Expression solcher Pumpen (z.B. SrpABC, TtgABC, TtgDEF, MexAB-OrpM) wurde u.a. in verschiedenen Toluol- und *p*-Xylen-toleranten *Pseudomonas* sp. detektiert [Kieboom et al. 1998, Rojas et al. 2001, Ramos et al. 2002, Segura et al. 2005].

iii) Synthese von Speicherstoffen

Die Deponierung von Phenolkohlenstoff in Speicherstoffe, wie PHB (Polyhydroxybutyrat), kann im weitesten Sinne als ein aktiver Mechanismus betrachtet werden, da die Umwandlung des toxischen Substrates in ein untoxisches, dessen Konzentration reduziert. Eine solche Reaktion wurde von Leonard und Lindley [1998] in *Ralstonia eutropha* 335 beobachtet.

PHB gehört zu der Klasse der PHA's (Polyhydroxyalkanoate), mikrobiell erzeugte Homo- oder Copolymere aus β -Hydroxyfettsäuren. Neben diesen gibt es noch weitere Lipide wie Triglyceride und Wachse, die ebenfalls als intrazelluläre Speicherstoffe in Prokaryoten synthetisiert werden. Die Bildung von Speicherstoffen dient jedoch nicht nur der Deponierung toxischer Substanzen, primär dienen sie in „Hungerphasen“ der Zelle als Energie- und Kohlenstoffspeicher. Speicherstoffe sind keine essentiellen, konstitutiven Komponenten in Bakterien und werden nicht unter allen Umständen gebildet. Ihre Bildung erfolgt vorwiegend bei Defiziten in der Nährstoffversorgung (Stickstoff, Phosphor, Sauerstoff), während gleichzeitig ein Überangebot an Kohlenstoff vorliegt [Anderson und Dawes 1990, Sudesh 2000, Babel et al. 2001]. Bei dieser, als nicht-wachstumsassoziiert bezeichneter Speicherstoffsynthese, können z.B. bis zu 96% des Trockengewichtes der Zellen aus PHB bestehen [Steinbüchel 1996]. In Hungerphasen wird PHB durch abbauende Enzymsysteme zu Monomeren

und weiter zu Acetyl-CoA abgebaut, welches wieder in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Der durch den PHB-Abbau verhinderte oder verzögerte Abbau anderer essentieller Makromoleküle (Proteine, Nucleinsäuren) sichert so das Überleben der Zellen [Anderson und Dawes 1990, Steinbüchel 1996]. Bakterien, die PHAs als Reservestoffe bilden, sind in der Lage ungünstige Umweltbedingungen besser zu überstehen, als Vertreter, die dazu nicht befähigt sind [James 1999, Handrick et al. 2000, Sudesh et al. 2000, Ruiz 2001, Kadouri et al. 2003]. Eine weitere physiologische Bedeutung haben PHAs außerdem bei der Bildung von Sporen in *Bacillus* sp. [Law und Slepecky 1961] und Cysten in *Azotobacter* sp. [Kim und Lenz 2001], sowie als Senke für Reduktionsäquivalente [Babel et al. 2001].

1.1.2 passive Adaptationsmechanismen

i) Veränderungen in den Zellmembranen

Der erste Kontaktpunkt aromatischer Stoffe sind die Membranen der Zelle. So beeinflusst das hydrophobe Phenol die Integrität und Funktionalität der Zellmembran, da es dort auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften Wechselwirkungen mit den biologischen Strukturen eingeht [Davidson und Branen 1981, Heipieper et al. 1991]. Das hat die Aufhebung der Barrierefunktion der Lipidmembranen [de Smet et al. 1978, Sikkema et al. 1995] zur Folge. Durch verschiedene passive Adaptationsmechanismen können Bakterien ihre Toleranz gegenüber solchen Stoffen erhöhen. Dazu gehören zum einen die Veränderung der Zusammensetzung der Fettsäuren in der cytoplasmatischen und äußeren Membran, und zum anderen die Veränderung des Sättigungsgrades der Fettsäuren. Durch diese Änderungen wird der Einfluss der Lösungsmittel auf die Membranstabilität vermindert, da deren Diffusion in die Membranen limitiert wird [Ramos et al. 2002].

Die *cis-trans*-Isomerisierung von ungesättigten Fettsäuren durch die im Periplasma lokalisierte *cis-trans*-Isomerase wird z.B. als Kurzzeit-Antwort der Zellen auf organische Lösungsmittel angesehen und kann auch unter Nicht-Wachstumsbedingungen stattfinden. Sie wurde u. a. bei verschiedenen *Pseudomonas putida* Stämmen als Reaktion auf Phenol und 4-Chlorphenol beobachtet [Keweloh et al. 1990, Heipieper et al. 1992]. Die Änderung des Sättigungsgrades der Fettsäuren hingegen wird als Langzeit-Antwort angesehen, da diese nur bei wachsenden Zellen erfolgen kann [Härtig et al. 1999, Kabelitz et al. 2003].

ii) Stressantworten auf Proteinebene

Die durch Phenol und dessen Derivate ausgelösten Reaktionen auf Proteinebene können sehr vielfältig sein. Neben den bereits diskutierten Abbauenzymen und Transportern, wurde häufig eine Induktion oder verstärkte Expression von Proteinen

der Hitzeschockantwort und des oxidativen Stresses [VanBogelen et al. 1987, Benndorf et al. 2001, Santos et al. 2004, Tam et al. 2006] beobachtet. Die Induktion von Hitzeschockproteinen ist vermutlich das Ergebnis der, durch die lipophilen Eigenschaften des Phenols ausgelösten, Erhöhung der Membranfluidität. Diese wird auch durch Wärme auslöst, und als Signal für die Induktion von Hitzeschockproteinen angesehen [Mejia et al. 1995, Vigh et al. 1998]. Zu den wichtigsten Hitzeschockproteinen gehören neben den molekularen Chaperonen, welche die Proteinfaltung durch Stabilisierung un- oder teilweise gefalteter Proteine unterstützen, auch ATP-abhängige Proteasen, welche irreversibel falsch gefaltete Proteine abbauen [Schumann 1994].

Die Induktion oxidativer Stressproteine wird durch die Exposition der Bakterien mit reaktiven Sauerstoffintermediaten beobachtet. Diese sind nicht nur Nebenprodukte der Atmung, sondern entstehen auch bei der Konfrontation von Zellen mit Catechol. Während des Wachstums auf Phenol wird Catechol als erstes Zwischenprodukt gebildet, und kann sich im Wachstumsmedium anreichern [Paller et al. 1995]. Der Mechanismus des Redoxcycling an der Atmungskette [Kappus und Sies 1981] kann zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und zu einer Schädigung von Proteinen, Nukleinsäuren und Zellmembranen führen [Tamarit et al. 1998]. Superoxid-Anionenradikale schädigen z. B. die [4Fe-4S]-Cluster von Fumarase A und B sowie von Aconitase (Enzyme des Citrazyklus), und verursachen die Freisetzung von Eisenionen aus den geschädigten Dehydratase [Iuchi und Weiner 1996]. Die Zellen exprimieren konstitutive Enzyme, die diese reaktiven Sauerstoffradikale entgiften. Zusätzlich besitzen bakterielle-, aber auch tierische- und Säugetierzellen eine „*adaptive response*“. Neben detoxifizierenden Enzymen, die wichtigsten sind Katalase, Superoxiddismutase und Alkylhydroperoxidreduktase, werden auch gegenüber Sauerstoffradikalen sensitive Enzyme durch stabilere Isoenzyme ersetzt (z.B. Fumarase [Liochev und Fridovich 1992]). Die Gene für die oxidative Stressantwort sind in dem Bakterium *E. coli* in mehreren Regulons, wie z.B. SoxRS und OxyR organisiert [Stolz und Imlay 1999], und kontrollieren dabei die Expression einer Vielzahl von Genen oder Operons (z.B. Mangansuperoxid-Dismutase, NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase, Nitroreduktase (*nfsA*), Fumarase C (*fumC*), Aconitase (*acnA*), *outer-membrane-protein* (*tolC*) [Pomposiello et al. 2001].

Weitere, als Reaktion auf die Konfrontation beobachtete Mechanismen, sind die verstärkte Induktion von Enzymen des Aminosäuremetabolismus bzw. Aminosäure-Transporten, welche als Hinweis dafür gesehen werden, dass die Zellen versuchen zusätzliche Substratquellen zu erschließen [Santos et al. 2004, Kurbatov et al. 2006].

Die Diversität der beobachteten Mechanismen zeigt die Mannigfaltigkeit der zellulären Abwehrmechanismen, welche von Bakterien als Reaktion auf aromatische Substanzen induziert werden.

1.2 individuelle Zell- und Populationsantworten

Veränderungen im Zellwachstum und der Vermehrung geben den deutlichsten Hinweis darauf, dass Bakterien Stresssituationen ausgesetzt sind. Bakterielle Stressantworten korrelieren häufig unmittelbar mit diesen Parametern [Benndorf 2000, Krayl et al. 2003, Benndorf et al. 2006]. Die Untersuchungen, traditionell auf nicht segregierter Populationsebene (z. B. durch Analyse der Kulturflüssigkeit) durchgeführt, geben hierbei Auskunft über den physiologischen Zustand der Population und deren Reaktion auf wechselnde Umweltbedingungen. Nicht alle Organismen einer Population verhalten sich jedoch gleich. So beobachtet man häufig bei oligotroph wachsenden marinen Populationen die Strategie, nur einen Teil der Zellen zur Synthese zu befähigen, während sich andere Individuen der Population im Ruhestand befinden [Kjelleberg et al. 1987]. Noch weiter gehen die Beobachtungen von Aizenmann et al. [1996]. Sie untersuchten *E. coli* unter Hungerstress und beschrieben, dass im Zuge des programmierten Zelltodes ein Teil der Population starb und somit das Überleben des anderen Teils durch Bereitstellung von Kohlenstoff und Energie sicherte.

Diese Beispiele zeigen, dass unterschiedliche Adaptationsmechanismen auf Populationsebene existieren. Da sich üblicherweise nicht alle Zellen einer Population im gleichen physiologischen oder metabolischen Zustand befinden, ist es leicht vorstellbar, dass diese auch unterschiedlich auf Stress reagieren.

1.2.1 Populationsheterogenität

Bakterienpopulationen sind, ähnlich wie eukaryotische, tierische oder menschliche Zellpopulationen, heterogen und sollten daher individuell betrachtet werden. Die Heterogenität einer mikrobiellen Population kann unterschiedlichen Ursprungs sein.

- i) genetischen Ursprungs: resultierend aus spontanen Punktmutationen [Dahlberg et al. 1998] oder dem Verlust von mobilen Elementen, wie Plasmiden oder Transposons [Bridson und Gould 2000]
- ii) aus dem Zellzyklus resultierende Unterschiede [Cooper 1991]
- iii) physiologischen Ursprungs: resultieren z.B. aus unterschiedlichem Nährstoffangebot. So sind Zellen im Zentrum einer Kolonie auf einer Agarplatte im Vergleich zu Zellen am äußeren Rand der Kolonie unterschiedlichen lokalen Nährstoffkonzentrationen ausgesetzt. Ein

anderes Beispiel sind Zellen, die innerhalb eines Fermenters lokalen Nährstoffunterschieden ausgesetzt sind [Schweder et al. 1999].

Die Eigenschaften einer Population werden durch die Eigenschaften ihrer Individuen bestimmt. Diese differenzieren sich hinsichtlich ihrer Morphologie als auch ihrer DNA- und RNA-Gehalte, sowie einer großen Anzahl weiterer Parameter. Diese Vielfalt bestimmt letztendlich die Gesamteigenschaften der Population.

Die Heterogenität einer Population hat weitreichende Auswirkungen auf ihre Leistungen, z.B. bei Antibiotika- oder Biozid-Resistenzen [Baptista et al. 1999, Suller und Lloyd 1999, Turner et al. 2000], bei der Produktivität oder Stabilität industrieller Fermentationen [Hewitt et al. 1998, Powell et al. 2000, Schuster et al. 2000, Sumner und Avery 2002], bei der Effizienz von Verfahren der Lebensmittelherstellung und Konservierung [Müller et al. 2001, Arneborg et al. 2000, Steels et al. 2000] und dem Potential pathogener Keime [Davey und O´Toole 2000]. In den letzten Jahren wurde die Heterogenität von Populationen auch im Hinblick auf lebende, aber nicht kultivierbare Zellen oder der Persistenz von Bakterien in der stationären Phase diskutiert [Kaprelyants et al. 1993, Blokpoel et al. 2005].

Wenn ein Verfahren (unabhängig ob Sanierungsverfahren oder Produktsynthese) optimiert werden soll, so ist es deshalb hilfreich, die Heterogenität der Population zu berücksichtigen und zu analysieren. Mit der Detektion von Einzelzellen können spezielle metabolische Fähigkeiten einem bestimmten Zellzustand zugeordnet werden und entsprechende Steuerungsstrategien zur Optimierung eines Verfahrens entwickelt werden.

1.2.2 Der bakterielle Zellzyklus

Ein wichtiger Bestandteil für die Optimierung eines (Sanierungs)Verfahrens ist die Kenntnis über das Wachstumsverhalten eines Organismus, da Wachstum und Vermehrung gleichzeitig mit dem Abbau des Schadstoffes korrelieren. Die Proliferationsaktivität gibt hierbei Auskunft über die Vitalität einer Population. Jede Spezies hat ein spezifisches Proliferationsmuster (DNA-Verteilung), mit dessen Hilfe die Aktivität der Zellen eingeschätzt werden kann. Um diese Muster deuten zu können, muss zunächst einmal das Zellzyklusverhalten des Stammes untersucht werden.

eukaryotic like

Die Entwicklung fluoreszierender, spezifisch an DNA bindender Farbstoffe (Bsp. siehe Tab. 1) ermöglichte es zuerst mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und später mittels Flowzytometrie den Zellzyklus von Mikroorganismen zu untersuchen. Der

Lebenszyklus bakterieller Zellen wird, wie der eukaryotische, in unterschiedliche Phasen eingeteilt. Der bakterielle Zellzyklus lässt sich in drei Phasen unterteilen: B-, C- und D-Phase [Cooper 1991], wobei neuere Erkenntnisse vermuten lassen, dass es zwischen C- und D-Phase noch eine *gap*-Phase, die so genannte preD-Phase, gibt [Cooper 1991, Müller 2002].

Die **B-Phase** des bakteriellen Zellzykluses ist gekennzeichnet durch Zellwachstum und Synthese der für die Replikation notwendigen Enzyme [Cooper 1991]. Bakterienzellen benötigen eine kritische Masse bevor sie mit der Replikation starten können [Messer 2002]. Diese kritische Masse verhält sich dabei relativ zur Anzahl der *oriC*. Die Länge der B-Phase ist variabel und hängt von der Wachstumsrate ab. Bei hohen Wachstumsraten kann sie sehr kurz oder gar nicht vorhanden sein. Verglichen mit dem eukaryotischen Zellzyklus korreliert die B-Phase mit der G_1 -Phase.

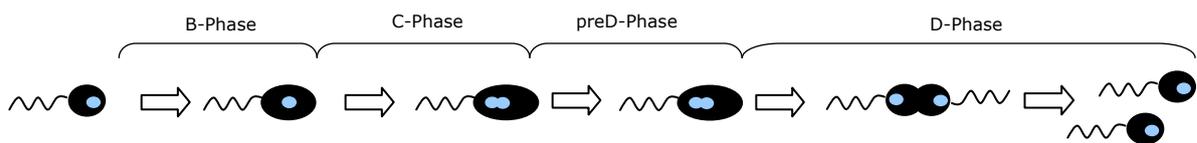


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen in Bakterien.

In der nachfolgenden **C-Phase** findet die DNA-Replikation statt. Die dazu benötigte Zeit hängt allein von der Genomgröße ab und ist konstant. Die Replikation startet mit der Bindung des Initiatorproteins DnaA (DnaA-ATP-Komplex) am Initiierungspunkt *oriC* und verläuft bidirektional entlang des Chromosoms. Einmal gestartet verläuft die Replikation mit einer konstanten Rate, bis sich die beiden Replikationsgabeln am Terminus *terC* treffen. Die Bakterien schützen sich vor einer vorzeitigen Reinitiation der Replikation durch verschiedene Mechanismen:

- i) Inaktivierung des aktiven DnaA-ATP Komplexes in den inaktiven DnaA-ADP-Komplex [Messer 2002, Kurokawa et al. 1999]
- ii) Sequestration des neu replizierten, hemimethylierten *oriC* durch das Protein SeqA [Odgen et al. 1988, Torheim und Skarstad 1999]
- iii) Senkung der Konzentration an freiem DnaA [Messer 2002].

Nach abgeschlossener Replikation folgt die **preD-Phase**, die wie die B-Phase eine Art Zwischenstop (*gap*-Phase) darstellt, bei dem zusätzlich benötigte Zellkomponenten

(cytosolische Proteine oder Ribosomen) synthetisiert werden. Diese Phase ist, wie die B-Phase, variabel in ihrer Länge und kann ebenfalls sehr kurz oder gar nicht vorhanden sein.

In der **D-Phase** erfolgt neben der Separation der Nucleotide und deren Transport in die Tochterzelle auch die Zellteilung. Die Zellteilung beginnt nicht bevor Replikation und Separation der DNA-Moleküle abgeschlossen sind [Errington et al. 2003]. Nach dem Separieren der Chromosomen werden diese durch einen aktiven Prozess zu den gegenüberliegenden Polen der Zelle transportiert [Errington et al. 2003]. Die Zellteilung erfolgt durch Septumbildung. Der Ort wird durch die Assoziation des Replikationsapparates mit der Membran festgelegt. Die tubulin-ähnliche Struktur des aus FtsZ Proteinen bestehenden Komplexes übernimmt eine Art Zytoskelett-Funktion. Die D-Phase ist eine konstante stammspezifische Größe.

entkoppelte DNA-Synthese

Im Gegensatz zu Eukaryoten können Bakterien unter unlimitierten Wachstumsbedingungen ihre DNA in einer vom Zellzyklus entkoppelten Art und Weise synthetisieren. Dies wurde zuerst für *E. coli* beschrieben [Helmstetter 1967], konnte aber auch unter bestimmten Wachstumsbedingungen bei anderen Spezies beobachtet werden [Müller et al. 1999, Müller und Babel 2003]. Bei der vom Zellzyklus entkoppelten DNA-Synthese wird die Replikation am *oriC* erneut initiiert, bevor die Zellteilung der vorangegangenen abgeschlossen ist.

1.3 Die Analyse von Zellantworten

1.3.1 Proteomanalyse

Die Expression von Genen als Antwort auf sich verändernde Umweltbedingungen kann sowohl mit Hilfe der Quantifizierung der entsprechenden mRNA, als auch entsprechender Proteine analysiert werden. Die Analyse von Proteinen bietet gegenüber der mRNA Analyse u.a. den Vorteil posttranslationale Modifikationen identifizieren zu können. Somit stellt die Proteomanalyse eine wichtige Ergänzung zur Genom- und Transkriptomanalyse dar, denn das komplexe Netzwerk der Zellregulation lässt sich nicht allein durch die Entschlüsselung genomischer DNA eines Organismus charakterisieren. Dies wird deutlich, wenn man den biologischen Informationsfluss vom Gen zum funktionstüchtigen Protein betrachtet. Komplexe Prozesse, wie die Transkription der DNA-Sequenz, die Translation der mRNA in ein Protein, dessen Transport zum Wirkort, die posttranslationale Modifikation und der Abbau des Proteins, werden durchlaufen. Die Menge an Proteinen in der Zelle sowie die Modifikation eines Proteins kann nicht automatisch vom Gen oder der mRNA

abgeleitet werden. Die Proteomanalyse eröffnet die Möglichkeit der Identifizierung von Proteinen, der Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen und der Funktionsbeschreibung von Proteinen oder Proteingruppen und ihrer Beziehung untereinander.

Mit Hilfe der Proteomanalyse wird ein ständig wachsender detaillierter Einblick in das genetische, metabolische und physiologische Potential von Organismen gewonnen. Dies gibt Aufschluss über die Anpassungsfähigkeit der untersuchten Organismen an bestimmte Lebensräume.

Voraussetzung für die Quantifizierung von Proteinen ist die Auftrennung des Proteingemisches der lysierten Zellen. Verschiedene elektrophoretische Methoden wurden dafür entwickelt. Bei der nativen Gelelektrophorese erfolgt die Separierung von Proteinen unter Bedingungen, bei denen ihre enzymatische Aktivität erhalten bleibt. Bei der denaturierenden Gelelektrophorese hingegen werden alle Proteine nach der Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichartiger Ladung überführt. Dies wird durch die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht. SDS ist eine negativ geladene, denaturierende Detergenz, die alle nichtkovalenten Bindungen, die die Proteinstruktur bestimmen, aufhebt. Es bilden sich Mizellen mit konstanter Negativladung pro Masseneinheit, die in einem Polyacrylamidgel beim Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die Entwicklung der zweidimensionalen Proteinelektrophorese [O´Farrell 1975, Klose 1975] hat durch ihre höhere Auflösung im Vergleich zur SDS-Elektrophorese die Analyse von Stressantworten entscheidend gefördert. Während in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, die Proteine im Gemisch nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt werden, erfolgt in der zweiten Dimension, der SDS-Page, die Trennung nach dem Molekulargewicht. Bei der Analyse der Funktion der Proteine ist heutzutage die massenspektrometrische Analyse die bewährteste Methode. Eine der Vorgehensweisen ist die Spaltung des Proteins mit einer Protease, z.B. Trypsin. Die resultierenden Molekularmassen der Peptide werden massenspektrometrisch ermittelt, und durch Vergleich mit entsprechenden Nukleinsäure- oder Proteindatenbanken kann die Funktion des Proteins identifiziert werden.

1.3.2 Flowzytometrie

Die Analyse von Individuen einer Population kann mit Hilfe der Flowzytometrie erfolgen. Diese ermöglicht eine schnelle Analyse einer großen Anzahl von Zellen unter Nutzung von Streulicht- und Fluoreszenzmessungen. Die Stärke der Methode liegt in:

- i) der schnellen Einzelzellanalyse (10000 Zellen/ Sekunde),
- ii) dem breiten Spektrum der messbaren Zellparameter (siehe Tab. 1) und
- iv) der quantitativen Bestimmung zellinterner Komponenten.

Überdies bietet die Flowzytometrie die Möglichkeit der kultivierungsunabhängigen *real-time* Analyse von Mikroorganismen, was auch die Untersuchung nicht kultivierbarer Mikroorganismen ermöglicht. Durch die quantitative Analyse strukturgebender und funktionstragender Zellcharakteristika kann die Physiologie individueller Zellen und Populationen beschrieben werden (Zellzustandsanalyse). Ferner werden Informationen über deren Verteilung in der analysierten Population gewonnen. Die Eigenschaften von Zellen innerhalb von Zellverbänden oder Populationen werden dadurch nicht integral, sondern individuell visualisiert und quantifiziert, da man segregierte Daten erhält. Flowzytometrische Messungen erlauben die Untersuchung intrinsischer struktureller Parameter, wie die Zellgröße, das Vorhandensein von Vakuolen oder die Granularität, und extrinsischer struktureller Parameter, wie der DNA-, RNA-Gehalt von Zellen oder der Lipidgehalt. Bei letzteren werden die entsprechenden Strukturen mit Hilfe von extern zugebenden fluoreszierenden Farbstoffen sichtbar gemacht. Des Weiteren können auch intrinsische funktionelle Parameter, wie der Redoxstatus von Zellen, bestimmt durch die Eigenfluoreszenz endogener Pyridine und Flavine, und extrinsische funktionelle Parameter analysiert werden. Zu letzteren gehören z.B. Oberflächenrezeptoren oder das Membranpotential und die Membranintegrität von Zellen. Auch bei deren Analyse greift man auf extern zugegebene fluoreszierende, mit den entsprechenden Strukturen interagierende, Komponenten zurück. Werden verschiedene zelluläre Parameter miteinander korreliert spricht man von multiparametrischer Flowzytometrie.

Neben den genannten Vorzügen einer flowzytometrischen Analyse, liegt ein weiterer Vorzug in der Möglichkeit, Zellen mittels Zellsortierung lokal zu separieren und anschließend weiteren Untersuchungen zuzuführen.

Tabelle 1: ausgesuchte Beispiele flowzytometrisch messbarer Parameter [nach Shapiro 2000]

Parameter	Messmethode
intrinsische strukturelle Parameter	
Zellgröße	Vorwärtsstreulicht
Cytoplasma, Granularität, Vakuolen etc.	Seitwärtsstreulicht
Pigmentgehalt (z.B. photosynthetische Pigmente)	Fluoreszenz
intrinsische funktionelle Parameter	
Redoxstatus	Fluoreszenz (endogene Pyridine und Flavine)
extrinsische strukturelle Parameter	
DNA-Gehalt	Fluoreszenz (z.B. DAPI, Mithramycin, Ethidiumbromid, Hoechst Farbstoffe)
DNA-Basenverhältnis	Fluoreszenz (z.B. A-T, und G-C bindende Farbstoffe wie z.B. Hoechst 33342 und Chromomycin A ₃)
RNA-Gehalt (<i>double stranded</i>)	Fluoreszenz (z.B. Pyronin (mit DNA-Blockierung))
Antigene	Fluoreszenz (z.B. markierte Antikörper)
Lipide	Fluoreszenz (z.B. Nilrot)
Oberflächenzucker	Fluoreszenz (z.B. markierte Lektine)
extrinsische funktionelle Parameter	
Oberflächenrezeptoren	Fluoreszenz (z.B. markierte Liganden)
Membranintegrität	Fluoreszenz (z.B. Propidium, Fluoresceinester)
Membranpotential	Fluoreszenz (z.B. Cyanide, Rhodamin 123, Oxonole)
intrazellulärer pH	Fluoreszenzverhältnis (z.B. BCECF, SNAFL, SNARF)
Sulfhydryl-Gruppen/ Glutathione	Fluoreszenz (z.B. Monochlorbiman)

Der Aufbau und das Messprinzip eines Flowzytometers sind in Abb. 3 dargestellt. In der Hüllstromkammer, dem Herzstück des Flowzytometers, werden die Zellen im Probenstrom mit Hilfe des Prinzips der hydrodynamischen Fokussierung vereinzelt, sodass sie einzeln aneinander aufgereiht, wie eine Perlenkette, die Kammer verlassen. Anschließend werden die Zellen einer oder mehreren Lichtquellen (Laser oder Quecksilberdampfampe) ausgesetzt, wodurch Informationen über Zellgröße (Vorwärtsstreulicht (FSC)) und Granularität (Seitwärtsstreulicht (SSC)) erhalten werden. Ist die Zelle zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt worden, werden

diese bei der entsprechenden Wellenlänge angeregt und emittieren danach Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Photonen werden durch Photomultiplier aufgefangen, das Signal wird elektronisch verstärkt und die Software gibt die Daten in Form eines Histogramms wieder.

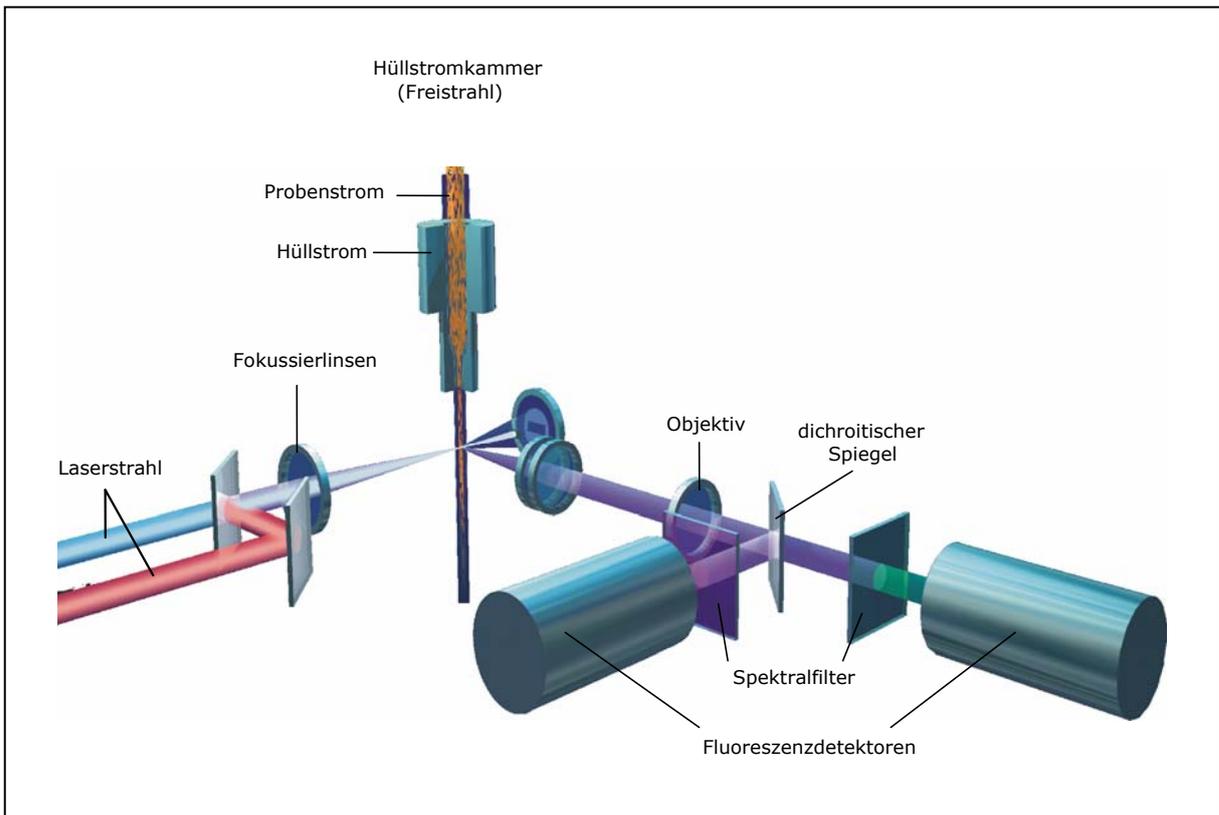


Abb. 3: Aufbau eines Flowzytometers (Darstellung wurde von Dr. habil S. Müller zur Verfügung gestellt)

Die Anwendung multiparametrischer Flowzytometrie findet in der Umweltmikrobiologie, im Gegensatz zur medizinischen Forschung und Diagnostik, bisher nur vereinzelt statt. Ein interessantes Untersuchungsbeispiel in der Umweltmikrobiologie ist die Analyse von Mischpopulationen. Müller et al. [2002] verwendeten verschiedene Fluoreszenz-markierte Oberflächenzucker, um das Verhalten der einzelnen Spezies innerhalb einer Mischpopulation und die Stabilität der Mischpopulation zu untersuchen. Vogt et al. [2005] nutzten die phänotypischen Eigenschaften von Bakterienspezies, um Subpopulationen in einer anaeroben sulfatreduzierenden mikrobiellen Biozönose zu differenzieren. Kleinsteuber et al. [2006] kombinierten Flowzytometrie, Zellsortierung und SSCP Analyse, um ein Dieselöl abbauendes Konsortium in Abhängigkeit der Salzkonzentration und Kultivierungsdauer zu untersuchen, und Aussagen über die am Abbau beteiligten

Spezies treffen zu können. Maraha et al. [2004] nutzten z.B. die Flowzytometrie, um die Verteilung und das Überleben von GFP-markierten, im Boden ausgebrachter *Pseudomonas fluorescens* Zellen zu untersuchen. Die so gewonnenen Einblicke über den physiologischen Status der Zellen in der Umwelt können genutzt werden, um die Überlebensfähigkeit mikrobieller Inokula in der Umwelt zu erhöhen.

Während die Flowzytometrie Rückschlüsse auf Beziehungen innerhalb von Populationen bis hin zur Identifizierung einzelner Partner und gleichzeitig Aufschluss über Aktivitäten und die Verteilung zellinterner Komponenten liefern kann, erhält man mit Hilfe der Proteomanalyse Informationen über das metabolische und physiologische Potential von Organismen, kann Proteine und deren Modifikationen identifizieren, sowie Einblicke in Adaptionsmechanismen und Regulationsnetzwerke erhalten. Mit der Kombination beider erhält man ein Werkzeug, mit dem die Analyse von Zellantworten (Überlebens- oder Adaptionsstrategien) auch auf der Ebene von Subpopulation, statt nur auf der Populationsebene, ermöglicht wird.

1.4 Der Modellorganismus *Cupriavidus necator* JMP134

C. necator JMP134 ist ein aerobes, aus dem Boden isoliertes, β -Proteobakterium. Früher bekannt als *Alcaligenes eutropha*, reklassifiziert als *Ralstonia eutropha* [Yambuuchi et al. 1995] und später transferiert in einen neuen Genus *Wautersia eutropha* [Vanechoutte et al. 2004]. Zum Schluss wurde der Stamm von Vandamme et al. [2004] dem Genus *Cupriavidus necator* zugeordnet.

C. necator JMP134 bietet sich als Modellorganismus an, da das Bakterium in der Lage ist eine Reihe aromatischer Substanzen, z.B. Phenol, Chlorbenzoat, Trichlorethylen oder Phenoxyessigsäuren, wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, zu metabolisieren, und die dafür genutzten Wege gut untersucht sind [Pieper et al. 1989, Don et al. 1985, Pieper et al. 1988, Kim et al. 1996].

1.4.1 Phenolmetabolismus

C. necator JMP134 kann mit Phenol als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen. Während die meisten Bakterien zur Assimilation von Phenol den *ortho*-Weg nutzen, exprimiert *C. necator* JMP134 in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit den *ortho*- und *meta*-Weg [Pieper et al. 1989, Müller und Babel 1996]. Nach bisherigen Erkenntnissen [Ayoubi und Harker 1998] wird der erste Schritt des Phenolabbaus von einer Multikomponenten-Phenolhydroxylase katalysiert. Das im *meta*-Weg gebildete Intermediat Hydroxymuconsäure-Semialdehyd wird, nach heutigem Wissensstand, durch die Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Hydrolase

weiter metabolisiert [Pieper et al. 1989]. Die Induktion der Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase wurde bisher nicht nachgewiesen.

Die beiden Abbauege (Abb. 1, S.3) unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Intermediate (*ortho*-Weg: AcCoA und Succinat, *meta*-Weg: Pyruvat und AcCoA), sondern auch in ihrer Effizienz. Bei niedrigen Phenolkonzentrationen und Wachstumsraten wird der *ortho*-Weg induziert, bei höheren der *meta*-Weg zugeschaltet. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit wird laut Müller und Babel [1996] nicht durch die Kapazität der Phenolhydroxylase oder Catechol-1,2-Dioxygenase limitiert. Stattdessen wird als Ursache für das Zuschalten eines weiteren Assimilationsweges eine Limitation in der Energiebereitstellung vermutet, was durch die Gabe eines zusätzlichen, Energie liefernden Substrates untermauert wurde.

1.4.2 PHB-Synthese

Des Weiteren ist die Spezies *C. necator* fähig PHB (Polyhydroxybutyrat) einem Mitglied der Polyhydroxyalkanoate (PHA) zu synthetisieren [Steinbüchel 1996]. Die Synthese dieser Biopolymere ist in allen wichtigen physiologischen und taxonomischen Gruppen der Eubakterien sowie einigen Archaeobakterien nachgewiesen worden [Doi 1990, Steinbüchel 1996, Babel et al. 2001]. Die Fähigkeit zur Synthese ist nicht vom Taxon oder von ökophysiologischen Besonderheiten abhängig.

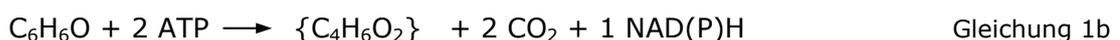
Die Synthese von PHB in *C. necator* startet mit zwei Molekülen Acetyl-CoA, die durch die β -Ketothiolase zu einem Acetoacetyl-CoA-Molekül über eine Claisen-Kondensation verknüpft werden. Acetoacetyl-CoA wird durch die Acetoacetyl-CoA-Reduktase zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert. Bei dieser Reaktion werden Reduktionsäquivalente verbraucht. Der letzte Schritt ist die Polymerisation, die von der PHB-Synthase katalysiert wird [Steinbüchel 1996]. Die Regulation der PHB-Synthese erfolgt nicht auf epigenetischer, sondern wahrscheinlich auf metabolischer Ebene. Um Acetyl-CoA konkurrieren mindestens zwei Enzyme, die β -Ketothiolase und die Citrat-Synthase, deren Reaktionsprodukt Coenzym A die β -Ketothiolase hemmt. Unter unlimitierten Wachstumsbedingungen wird Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust und zur Gewinnung von Zellmaterial und Energie verwendet. Die Konzentration an Coenzym A in der Zelle ist im Vergleich zu Acetyl-CoA hoch, was die β -Ketothiolase und somit die PHB-Synthese hemmt [Senior und Dawes 1971]. Unter wachstumslimitierenden Bedingungen, wie z.B. Stickstoff-Limitation, die zu einer eingeschränkten NAD(P)H Oxidation infolge fehlender reduktiver Aminierung von Pyruvat und α -Ketoglutarat führt, kommt es zu erhöhten NAD(P)H, NADH und Acetyl-CoA Konzentrationen. Diese führen zu einer Hemmung der Citrat-Synthase und zu einer Rückregulierung des Citratzykluses. Zur Aufrechterhaltung des energetischen Gleichgewichtes wird im so

genannten *Overflow*-Metabolismus aus Acetyl-CoA und NAD(P)H PHB synthetisiert [Braunegg et al. 1998, Babel et al. 2001].

Neben *C. necator* sind auch einige andere Bakterienspezies in der Lage PHB ohne unmittelbare Mangelbedingungen in einem wachstumsassoziierten Prozess zu bilden, z.B. *Alcaligenes latus* [Lafferty und Braunegg 1984a, 1984b, Braunegg und Bogensberger 1985], *A. vinelandii* UWD [Page und Knosp 1989], *Methylobacterium rhodesianum* [Ackermann und Babel 1997], *Actinobacillus* sp. EL-9 [Son et al. 1996], *A. beijerinckii* [Bormann et al. 1998] und *Azotobacter chroococcum* [Savenkova et al. 1999]. Der Term wachstumsassoziierte PHB-Synthese beschreibt hierbei zwei separate Phänomene. Zum einen charakterisiert es die PHB-Bildung unter nicht limitiertem exponentiellem Wachstum, zum anderen den Übergang zwischen Phasen unlimitierten exponentiellen Wachstums und Wachstumslimitationen, die durch die Erschöpfung einer Substratquelle hervorgerufen werden, währenddessen beides, Wachstum und Produktbildung, stattfindet.

1.4.3 Phenolassimilationswege und PHB-Synthese

Für *C. necator* JMP134 ist nach wie vor ungeklärt, ob bei der Assimilation von Phenol entstehende Reduktionsäquivalente und der Substratkohlenstoff in Zellwachstum oder PHB-Synthese eingeleitet werden. Maskow und Babel [2001] untersuchten die PHB-Synthese nach Stickstoff-Limitation in *C. necator* JMP134 unter Verwendung kalorimetrischer Methoden. Sie stellten die Hypothese auf, dass die PHB-Synthese (PHB = {C₄H₆O₂}) via *ortho*-Weg biologisch nutzbare Energie liefern würde (Gleichung 1a), was den gleichzeitigen Ablauf von Vermehrung und PHB-Synthese erlauben würde, während die PHB-Synthese via *meta*-Weg energieneutral verlaufen würde, d.h. Wachstum und PHB-Synthese aus energetischen Gründen nicht gleichzeitig möglich wären (Gleichung 1b).



Gegensätzliche Ergebnisse publizierten Leonard und Lindley [1998]. Sie untersuchten *Ralstonia eutropha* 335, welcher Phenol nur über den *meta*-Weg assimiliert, und stellten unter Kohlenstoff-limitierten Wachstumsbedingungen eine wachstumsassoziierte Synthese von PHB fest. Der Grund dafür wurde in der geringen Aktivität der Enzyme des Glyoxylatzykluses vermutet. Der Glyoxylatzyklus bietet die einzige

Möglichkeit, Acetyl-CoA, ein Intermediat des *meta*-Weges, in die Gluconeogenese einzuschleusen. Somit kann Acetyl-CoA nur über den Citratzyklus oxidiert oder in PHB festgelegt werden.

1.4.4 DNA-Synthese

Erst kürzlich ist das komplette Genom von *C. necator* JMP134 vollständig sequenziert worden [<http://genome.jgi-psf.org>]. Dabei zeigte sich, dass der Organismus neben einem Plasmid (0,0877 Mb) und einem Megaplasmid (0,6349 Mb) zwei zirkuläre Chromosomen besitzt (Chromosom 1 = 3,806 Mb, Chromosom 2 = 2,726 Mb). Damit gehört *C. necator* JMP134, genau wie *Cupriavidus necator* H16 und *Cupriavidus metallidurans* CH34, zu den Bakterien mit multiplen Chromosomen. 1989 wurden erstmals bei *Rhodobacter sphaeroides* zwei zirkuläre Chromosomen detektiert [Suwanto und Kaplan 1989]. Seitdem sind mehr als 14 weitere Organismen identifiziert wurden, die zwei oder sogar drei (*Burkholderia cepacia*) Chromosomen besitzen [Egan et al. 2005]. Die Frage nach dem Ablauf der Replikation in diesen Organismen wurde von Egan et al. [2005] am Beispiel von *Vibrio cholerae* untersucht. Sie konnten nachweisen, dass an beiden Chromosomen die Replikation synchron initiiert wurde, während Khang und Shapiro [2003] bei ihrer Arbeit mit *Agrobacterium tumefaciens* und *Sinorhizobium meliloti* feststellten, dass auch die Zellteilung in diesen Organismen sich nicht vom gängigen prokaryotischen Zellzyklus-Modell unterschied. Aus den Arbeiten von Müller et al. [1999] ist bekannt, dass *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Phenol seinen Zellzyklus nach dem *eukaryotic like* Prinzip (1.2.2) durchführt und zwei DNA-Subpopulationen ausbildet. Beim Wachstum auf Pyruvat plus Hefe konnte eine entkoppelte DNA-Synthese beobachtet werden.

1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Strategien und Mechanismen, die ein Überleben von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf dem toxischen Substrat Phenol sichern, mit Hilfe metabolischer und molekularer Untersuchungen, auf Populations- und Subpopulationsebene aufzuzeigen. Um dies zu realisieren sollten Methoden der Proteomanalyse und Flowzytometrie kombiniert werden.

Im speziellen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Mechanismen und Strategien, die der Anpassung an zunehmende Phenolkonzentrationen dienen, können detektiert werden?
- Existieren innerhalb der Population Subpopulationen, die unterschiedliche Strategien verfolgen? Wenn ja, wie sind diese charakterisiert?
- Welche metabolischen Wege werden mit zunehmenden toxischen Substratkonzentrationen etabliert, und wohin werden die entstehenden Intermediate metabolisiert?

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen und Kultivierung

Der für die Arbeit verwendete Stamm *C. necator* JMP134 (früher *Ralstonia eutropha* JMP134) wurde von der DSMZ (DSMZ 4058) bezogen. Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten mit Standard-Nährlösungs-Agar (1,5 % Agar (w/V)) + 0,02 % Phenol (Tab. 2). Diese wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert, anschließend im Kühlschrank aufbewahrt und alle 4 Wochen erneut überimpft. Geräte, Nährmedien und Zusätze wurden 20 Minuten bei 121°C und 1,1 kPa autoklaviert bzw. bei 160°C im Trockenschrank für 3 Stunden sterilisiert.

2.1.1 Nährlösungen

Die Kultivierung erfolgte bei allen Versuchen auf einem Minimalmedium, der Standard-Nährlösung (STNL) pH 7. Die Kohlenstoffquellen wurden separat steril filtriert und zu Versuchsbeginn zugegeben.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Standard-Nährlösung (STNL)

Substanz	Konzentration [mg/l]
KH ₂ PO ₄	680,50
K ₂ HPO ₄	870,90
CaCl ₂ * 6 H ₂ O	5,50
NH ₄ Cl	761,40
Spurensalze	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	71,20
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,44
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	0,81
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,79
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,25
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	4,48

2.1.2 Batch-Kultivierung

Die *Batch*-Kultivierung der Bakterien erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml Nährlösung bei 30°C und 125 U/min⁻¹ (Inkubationsschüttler TH25, Bühler). 10 ml Zellsuspension aus einer Übernachtskultur, angesetzt von einer frisch gewachsenen Agarplatte, dienten als Impfmateriale.

2.1.3 Kontinuierliche Kultivierung im Chemostat

Die Versuche unter kontinuierlichen Wachstumsbedingungen im Chemostaten wurden in einem Laborfermenter (Biostat MD, Braun Biotech, Deutschland) durchgeführt. Das Arbeitsvolumen des Fermenters betrug 1,0 l. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C, der Rührer wurde auf 400 U/min⁻¹ eingestellt. Der pH Wert wurde mit 1 M KOH auf pH 7,0 (Messsonde Metler Toledo) geregelt und die Gelöstsauerstoffkonzentration (Messsonde Metler Toledo) betrug mindestens 45 % Sättigung. Der Fermenter wurde mit einer auf Phenol kultivierten *Batch*-Vorkultur beimpft. Mit Eintritt der Zellen in die stationäre Phase, zu erkennen an der Zunahme der Gelöstsauerstoffkonzentration, wurde die kontinuierliche Kultivierung bei einer Durchflussrate von $D=0,025 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Nach 5 h wurde die Durchflussrate mit einem Gradienten von 5 h auf $D=0,05 \text{ h}^{-1}$ erhöht. Die Substratkonzentration (Phenol) betrug $c_0=1 \text{ g/l}$. Nach einem fünfmaligen Volumenwechsel wurden die Proben bei den entsprechenden Durchflussraten entnommen. Die Kultivierung erfolgte anschließend bei Durchflussraten von $D=0,05-0,35 \text{ h}^{-1}$.

2.1.4 Kontinuierliche Kultivierung im pH-Auxostat

Beim pH-Auxostat erfolgt die Regulierung des Wachstums über den pH-Wert. Der pH-Auxostat wurde so ausgelegt, dass die Zellen mit zunehmenden Substratrestartkonzentrationen (c_R) konfrontiert wurden. Die Mikroorganismen wachsen unter diesen Bedingungen kontinuierlich mit einer der Substratkonzentration entsprechenden maximalen Wachstumsgeschwindigkeit.

Der Versuch wurde mit der Etablierung eines Chemostaten in einem Laborfermenter (Biostat Q, Braun Biotech, Deutschland) gestartet. Das Arbeitsvolumen betrug 0,3 l, die Kultivierung erfolgte bei 30°C, 300 U/min⁻¹ und einem pH Wert von 7,0, eingestellt mit 0,2 M KOH. Zuerst wurde im Chemostat bei einer Durchflussrate von $D=0,05 \text{ h}^{-1}$ der Basenverbrauch (ml/h) für das Wachstum mit $c_0=1 \text{ g/l}$ Phenol als Ausgangskonzentration ermittelt. Danach wurde im Basenvorratsbehälter Medium mit 2 g/l (21,3 mM) und später 3 g/l (31,9 mM) Phenol plus der benötigten Menge Base für die Assimilation von 1 g/l Phenol vorgelegt. Die durch den Abbau von Phenol und NH_4 (durch den Verbrauch des NH_4 vom NH_4Cl entsteht Säure, die den pH-Wert senkt) verursachte Erniedrigung des pH-Wertes und die resultierende Dosierung von Base führte im Fermenter zu einer Zunahme der Substratrestartkonzentration (c_R). Da mit jedem Versuch den pH-Wert zu regulieren neues Substrat zugeführt wurde, dessen Assimilation aber mehr Base benötigte als vorhanden war, führte dies zu einer Erhöhung der Substratrestartkonzentration im Fermenter. Nach Erreichen einer quasikonstanten Substratrestartkonzentration (c_R), bei einer Substratausgangskonzentration von $c_0=2 \text{ g/l}$, wurde diese im Vorratsbehälter auf 3 g/l Phenol erhöht.

Die Proben wurden zu unterschiedlichen Substratrestkonzentrationen (C_R) entnommen.

2.2 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration wurde während des Wachstums durch die Messung der optischen Dichte bei $\lambda=700$ nm im Photometer (CADAS, Dr. Lange) verfolgt. Anhand einer Kalibrierkurve konnte aus der Trübung der Bakteriensuspension das Trockengewicht berechnet werden. Hierzu wurden 2,4 ml Bakteriensuspension in tarierte Röhrchen überführt, zentrifugiert (10.000*g, 10 min, 20°C), der Überstand verworfen und 4 h bei 105°C getrocknet und gewogen. Durch Differenzbildung wurde das Trockengewicht bestimmt. Es wurden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt und dann der Mittelwert verwendet.

2.3 Substrat- und Produktbestimmung

2.3.1 Phenol

Die Phenolkonzentration wurde nach Trennung mit einer HPLC (Shimadzu) nach einer Vorschrift von Oh und Tuovinen [1990] bestimmt. 1 ml der Probe wurde bei 18.000*g und 4°C 10 min zentrifugiert und der Überstand bei -18°C für eine spätere Analyse eingefroren. Die Trennung erfolgte durch eine Nucleosil 100 C18 Säule (4 mm*200 mm) und einer mobilen Phase bestehend aus 40 % Acetonitril (v/v) und 60% 131,5 mM NaH_2PO_4 (v/v) pH 2,8. Detektiert wurde Phenol bei $\lambda=280$ nm.

Injektionstemperatur : 23°C
Detektortemperatur : 23°C
Flussrate : 1 ml/min⁻¹

2.3.2 Ammoniumstickstoff

Die Ammonium-Stickstoffbestimmung erfolgte mit einem Spectroquant-Test von MERCK. Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurde Ammoniumchlorid verwendet.

2.3.3 Hydroxymuconsäure-Semialdehyd

Hydroxymuconsäure-Semialdehyd (HMS) ist ein Intermediat des *meta*-Abbauweges und färbt das Kulturmedium bei Akkumulation gelb. Fotometrisch kann dies mit Messung der Absorption bei $\lambda = 375$ nm verfolgt werden [Leonard et al. 1999]. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 33000$ wurden nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz die entsprechenden Konzentrationen ermittelt.

$$A = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Gleichung 2

A ist hierbei die gemessene Absorption (Extinktion), c ist die Konzentration des zu bestimmenden Stoffes, d die Schichtdicke der Küvette und ε_{λ} der Extinktionskoeffizient bei 375 nm.

2.3.4 Polyhydroxybutyrat (PHB)

Die Bestimmung des PHB-Gehaltes in den Zellen erfolgte nach der Methode von Riis und Mai [1988]. Zur Durchführung einer salzsauren Propanolyse wurden 2-5 mg BTS in ein druckdicht verschließbares Probengefäß mit 1 ml Dichlorethan (DCE) und 1 ml salzsaurem Propanol (1-Propanol) versetzt und 2 h bei 100°C inkubiert. Als interner Standard wurde in jeder Probe 100 µl (2,0 g Benzoesäure in 50 ml Propanol) mitgeführt. DCE diente im Ansatz, in welchem Extraktion und Alkoholyse gleichzeitig ablaufen, als Extraktionsmittel. Nach Abkühlen der Probe wurden 4 ml Aqua bidest zum auswaschen der Säure zugesetzt und die Probe 20-30 Sekunden geschüttelt. Zur Trennung der Phase wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die schwerere DCE/ Propanolphase mit dem entstandenen β -Hydroxybuttersäurepropylester wurde anschließend entnommen und mit aktiviertem NaSO_4 versetzt, um der Phase restliches Wasser zu entziehen. Die anschließende Bestimmung der β -Hydroxybuttersäurepropylester Konzentration erfolgte mittels GC (HP 6890, Säule: FFAP Optima 25 m*0,55 mm Säulendurchmesser*0,25 µm Film; FID Detektor).

Injektiontemperatur : 220°C

Detektortemperatur : 220°C

Split : 1:20

Trägergas : Helium

Flussrate : 1 ml/min⁻¹

Tabelle 3: Temperaturprofil beim Nachweis von β -Hydroxybuttersäurepropylester mittels Gaschromatographie

Temperatur (°C)	Zeit
100	2 min
175	7,5 min
220	2 min
220	2 min

2.4 Proteomanalyse

2.4.1 Zellaufschluss

Die geernteten Zellen wurden 8 min bei 8000*g und 4°C zentrifugiert (Hermle ZK380) und zweimal mit Waschpuffer (Tab. 4) gewaschen. Das Pellet wurde in max. 2 ml des gleichen Puffers resuspendiert und bei -18°C eingefroren.

Für den Zellaufschluss wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl SDS-Aufschlusspuffer I (Tab. 4) versetzt und bei 60°C und 1400 U/min⁻¹ für die Dauer von 5 min inkubiert (Eppendorf Thermomixer Comfort). Anschließend wurde 1 ml vom Aufschlusspuffer II zugegeben, und die Probe 10 Minuten bei 37°C und 1400 U/min⁻¹ inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 4°C und 8000*g 10 min zentrifugiert. Aliquote des gewonnenen zellfreien Extraktes wurden bei -18°C eingefroren.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Waschpuffers, SDS-Aufschlusspuffers I und Aufschlusspuffers II

Substanz	Konzentration
Waschpuffer	
Tris /HCl pH 7,5	50 mM
Chloramphenicol	3 mM
PMFS	1 mM
SDS-Aufschlusspuffer I	
Tris /HCl pH 7,5	20 mM
SDS	70 mM
Aufschlusspuffer II	
Tris /HCl pH 7,5	20 mM
MgCl ₂	10 mM
PMSF	1 mM
Benzonase (25 U/µl)	1 µl/ml

2.4.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der zellfreien Extrakte wurde nach der Methode von Lowry et al. [1951], modifiziert von Holtzhauer und Hahn [1988] bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Probe 10 min mit 1 ml Lösung E inkubiert (Tab. 5). Im Anschluss wurden 100 µl der Lösung D zugegeben und für 40 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung der Probe erfolgte bei $\lambda=700$ nm (CADAS Spektral-Photometer, Dr. Lange). Zum Abgleichen des Nullwertes wurde ein Leerwert, der 50 µl Aqua bidest enthielt, mitgeführt. Jeder Wert wurde durch eine Doppelbestimmung ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Kalibrierkurve von BSA bestimmt.

Tabelle 5: Stammlösungen der Proteinbestimmung

Lösung	Zusammensetzung
A	2 % Na ₂ CO ₃ (wasserfrei) in 0,1 N NaOH
B	1 % Cu ₂ SO ₄ * 2H ₂ O
C	2 % Kaliumtartrat
D	50 % Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (v/V) in H ₂ O
E	1 Teil B und 1 Teil C mischen, dazu 50 Teile A

2.4.3 Trennung und Nachweis von Proteinen

2.4.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung erlaubt die Trennung der Proteine gemäß ihrem isoelektrischen Punkt, d.h. das Protein wandert im elektrischen Feld bis zu der Stelle im pH-Gradienten an dem seine Nettoladung gleich Null ist.

Die isoelektrische Fokussierung der Proteine wurde in immobilisierten pH-Gradienten mit *Immobiline Dry Strips* (pH 3-10, NL, 18 cm; GE Healthcare), und dem Gerät Ettan IPGphor (GE Healthcare) durchgeführt. Bei der Proteomanalyse der sortierten Zellen wurden *Immobiline Dry Strips* pH 3-10 NL, 7 cm (GE Healthcare) verwandt.

Bei der analytischen Trennung wurde die aufzutragende Menge Protein (50 µg/*Strip*; zur präparativen Trennung 0,8 mg Protein/*Strip*), mit dem 5-fachen Volumen an eiskalten Aceton aus dem zellfreien Extrakt gefällt und 20 Minuten bei 0°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 10 min bei 0°C und 9000*g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur vollständigen Entfernung des Acetons wurden die Pellet 10-20 Minuten an der Luft getrocknet, in 50 µl Probenpuffer resuspendiert und 10 Minuten bei 20°C und 1400 U/min⁻¹ mit einem Eppendorf Thermomixer Comfort geschüttelt. Anschließend wurde 350 µl IEF Puffer zugegeben, die Proben weitere 5 min bei 20°C geschüttelt und danach 30 min bei 20°C und 18.000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die IPG *Strips* aufgetragen, mit 2 ml PlusOne *Dry Strip Cover Fluid* (GE Healthcare) überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden, und über Nacht äquilibriert. Bei den 7 cm Strips wurden jeweils 10 µg Protein, 30 µl Probenpuffer und 105 µl IEF Puffer verwandt.

Tabelle 6: Zusammensetzung von IEF- und Probenpuffer

Substanz	Konzentration
IEF Puffer	
Harnstoff	600 mg
Aqua bidest	800 µl
Triton-X	12,5 µl
IPG-Puffer (Pharmacia Biotech)	6,5 µl
DTT	3,5 mg
Bromphenolblau	5 µl (aus 1 mg/ml Lösung)
Probenpuffer	
IEF-Puffer	250 µl
CHAPS	5 mg
Bromphenolblau	2,5 µl (aus 1 mg/ml Lösung)

Am nächsten Tag wurden die äquilibrierten Strips zur Fokussierung in die mit *Cover Fluid* gefüllte Fokussierungskammer (Ettan™ IPGphor, GE Healthcare) überführt. Vor den Start der Fokussierung wurde angefeuchtetes Filterpapier (Paper Wicks IPGphor™, GE Healthcare) an beiden Enden der Strips aufgelegt, um eventuell in den Proben enthaltene Salze aufzunehmen.

Tabelle 7: Programm zur Trennung von Proteinen mittels isoelektrischer Fokussierung

Schritt	Zeit [h]	Art	Spannung [V]
1	7	<i>step & hold</i>	300
2	6	Gradient	1000
3	3	Gradient	8000
4		<i>step & hold</i>	8000

Während die analytische IEF bei einem totalen Vh-Wert von 80000 Vh gestoppt wurde, lief die präparative IEF bis 100000 Vh.

Im Anschluss an die Fokussierung wurden die *Strips* mit Aqua bidest abgespült und 15 min mit je 2 ml 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,8 (6 M Harnstoff; 30 % Glycerol (w/V); 4 % SDS; Bromphenolblau und 2 % DTT) äquilibriert. Nach erneutem Waschen mit Aqua bidest wurden die *Strips* 15 Minuten mit je 2 ml 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 8,8 (6 M Harnstoff; 30 % Glycerol (w/V); 4 % SDS; Bromphenolblau und 2,5 % Jodacetamid) äquilibriert. Die so behandelten *Strips* wurden anschließend in die zweite Dimension (SDS-Page) überführt.

2.4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur zweidimensionalen Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page wurde für die Herstellung von Gradientengelen das System von Hoefer-Dalt (Gradientenmischer und Gießkammer) verwendet, mit dem gleichzeitig 11 Gradientengele (9-18 % Acrylamid) gegossen werden konnten.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Gradientengele für die zweite Dimension der Auftrennung von Proteinen

Substanz	9 %	18 %
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M	0,375 M
Acrylamid/Bisacrylamid*	9 % (w/V)	18 % (w/V)
Glycerol	0	1,08 M
SDS	3,47 mM	3,47 mM
10 % APS	4,38 mM	2,19 mM
10 % TEMED	1,63 mM	2,79 mM

* Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)

Zur Initialisierung der Polymerisation wurden APS sowie TEMED zugesetzt. Um die Oberfläche der Gele während der Polymerisierung zu glätten und luftdicht abzuschließen, wurden diese mit 2 ml Wasser gesättigtem sekundären Butanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die äquilibrierten *Strips* auf das SDS-Gel gelegt und mit flüssiger 1 %iger Agarose-Lösung (0,125 M Tris/HCl pH 6,8) überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 12°C, 16-18 h in einer Elektrophoresekammer (Hoefer-DALT), welche mit 20 l Laufpuffer (0,1 % SDS; 0,192 M Glycin; 0,025 M Tris) befüllt war. Mit dem Stromversorgungsgerät (Hoefer EPS 2A200) wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Die Leistung wurde auf 12 W limitiert.

Für die eindimensionale Auftrennung der Proteine wurde die Mini Protean II Cell (Bio-Rad) genutzt. Wie bei den Gradientengelen wurden zur Initialisierung der Polymerisation APS und TEMED zugesetzt und das gegossene 12 %ige Polyacrylamid-gel (Tab. 9) mit Wasser gesättigtem sekundären Butanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde ein 4 %iges Sammelgel (Tab. 9) mit Probeauftragungstaschen gegossen. Die Proben wurden 1:4 mit dem SDS-Probenpuffer (Tab. 9) verdünnt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden sie mit einer Mikroliterspritze in die Probenaschen eingetragen. Die Trennung erfolgte bei 12°C bei einer Stromstärke von 40 mA/Gel.

Tabelle 9: Zusammensetzung SDS-Probenpuffer und 12 %igem Polyacrylamidgel

SDS Probenpuffer	12 % Polyacrylamidgel	4 % Sammelgel
0,063 M Tris/HCl pH 6,8	0,38 M Tris/HCl pH 8,8	0,125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,069 M SDS	3,49 mM SDS	3,49 mM SDS
0,64 M Mercaptoethanol	12 % Acrylamid*	4 % Acrylamid*
0,91 M Glycerol	3,30 mM APS	2,19 mM APS
0,059 mM Bromphenolblau	6,49 mM TEMED	12,91 mM TEMED

* Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)

2.4.3.3 Proteinfärbungen und Entfärbung

i) Silberfärbung modifiziert nach Blum et al. [1987]

Das Prinzip der Silberfärbung ist die Komplexbildung der Ag^+ -Ionen mit den Glutamin-, Asparagin- und Cysteinresten der Proteine [Rehm 2002]. Die Detektion folgt durch reduzierende Agenzien, welche die Reduktion der Ag^+ -Ionen zu metallischem Silber bewirken. Die 2 %ige SilbernitratstammLösung wurde stets im Dunkeln und nie länger als 4 Wochen aufbewahrt.

Die Gele wurden nach der SDS-Page mindestens 30 Minuten mit einer Fixierlösung (50 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), 40 % Aqua bidest (v/v)) inkubiert und anschließend 3 * 20 Minuten mit 30 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die eigentliche Färbung erfolgte in einer Färbekammer (Automated Gel Stainer von Hoefer) nach den in Tab. 10 aufgelisteten Schritten.

Tabelle 10: modifizierte Silberfärbung nach [Blum et al. 1987]

Lösung	Komponenten	Färbezeit [min]
Thiosulfatlösung	0,01 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	2
Aqua bidest		3*2
Imprägnierer	0,2 % Silbernitrat; 0,022 % Formaldehyd (v/v)	20
Aqua bidest		2*2
Entwickler	6 % NaCO_3 ; 0,013 % Formaldehyd (v/v); 0,0004% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	manuelle Regelung
Aqua bidest		1
Stoplösung	50 % Methanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v); 40 % Aqua bidest (v/v)	10

Die gefärbten Gele wurden 20 Minuten mit einer 50 %igen Methanollösung (v/v) gewaschen und zur Vorbereitung der Geltrocknung mit einer Konservierungslösung (3,78 % Glycerol (w/v)) behandelt.

ii) Coomassie-Färbung der präparativen Gele nach Neuhoff et al. [1985]

Coomassie bindet bevorzugt nichtkovalent an hydrophobe Anteile der Proteine, ist jedoch weniger sensitiv als Silber. Die Coomassiefärbung wurde angewandt, um die Proteinmuster auf präparativen 2D-Gele sichtbar zu machen. Die Gele wurden nach der SDS-Gelelektrophorese 2 min in Aqua bidest gewaschen und anschließend mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung G 250 (Tab. 11) über Nacht inkubiert. Die Entfärbung des Gel-Hintergrundes erfolgte durch Waschen mit Aqua bidest, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde.

Tabelle 11: Herstellungsanweisung für kolloidale Coomassie-Brilliant-Blau Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G 250

Zusammensetzung

- 18 ml 85 %ige ortho-Phosphorsäure mit 765,2 ml Aqua bidest mischen
 - Zugabe von 80 g Ammoniumsulfat
 - Zugabe von 16 ml 5 %ige Coomassie-Brilliant-Blau G 250-Lösung
 - vor Gebrauch 4 Teile Gesamt-Lösung mit 1 Teil Methanol mischen
-

iii) Entfärbung von Silbergele nach Gharahdaghi et al. [1999]

Um silbergefärbte Spots der massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen, mussten sie entfärbt werden. Dazu wurden die ausgeschnittenen Spots 5 min mit Aqua bidest gewaschen und anschließend mit einem frisch hergestellten 1:1 Gemisch, bestehend aus 30 mM Kalium-Hexacyanoferrat (III) und 100 mM Natriumthiosulfat, 15 min bei 20 °C inkubiert. Nach jeweils zweimaligem Waschen mit Aqua bidest und einer 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung konnten die Spots wie in 2.4.5.2 beschrieben mit Trypsin verdaut und analysiert werden.

2.4.3.4 Gelkonservierung

Die Gele wurden zwischen zwei Cellophanfolien (Gel Air Cellophane Sheets, Bio-Rad) gelegt und im Warmlufttrockner (Gel Air Dryer, Biorad) 3 h getrocknet. Die so konservierten Gele sind unbegrenzt haltbar.

2.4.4 Auswertung der Proteinmuster

Die silbergefärbten und getrockneten Gele wurden mit Hilfe eines Scanners (Umax Powerlook 2000, Deutschland) und der zugehörigen Software (MagicScan v 4.1) mit einer Auflösung von 200 dpi (Graustufen) in eine Bilddatei umgesetzt, die mit der

Software PHORETIX 2D v6.01 (NonLinear Dynamics Dynamics Ltd, UK) analysiert wurde. Wenn im Folgenden nicht anders erwähnt, wurden für alle Proben Dreifachbestimmungen (3 Gele) angefertigt, die aus drei separaten Experimenten stammten. Die Detektion der Spots und der Vergleich der Gele erfolgten durch die Software, allerdings war eine manuelle Nachbearbeitung, sowohl bei der Spotdetektion, als auch beim Vergleich zweier unterschiedlicher Gele, notwendig.

Die optische Dichte der detektierten Proteinspots wurde mit Hilfe der Funktion „Intensity calibration“ mit einem Standardbild (*photographic step tablet*, Kodak) im Bereich von 0,0-1,12 aus der Pixelzahl umgerechnet und kalibriert. Der Gelhintergrund wurde durch die Funktion „Background subtraction“ mit dem Modus „Lowest on Boundary“ subtrahiert. Das normalisierte Volumen (n.V.) eines Proteinspots wurde aus dem Verhältnis seiner Intensität zur Gesamtintensität aller Proteine eines Gels berechnet. Für eine signifikante Änderung eines Proteins sollte sich das normalisierte Volumen eines Proteins im Vergleich zum Referenzgel mindestens verdreifacht bzw. gedrittelt haben. Spots galten als neu bzw. verstärkt oder abgeschwächt exprimiert, wenn sie in allen 3 Gelen als solche identifiziert wurden.

2.4.5 Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie

MALDI-MS

Bei MALDI-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*-Massenspektrometrie) werden Probemoleküle in die Kristalle einer Matrixsubstanz mit hohem UV-Absorptionsvermögen eingebaut. Mit einem gepulsten Laserstrahl wird das Proben-Matrix-Gemisch gezielt beschossen, wodurch eine positive Aufladung der Probemoleküle durch die Protonenübertragung von der sauren UV-absorbierenden Matrixsubstanz auf die Probemoleküle erfolgt.

Proteinspots von Interesse wurden aus den Coomassie-Brilliant-Blau G 250 gefärbten und getrockneten Gelen ausgeschnitten, die Gelstücke zunächst 10 min in Aqua bidest. gewässert und von Folienresten befreit und wie in Tab. 12 aufgelistet behandelt. Alle Schritte wurden, wenn nachfolgend nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur im Eppendorf Thermomixer Comfort durchgeführt. Die aus dem Trypsinverdau resultierenden und auf eine Probenplatte aufgebrachten Peptide wurden mittels AP-MALDI-Ion-Trap gemessen und fragmentiert (LC/MSD TRAP XCT Massenspektrometer, Agilent Technologies, Palo Alto, California). Mit Hilfe der erhaltenen Massenspektren wurden die Proteine mit dem Programm Mascot (Matrix Science, London, UK www.matrixscience.com) identifiziert. Die Suche erfolgte unter folgenden Parametern:

<i>taxonomy</i>	: Proteobacteria
<i>enzyme</i>	: Trypsin
<i>missed cleavage</i>	: 1
<i>fixed modification</i>	: Carbamidomethyl (C)
<i>variable modification</i>	: Oxidation (M)
<i>peptide tol.</i>	: $\pm 1,2$ Da
<i>MS/ MS tol.</i>	: $\pm 0,6$ Da
<i>monoisotopic/average</i>	: Average
<i>instrument</i>	: ESI-Trap
<i>charge</i>	: 1+, 2+, 3+

Tabelle 12: Arbeitsschritte und Lösungen zur Proteasespaltung nach Shevchenko et al. [1996]

Arbeitsschritte
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 200 µl Waschlösung (50 % Methanol (v/v), 5 % Essigsäure (v/v), 45 % Aqua bidest) 1 h schütteln, dann entfernen ➤ 200 µl Waschlösung 0,5 h schütteln, dann entfernen ➤ 200 µl Acetonitril 5 min schütteln, dann entfernen, 5 min in der Vakuumzentrifuge zentrifugieren ➤ 30 µl DTT-Lösung (10 mM DTT in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung) 0,5 h schütteln, dann entfernen ➤ 30 µl Iodacetamid-Lösung (100 mM Iodacetamid in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung) 0,5 h schütteln, dann entfernen ➤ 200 µl Acetonitril 5 min schütteln, dann entfernen ➤ 200 µl Ammoniumbicarbonat-Lösung (100 mM) 10 min schütteln, dann entfernen ➤ 200 µl Acetonitril 5 min schütteln, dann entfernen ➤ 20 µl Trypsin-Puffer dazugeben (20 µg Trypsin in 20 µl 1 mM HCl, 1:100 in 50 mM Ammoniumbicarbonat verdünnt) über Nacht bei 37 °C inkubieren ➤ Lösung in neues Gefäß überführen ➤ Gelstück zweimal mit 30 µl Extraktionspuffer (5 ml Acetonitril, 4,412 ml Aqua dest, 0,588 ml 85 % Ameisensäure) waschen und Überstand zu schon gesammelter Lösung geben ➤ Einengung des Volumens der gesamten Lösung <10 µl in der Vakuumzentrifuge ➤ Zugabe von 10 µl einer 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) ➤ Entsalzen mit ZipTip_{C18} Spitzen (Spitze spülen mit 10 µl 50 % Acetonitril (v/v), dann mit 10 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) Probe mehrmals ansaugen, entleeren und Spitze mit 10 µl 0,1 % Trifluoressigsäure spülen ➤ ZipTip_{C18} Spitzen in eine Lösung aus 4 µl (25 % Trifluoressigsäure, 600 µl Acetonitril, 400 µl Aqua bidest und 2 mg α-Cyano-Hydroxyzimtsäure) eintauchen, Lösung ansaugen und auf ein AP-MALDI-Ion-Trap-Platte auftragen

Nano-LC-ESI-MS

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit stand eine ESI-Quelle, gekoppelt mit einer Nano-LC (LC1100 series, Agilent Technologies, Palo Alto, California) zur Verfügung.

Das Einbringen der Proteine in die Gasphase erfolgt bei der ESI-MS durch das Versprühen des nach dem Verdau angesäuerten Peptidgemisches in feinste Tröpfchen.

Zur Ionisierung wird eine Hochspannung angelegt und das Lösungsmittel wird mit N₂ verdampft. Durch die dem Massenspektrometer vorgeschaltete Nano-LC erfolgt bereits vor der MS-Analyse eine Auftrennung der Peptide nach ihrer Hydrophobizität, was zur Detektion wenig häufiger Peptide führt, und damit auch zu einer sensitiveren Analyse.

Die Probenvorbereitung unterschied sich zur MALDI nur darin, dass die Proben nach dem Trypsinverdau nicht mehr entsalzt wurden, sondern nach dem Einengen die Proben in 50 µl 0,1 % Ameisensäure (v/v) + 3 % Acetonitril (v/v) aufgenommen und 10 min geschüttelt wurden. Im Anschluss wurden sie für die Analyse in 96er *well* Polypropylen Mikrotiterplatte überführt.

Entsalzungssäule	: Zorbax 300 SB-C18 5 µm, 5 mm*0,3 mm
Säule	: Zorbax 800 SB-C18 3,5 µm, 155 mm*75 µm
Laufpuffer A	: 0,1 % Ameisensäure (v/v) + 3 % Acetonitril (v/v)
Laufpuffer B	: 0,1 % Ameisensäure (v/v) + 96,9 % Acetonitril (v/v)
Flussrate	: 0,3 µl/min

Tabelle 13: Laufprofil der ESI-MS vorgeschalteten Nano-LC

t [min]	B [%]
0	3
5	3
8	15
50	45
55	90
60	90
61	3

2.5 Flowzytometrie

2.5.1 Zellernte und Zellfixierung

Die Zellen für die flowzytometrischen Untersuchungen wurden nach der Zellernte 5 min bei 3000*g zentrifugiert und mit 10 %igen NaN_3 fixiert. Dies erlaubte eine einjährige Lagerung der Proben im Kühlschrank, ohne dass die Zellen sich veränderten. Für die Messungen wurden die fixierten Zellen 5 min bei 3000*g zentrifugiert, mit NaCl-Phosphat Puffer (PBS-Puffer, Tab. 14) gewaschen, in selbigem resuspendiert und auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^8$ Zellen ml^{-1} eingestellt (entspricht einer $\text{OD}_{700} = 0,03$ bei $d_{\text{Küvette}} = 0,5$ cm).

2.5.2 Färbungen

Die Färbung der DNA von *C. necator* JMP134 erfolgte nach einer Methode von Meistrich et al. [1978] mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), der spezifisch kovalent an A-T reiche Regionen doppelsträngiger DNA bindet. Für die Messung wurden 2 ml der eingestellten Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 3000*g), mit 1 ml Lösung A (Tabelle 14) versetzt und 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 3000*g) und das Pellet mit 2 ml der Lösung B (Tabelle 14) versetzt. Nach 20 min Färbezeit wurden die Zellen gemessen.

Tabelle 14: Lösungen zur DNA-Färbung

Lösung	Zusammensetzung
NaCl-Phosphatpuffer (PBS)	0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl, pH 7,2
Lösung A	0,1 M Citronensäure, 0,5 % Tween 20 (v/V)
Lösung B	0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,24 mM DAPI (gelöst in 1 % v/V Dimethylformamid)

Um den PHB-Gehalt der Zellen zu analysieren, wurden diese mit dem Farbstoff Nilrot gefärbt. 40 μl einer Nilrot Stammlösung (1mg Nilrot/ml Aceton) wurden zu 2 ml der eingestellten Zellsuspension gegeben [Müller et al. 1999]. Nach genau 8 min Färbezeit wurden die Zellen analysiert. Das Gleichgewicht zwischen freiem und intrazellulär gebundenem Nilrot wird durch die Kristallisation des Farbstoffes gestört, da dieser stark hydrophob ist. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Zeitintervall der Färbung konstant zu halten.

2.5.3 Flowzytometrische Messung

Die flowzytometrischen Messungen wurden mit einem MoFlo Cell Sorter (DakoCytomation, Fort Collins, CO) durchgeführt, der mit zwei wassergekühlten

Argon-Ion-Lasern (Innova 90C und Innova 70C von Coherent, Santa Clara, CA) ausgerüstet war. In Tab. 15 sind die optischen und elektronischen Daten zur Vorwärtsstreulicht-, Seitwärtsstreulicht-, DAPI- und Nilrot-Messung zusammengefasst. Getriggert wurde über das Seitwärtsstreulicht. Zur Kalibrierung des Gerätes wurden *Fluorescence Beads* (Polybead Microspheres: $d=0,483 \mu\text{m}$, *flow check BB/Green compensation Kit*, Blue Alignment Grade, ref. 23520, Polyscience, USA) benutzt um einen CV Wert (*Coefficient of variation*) von ungefähr 2 % einzustellen. Zusätzlich wurde ein interner DAPI-gefärbter Zellstandard benutzt.

Tabelle 15: optische und elektronische Daten der flowzytometrisch gemessenen Parameter

Kenndaten	Vorwärts- streulicht FSC	Seitwärts- streulicht SSC	DAPI (<i>multi line</i> UV)	Nilrot
Laserlinie zur Anregung [nm]	488	488	333-360	488
Emission [nm]	488	488	480	615-645
Leistung (mW)	580	580	180	580

2.5.4 Auswertung der Messdaten

Die Auswertung und Darstellung der Messdaten erfolgte mit der Software SUMMIT[®] V3.1 (CYTOMATION, Fort Collins, USA). Die Darstellung erfolgte einparametrisch als Histogramm und zweiparametrisch als Dot Plot. Zur Bestimmung des PHB-Gehaltes und der Zellgröße wurden die Mean-Werte¹ ermittelt. Der prozentuale Anteil der DNA-Subpopulationen wurde über Gate-Setzung (einer elektronischen Markierung von Subpopulationen) entsprechend untersuchter Eigenschaften, ermittelt.

2.5.5 Sortieren von Zellen

Während des Sortierens mit dem Flowzytometer wurden die Zellen automatisch mit *Sheath Fluid* (KH_2PO_4 : 0,2593 g/l, KCl: 0,2833 g/l, Na_2HPO_4 : 2,3565 g/l, NaCl: 8,1322 g/l) soweit verdünnt, dass sie anschließend aufgereiht wie Perlen an einer Kette vermessen und sortiert werden konnten.

Die Zellen wurden mit der *Four-Way-Sort-Option* sortiert. Als Sortiermodus wurde der Modus mit der höchsten Genauigkeit (*single cell one*) gewählt. Dabei werden etwa 1000 Zellen/ Sekunde sortiert. Die Zellen wurden zuvor mit DAPI gefärbt und anhand ihres DNA-Gehaltes in, vorher sorgfältig mit Chromschwefelsäure gereinigte, Glasröhrchen sortiert. Anschließend wurden die sortierten Zellen bei 4°C 10 min und

¹ Mean-Wert: 50% der Ereignisse befinden sich rechts und links dieses Wertes.

12.000*g in Corex Zentrifugengläsern (mit Chromschwefelsäure gereinigt) zentrifugiert, in 100 µl Waschpuffer Puffer (Tab. 4, S. 24) resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bei -18°C eingefroren. Die Verwendung von Glasröhrchen während des Färbens und Sortierens ist wichtig, da die gefärbten Zellen sehr häufig an der hydrophoben Oberfläche der Plastegefäße binden und auf diese Weise für eine Analyse nicht mehr zur Verfügung stehen.

2.5.6 Mikroskopie

Der Zustand der Zellen und die Qualität der Markierungen der Zellinhaltsstoffe durch die Fluoreszenzfarbstoffe wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (ZEISS Axioskop, Deutschland) und Bildanalyse (Sony Kamera; Software: Openlab 3.1.4., Improvion, Lexington, MA, USA) überprüft. Als Anregungsquelle diente eine 100 W Quecksilberdampflampe. Die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe wurde durch Verwendung verschiedener Filtersätze sichtbar gemacht (Rotfluoreszenz: IF 170590, zur Visualisierung von Nilrot; Blaufluoreszenz: IF 17L420, zur Visualisierung von DAPI).

2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.6.1 Zellaufschluss

Die geernteten Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 4°C, 12000*g), zweimal mit Kalium-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) gewaschen und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250) in einem eisgekühlten Gefäß. Dabei wurde die Mikrospritze verwandt und die Proben sechsmal 30 sec mit der Intensität 4 beschallt. Zwischen den Beschallungszyklen wurde eine Kühlpause von 30 sec eingelegt. Die Zellen wurde anschließend zentrifugiert (20 min, 4°C, 18000*g) und der Überstand als Rohextrakt weiterverwandt.

2.6.2 Aktivitätsmessungen

Die Messungen der Enzymaktivitäten erfolgten in Glasküvetten (d=1 cm) mit einem Spektrometer von Shimadzu, dass auf 30 °C temperiert wurde. Es wurden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt und dann der Mittelwert verwendet.

2.6.2.1 Citrat-Synthase

Bei der durch die Citrat-Synthase katalysierten Kondensation von AcCoA mit Oxalacetat wird Citrat und CoA gebildet. Die endständige Sulfhydrylgruppe des CoA geht mit DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)), einem Thiolnachweisreagenz,

eine Verbindung ein, welche photometrisch nachgewiesen werden kann. Die Aktivität der Citrat-Synthase wurde nach einer von Müller-Kraft und Babel [1986] modifizierten Vorschrift von Srere et al. [1969] bestimmt. Im Ansatz befanden sich:

100 mM	Tris/HCl pH 7,6
0,18 mM	DTNB
0,10 mM	AcCoA
0,38 mM	Oxalacetat

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Rohextraktes gestartet und bei $\lambda=412$ nm wurde die Bildung des gemischten Disulfid aus CoA und DTNB fotometrisch verfolgt ($\epsilon=13,6$ cm²/ μ mol).

2.6.2.2 Isocitrat-Lyase

Die Isocitrat-Lyase kann durch Nachweis der Glyoxylatbildung mit Phenylhydrazin fotometrisch verfolgt werden [Dixon und Kornberg, 1959]. Die Aktivitätsbestimmung der Isocitrat-Lyase erfolgte nach einer Vorschrift von Wang et al. [2003]. Im Ansatz befanden sich:

50 mM	MOPS pH 7,5
5 mM	MgCl ₂
4 mM	Phenylhydrazinchlorid
2 mM	D,L-Isocitrat

Die Reaktion wurde durch die Zugabe vom Trinatrium-D,L-Isocitrat gestartet und Bildung von Glyoxylat-Phenylhydrazon wurde spektrophotometrisch bei $\lambda=324$ nm fotometrisch verfolgt ($\epsilon=14,63$ cm²/ μ mol).

2.6.2.3 Malat-Synthase

Die Malat-Synthase kann durch den Nachweis der Glyoxylat-abhängigen Freisetzung von CoA im Zuge der Kondensationsreaktion mit DTNB photometrisch verfolgt werden. Die Aktivitätsbestimmung der Malat-Synthase erfolgte nach der Vorschrift von Wang et al. [2003]. Im Ansatz befanden sich:

50 mM	HEPES pH 8,0
2 mM	EDTA
0,1 mM	DTNB
0,2 mM	Glyoxylsäure
0,2 mM	AcCoA

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Rohextraktes gestartet und bei $\lambda=412$ nm wurde die Bildung des gemischtes Disulfid aus CoA und DTNB fotometrisch verfolgt ($\epsilon=13,6$ cm²/ μ mol).

2.7 Chemikalien

Wenn nicht in Tabelle 16 angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma MERCK bezogen. Zur Herstellung wässriger Lösungen wurde immer bidestilliertes Wasser (Aqua bidest) verwandt.

Tabelle 16: Chemikalen und Hersteller

Hersteller	Substanz
Proteomanalyse	
GE Healthcare	IPG Puffer pH 3-10
GE Healthcare	CHAPS
GE Healthcare	Harnstoff
GE Healthcare	DTT
Sigma	PMSF
GE Healthcare	Triton-100
Flowzytometrie	
Sigma	DAPI
Sigma	Nilrot
Sigma	Dimethylformamid
Sigma	TWEEN 20
Blue Alignment Grade, ref. 23520, Polyscience, USA	<i>Fluorescence Beads</i> (Polybead Microspheres)

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten

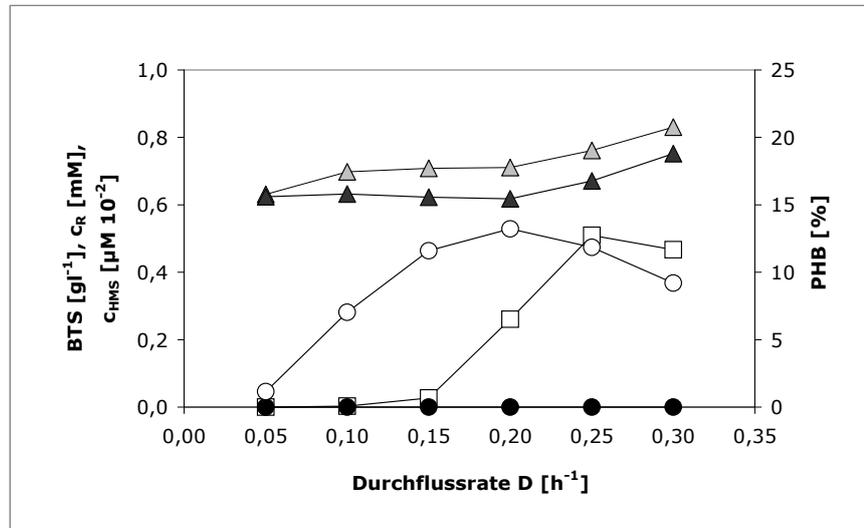
3.1.1 Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten beim kontinuierlichen Wachstum im Chemostat

Um die Anteile der Phenolabbauwege an der zellulären Biomasseproduktion und der PHB-Synthese zu untersuchen, wurde *C. necator* JMP134 kontinuierlich im Chemostat mit Phenol kultiviert und die Wachstumsparameter Biomassetrockensubstanz (BTS), Polyhydroxybutyrat (PHB)-Gehalt (%w/w), Substrat- und Intermediatkonzentrationen bestimmt. Zusätzlich erfolgten enzymatische Messungen, um die metabolischen Routen der Intermediate der Abbauwege verfolgen zu können. Dazu wurden die spezifischen Aktivitäten von Enzymen des Tricarbonsäurezykluses und des Glyoxylatzykluses bestimmt.

Zur Analyse der Wachstumsparameter wurde *C. necator* JMP134 kontinuierlich auf Phenol im Chemostat unter Kohlenstoff-limitierenden Bedingungen, mit $c_0=1$ g/l Phenol, kultiviert. Die verwendeten Parameter (2.1.3, S.21) wurden so gewählt, dass eine simultane Limitation durch Stickstoff, Phosphat und Sauerstoff ausgeschlossen werden konnte.

Wie aus Abb. 4a zu entnehmen, erfolgt bei einer Durchflussrate $D=0,15$ h⁻¹ das Zuschalten des *meta*-Weges, zuerkennen an der Akkumulation von Hydroxymuconsäure-Semialdehyd, einem Intermediat des *meta*-Weges. Bei Durchflussraten $D>0,3$ h⁻¹ kam es zur Akkumulation von Phenol und zum Auswaschen der Kultur (in Abb. 4a nicht gezeigt), weshalb die maximale Wachstumsgeschwindigkeit unter den gewählten Kultivierungsbedingungen bei $\mu_{\max}=0,3$ h⁻¹ lag. Obwohl die Zellen unter Kohlenstoff-limitierenden Bedingungen kultiviert wurden, und weder eine Stickstoff-, Phosphat- oder Sauerstoff-Limitation vorlag, wurde die Akkumulation von PHB in den Zellen detektiert. Die Synthese von PHB konnte sowohl während des Wachstums der Zellen im *ortho*-Weg, als auch nach dem Zuschalten des *meta*-Weges beobachtet werden. Dabei stieg mit zunehmender Durchflussrate D , welche im Chemostat der Wachstumsrate μ entspricht, der PHB-Gehalt der Zellen, bis dieser bei $D>0,2$ h⁻¹, nach dem Zuschalten des *meta*-Weges, wieder abnahm und der Anteil der PHB-freien Biomasse ($BTS_{\text{PHB-frei}}$) zunahm. Demzufolge ist die detektierte Biomassezunahme während des *ortho*-Weges auf die Synthese von PHB zurückzuführen, während nach dem Zuschalten des *meta*-Weges mehr Kohlenstoff in die Zellsynthese fließt, was sich in der Zunahme der PHB-freien Biomasse ausdrückt. Diese stieg ab einer Durchflussrate von $D=0,2$ h⁻¹, nachdem der PHB-Gehalt der Zellen abnahm, signifikant an. Die Phenolkonzentration im Fermenter lag während des gesamten Versuches unter der Nachweisgrenze.

a)



b)

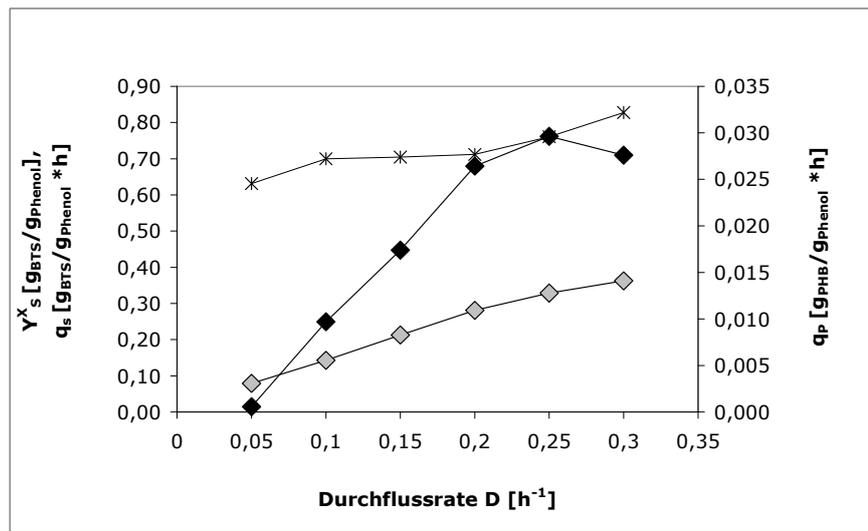


Abb. 4: Wachstumsparameter bei der kontinuierlichen Chemostat-Kultivierung von *C. necator* JMP134 auf Phenol. **a)** Δ Biomassetrockensubstanz (BTS), ▲ PHB-freie Biomassetrockensubstanz (BTS_{PHB-frei}), □ Hydroxyumuconsäure-Semialdehyd Konzentration (c_{HMS}), ○ Polyhydroxybutyrat (PHB), ● Phenolrestkonzentration (c_R), **b)** ◇ Substratverbrauchsrate (q_s), ◆ Produktbildungsrate (q_p), ✱ Ertragskoeffizient (Y_s^X).

Mit der Berechnung der spezifischen Substratverbrauchsrate q_s (Gleichung 3) und der Produktbildungsrate q_p (Gleichung 4) wird deutlich, dass die Synthese von PHB zum Teil wachstumsassoziiert erfolgt, d.h. Wachstum und PHB-Synthese finden simultan statt. Die Durchflussrate und die Produktbildungsrate korrelieren bis zu einer

Durchflussrate von $D=0,2 \text{ h}^{-1}$ miteinander, danach stagniert die Produktbildungsrate und nimmt ab. Eine deutliche Auftrennung zwischen der Produktbildungsrate und den Assimilationswegen ist dabei nicht zu erkennen.

Die Substratverbrauchsrate steigt während der gesamten Kultivierung mit zunehmender Durchflussrate.

$$q_s = D * (c_0 - c) / x \quad \text{Gleichung 3}$$

$$q_p = D * (P_0 - P) / x \quad \text{Gleichung 4}$$

Der Grund für die Synthese von PHB unter Kohlenstoff-limitierenden Bedingungen wird von Leonard und Lindley [1998] bei *Ralstonia eutropha* 335 in der geringen Aktivität der Enzyme des Glyoxylatzykluses vermutet. Der Glyoxylatzyklus bietet eine Möglichkeit Acetyl-CoA, auch ein Intermediat des *ortho*- und *meta*-Weges, in die Gluconeogenese einzuschleusen. Sonst kann Acetyl-CoA über den Citratzyklus oxidiert oder in PHB festgelegt werden. Um zu überprüfen, wofür Acetyl-CoA in *C. necator* JMP134 verwendet wird, wurden die Aktivitäten der Glyoxylatzyklus-Enzyme Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase während der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Enzymaktivitäten von Zellen, die auf Acetat und Fruktose kultiviert und in der exponentiellen Phase eines *Batch*-Versuches geerntet worden sind, bestimmt. Zellen, die auf Acetat kultiviert wurden, sollten eine hohe Aktivität beider Enzyme aufweisen, während der Glyoxylatzyklus in auf Fruktose kultivierten Zellen keine Rolle spielen dürfte.

Tabelle 17: Spezifische Aktivitäten der Glyoxylatzyklus-Enzyme Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase in *C. necator* JMP134 Zellen, die auf Phenol, Acetat oder Fruktose in einem *Batch*-Ansatz kultiviert wurden.

Wachstums- substrat	Malat-Synthase spez. Aktivität [U/mg _{Protein}]	Isocitrat-Lyase spez. Aktivität [U/mg _{Protein}]
Acetat	69,3 ± 6,8	216,6 ± 19,3
Phenol	84,7 ± 1,0	71,2 ± 3,2
Fruktose	22,7 ± 2,6	12,1 ± 1,0

Der Vergleich der Enzymaktivitäten von Zellen, die auf den verschiedenen Substraten in einem *Batch*-Ansatz kultiviert wurden zeigt, dass die Aktivität der Malat-Synthase bei Phenol kultivierten Zellen höher war, als die Aktivität derer, die auf Acetat

kultiviert worden waren. Die Malat-Synthase Aktivität von Zellen die auf Fruktose kultivierten worden waren, betrug im Vergleich zu Phenol-kultivierter Zellen nur $\frac{1}{4}$. Die Aktivität der Isocitrat-Lyase war unterdessen am höchsten in auf Acetat-kultivierten Zellen. In Zellen die auf Phenol wuchsen konnte nur $\frac{1}{3}$ der Aktivität gemessen werden. In Zellen die auf Fruktose wuchsen, betrug die Aktivität nur ein Bruchteil (4%). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Glyoxylatzyklus-Enzyme in Zellen, die auf Phenol kultiviert wurden, aktiv sind, wenn auch schwächer als in Zellen die auf Acetat kultiviert worden sind. Acetyl-CoA könnte also über die Gluconeogenese die Synthese von Zellbausteinen fließen.

Die Aktivität der Glyoxylatzyklus-Enzyme wurde anschließend in Zellen bestimmt, die im Chemostat auf Phenol ($c_0=1$ g/l) kultiviert worden waren, um zu überprüfen, ob es in Abhängigkeit des Phenolassimilationsweges Unterschiede gab. Wie aus der Abb. 5 zu entnehmen, nahm die Aktivität der Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase bis zu einer Durchflussrate von $D=0,15$ h^{-1} zu. Hier kommt es zum Zuschalten des *meta*-Weges. Danach sank die Aktivität der Isocitrat-Lyase Enzyme etwas, während die Aktivität der Malat-Synthase konstant blieb. Die gemessene spezifische Aktivität lag bei der Malat-Synthase (≈ 130 U) bereits während des *ortho*-Weges über dem Wert, der bei auf Acetat kultivierten Zellen bestimmt wurden (≈ 70 U).

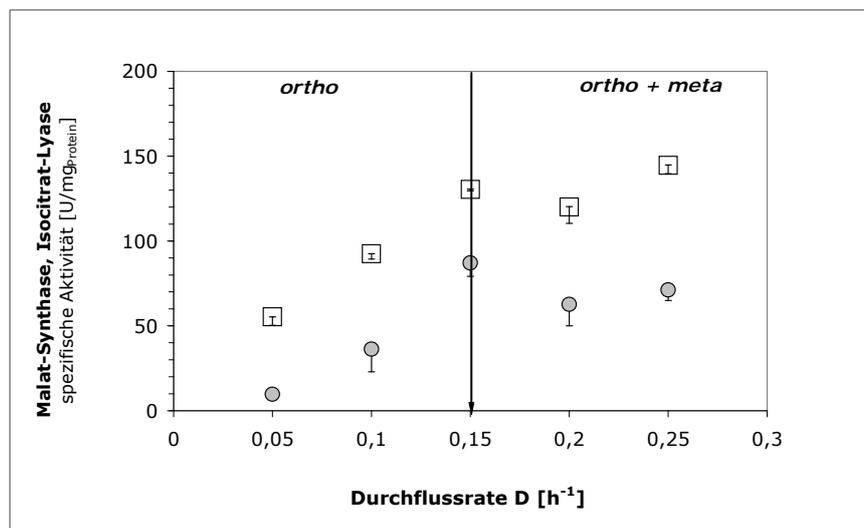


Abb. 5: Die spezifische Aktivität der ● Isocitrat-Lyase und □ Malat-Synthase während der kontinuierlichen Kultivierung von *C. necator* JMP134 auf Phenol im Chemostat.

Währenddessen lag die höchste gemessene spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase im Chemostat (max. 87 U) weit unter der bei auf Acetat kultivierten Zellen

gemessenen Aktivität (≈ 216 U), jedoch im Bereich der Aktivität die in *Batch* kultivierten Zellen auf Phenol bestimmt wurde (≈ 71 U).

Da bekannt ist, dass die Citrat-Synthase und die β -Ketothiolase (das erste Enzym der PHB Synthese) um das Substrat Acetyl-CoA konkurrieren [Mothes et al. 1997], wurde neben den Enzymen des Glyoxylatzyklus auch die spezifische Aktivität der Citrat-Synthase bestimmt (Abb. 6). Diese nahm anfänglich bis zu einer Durchflussrate von $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ ab, und im Anschluss, ab einer Durchflussrate von $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, kontinuierlich zu.

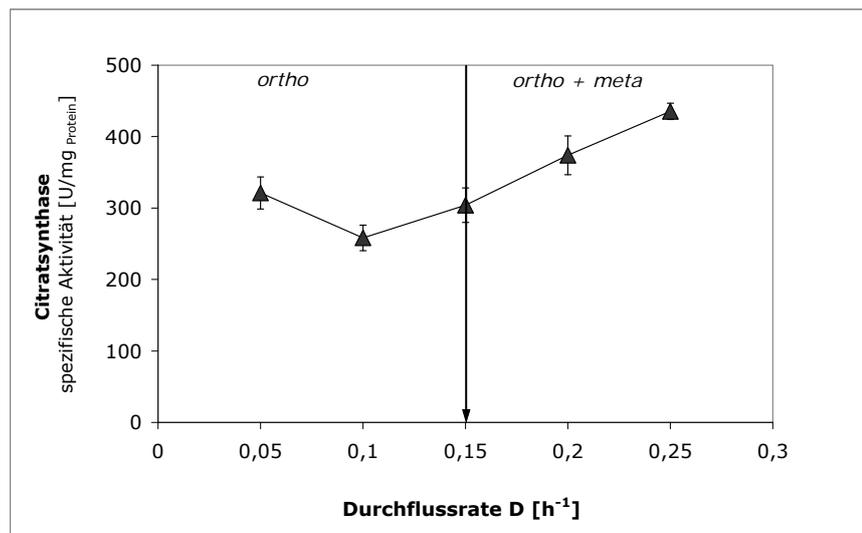


Abb. 6: Die spezifische Aktivität der ▲ Citrat-Synthase während der kontinuierlichen Kultivierung von *C. necator* JMP134 auf Phenol im Chemostat.

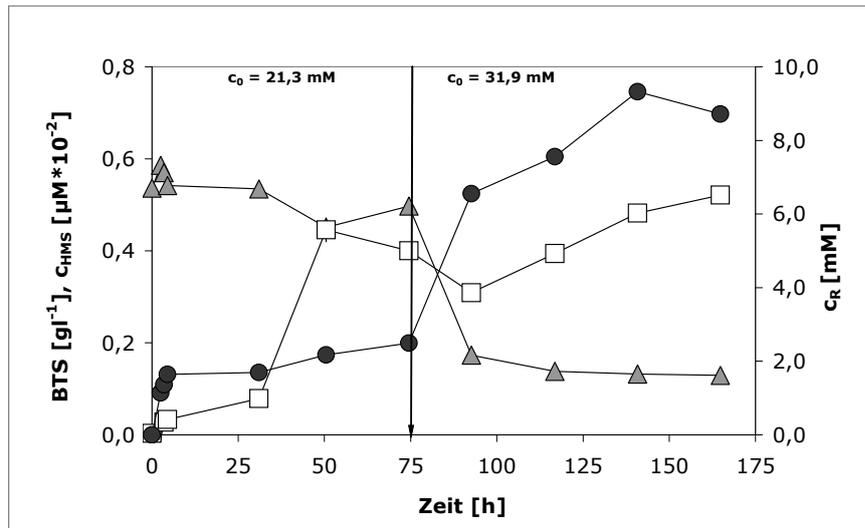
Die gemessenen Aktivitäten der Glyoxylatzyklus Enzyme zeigen, dass diese während des Wachstums auf Phenol aktiviert sind, und es einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen deren Aktivität und den Abbauwegen gibt. Während im *ortho*-Weg mit zunehmender Durchflussrate auch die Aktivität beider Enzyme zunimmt, bleibt sie nach dem Zuschalten des *meta*-Weges konstant. Die Citrat-Synthase-Aktivität steigt hingegen mit zunehmender Wachstumsrate, nach der Induktion des *meta*-Weges..

3.1.2 Wachstumsparameter beim kontinuierlichen Wachstum auf Phenol im pH-Auxostat

Der Einfluss zunehmender Phenolkonzentrationen auf das Wachstum von *C. necator* JMP134 wurde an Zellen die kontinuierlich im pH-Auxostat kultiviert wurden untersucht. Der pH-Auxostat wurde ausgehend von einem Chemostat bei $D=0,05 \text{ h}^{-1}$

gestartet (siehe 2.1.4, S. 21). Die Proben wurden bei unterschiedlichen Phenolrestkonzentrationen (c_R) entnommen. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abb. 7a,b wiedergegeben. Der PHB-Gehalt wurde flowzytometrisch mit Hilfe des Farbstoffes Nilrot bestimmt, da auf Grund der geringen BTS und des kleinen Fermentervolumens (0,3 l) keine engmaschige Überwachung möglich gewesen wäre.

a)



b)

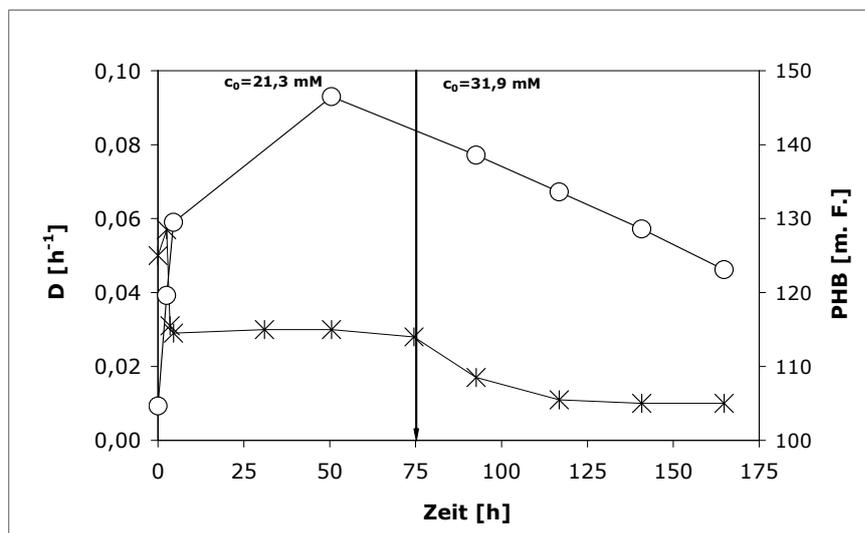


Abb. 7: Wachstumsparameter von *C. necator* JMP134 bei der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol im pH-Auxostat. a) \triangle Biomassetrockensubstanz (BTS), \square Hydroxymuconsäure-Semialdehyd Konzentration (c_{HMS}), \bullet Phenolrestkonzentration (c_R) b) \circ PHB und \times Durchflussrate (D).

Mit dem Start des pH-Auxostat zum Zeitpunkt $t = 0$ h stiegen in den ersten $2\frac{3}{4}$ Stunden sowohl die BTS von 0,53 g/l auf 0,59 g/l als auch der PHB-Gehalt der Zellen. Dieses Verhalten war nicht unerwartet, da die Zellen vorher im Kohlenstoff-limitierten Chemostat kultiviert wurden, nutzten sie nun den Überschuss an Kohlenstoff, um sich zu vermehren und PHB zu synthetisieren. Gleichzeitig stiegen ebenfalls die Durchflussrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ auf $0,057 \text{ h}^{-1}$ und die Substratrestkonzentration von $c_R=0$ mM auf $c_R=1,1$ mM. HMS wurde ab $t=3\frac{1}{2}$ h detektiert, der *meta*-Weg demzufolge zugeschaltet. Die Substratrestkonzentration lag zu diesem Zeitpunkt bei $c_R=1,7$ mM, Durchflussrate als auch BTS nahmen ab.

Nach dem Erhöhen der Phenolkonzentration im Zulauf ($t=75$ h) auf $c_0=31,9$ mM nahmen sowohl die Durchflussrate als auch die BTS (von 0,49 g/l auf 0,13 g/l) weiter ab (bis 80 %), während die Substratrestkonzentration auf $c_R=8,7$ mM anstieg. Der PHB-Gehalt der Zellen nahm nach der Induktion des *meta*-Weges weiter zu, nachdem die Phenolrestkonzentration 2 mM überstieg sank der PHB-Gehalt.

Die Informationen die durch die Bestimmung der Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten gewonnen werden konnten, geben nur begrenzt Auskunft über die zellulären Vorgänge, und sind unzureichend um die in dieser Arbeit gestellten Fragen zu beantworten. Aus diesem Grund erfolgten weitere Untersuchungen auf der Proteinebene.

3.2 Proteomanalyse

Der Begriff Spots wurde nachfolgend für nicht identifizierte Proteine genutzt, während immer dann von Proteinen gesprochen wird, wenn eine Identifizierung via Massenspektrometrie erfolgreich war. Bei der Auswertung der untersuchten Proteinmuster ging es um qualitative und quantitative Unterschiede. Die quantitativen Unterschiede wurden durch die Änderungen des normalisierten Spotvolumens (n.V.³) eines Spots analysiert. Einige Spots, die in den silbergefärbten Gelen detektiert wurden, waren in den Coomassie gefärbten präparativen Gelen nicht sichtbar, da sich beide Färbungen in Sensivität und Spezifität unterscheiden. Bei diesen Spots wurde versucht, die Proteine direkt aus den silbergefärbten Gelen zu identifizieren. Dies gelang allerdings nur bei Spots mit einem ausreichenden n.V.. Der Vergleich der Proteinmuster unterschiedlich kultivierter Zellen erfolgte im Bezug auf Abbauweg und Phenolkonzentration. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jeweils drei Gele aus drei parallelen Versuchen ausgewertet und nur Spots, welche sich in allen drei Gelen veränderten, als solche detektiert. Spots galten als verstärkt bzw. abgeschwächt, wenn ihr n. V. mindestens um das 3fache zu- bzw. abnahm.

Es konnten durchschnittlich 700 Spots im pI-Bereich 3-10 in den silbergefärbten Gelen von *C. necator* JMP134, unabhängig von der C-Quelle, detektiert werden. Die Erstellung eines Pseudo-2D-Gels [www.jvirgel.de] zeigte, dass theoretisch 3000 Proteine in einem 2D-Gel im pI-Bereich 3-10 und MW-Bereich 15-120 kDa detektiert werden können. Im Vergleich zu veröffentlichten 2D-Gelen von anderen Bakterienspezies stellt die hier detektierte Spotanzahl einen guten Durchschnitt dar [Santos et al 2004, Kurbatov et al. 2005].

3.2.1 Exprimierte Proteine beim Phenolmetabolismus via *ortho*-Weg

Proteine, die beim Wachstum im *ortho*-Weg auf Phenol als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle neu exprimiert oder verstärkt wurden, konnten durch den Vergleich mit dem Proteinmuster auf Pyruvat kultivierter Zellen detektiert werden.

Die Analyse der 2D-Gele zeigte große Ähnlichkeit im Expressionsprofil der Proteine von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Pyruvat oder Phenol (Abb. 8).

³ n.V = Das normalisierte Volumen eines Spots ist gleich das Verhältnis seiner Intensität zur Gesamtintensität aller Proteine eines Gels.

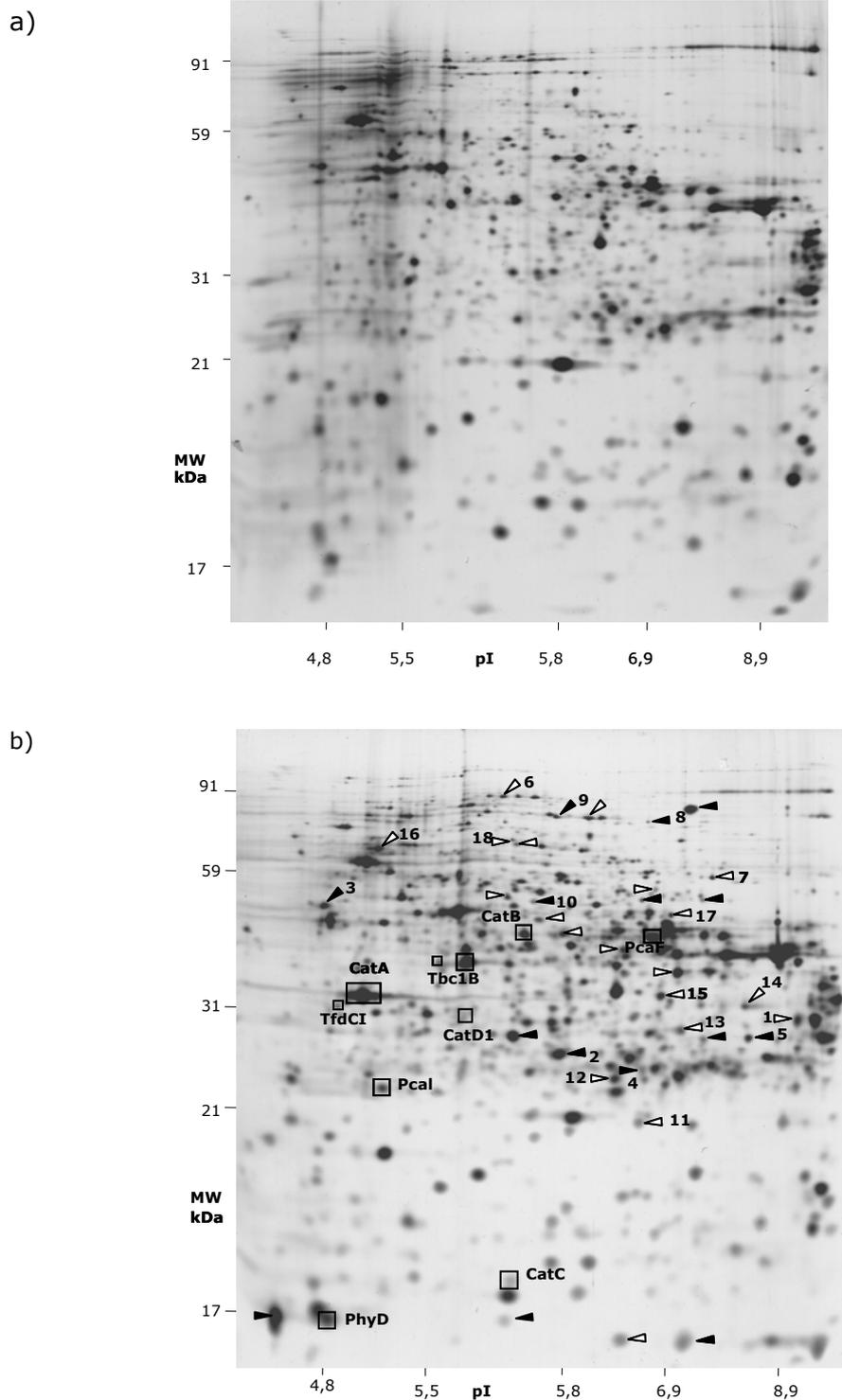


Abb. 8: Proteinmuster von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf a) Pyruvat (Kontrolle) und b) Phenol (im *ortho*-Weg). Die Kultivierung erfolgte im Chemostat bei $D=0,1 \text{ h}^{-1}$. Vierecke: Enzyme des Phenolmetabolismus (neu detektiert); schwarze Pfeile: neu detektierte Spots; weiße Pfeile: mindestens um das dreifache verstärkte Spots. Die identifizierten Proteine sind in Tab. 18 aufgelistet.

Ergebnisse

Tabelle 18: Beim Wachstum auf Phenol (*ortho*-Weg) neu detektierte oder verstärkt exprimierte Proteine von *C. necator* JMP134. Die Zuordnung der Proteinfunktionen erfolgt mit Hilfe der *C. necator* JMP134 Genomdaten (TIGR, <http://www.tigr.org>).

Funktion	Spot- nummer	Gen- name	Ex- pression	mol. Masse kDa/pI	Accession Nummer	Score	% Sequence Coverage
Enzyme des Phenolmetabolismus							
Phenolhydroxylase-Komponente		<i>tbc1B</i>	n	37,1/ 5,5	AAZ65026	320	21
Phenolhydroxylase-Komponente		<i>phyD</i>	n	13,1/ 4,7	AAZ61068	105	11
Catechol-1,2-Dioxygenase		<i>catA</i>	n	32,5/ 5,0	AAZ61070	240	21
Muconat-Cycloisomerase		<i>catB</i>	n	43,0/ 7,3	AAZ61054	320	21
Muconolacton-Isomerase		<i>catC</i>	n	14,9/ 5,7	AAZ61055	111	34
Oxadipat-Enollacton-Hydrolase		<i>catD1</i>	n	32,5/ 5,5	AAZ61057	78	13
Oxadipat-Succinyl-CoA-Transferase		<i>pcaI</i>	v	24,8/ 5,2	AAZ64931	75	24
Oxadipyl-CoA-Thiolase		<i>pcaF</i>	v	42,7/ 6,5	AAZ64932	126	16
Chlorcatechol-1,2-dioxygenase		<i>tfdCI</i>	n	31,7/ 4,9	YP025387	95	34
Translation/ Proteinfaltung							
ribosomales Protein S1	16	<i>rspA</i>	v	61,2/ 5,2	AAZ61930	1679	46
ribosomales Protein S2	13	<i>rspB</i>	v	29,9/ 7,3	AAZ61246	156	15
Peptidyl-Prolyl-Isomerase	7	<i>surA</i>	v	54,8/ 8,0	AAZ59880	70	11
Aminosäure- und Purinbiosynthese, Anabolismus							
Adenylsuccinat-Synthetase	10	<i>purA</i>	n	51,7/ 5,7	AAZ61440	338	22
Cystein-Synthase	15	<i>cysK</i>	v	35,0/ 6,7	AAZ64091	103	15
Glycin-Hydroxymethyltransferase	17	<i>glyA</i>	v	46,5/ 7,1	AAZ60170	121	9
Phosphopyruvat-Hydratase	3	<i>eno</i>	n	45,3/ 4,7	AAZ60469	338	23
3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase	12	<i>fabG</i>	n	26,1/ 6,0	AAZ64933	172	18

Ergebnisse

Funktion	Spot- nummer	Gen- name	Ex- pression	mol. Masse kDa/pI	Accession Nummer	Score	% Sequence Coverage
Energiemetabolismus							
Aconitase B	6	<i>acnB</i>	v	86,2/ 5,6	AAZ62822	51	4
Succinyl-CoA-Synthetase α Untereinheit	14	<i>sucD</i>	v	32,6/ 7,6	AAZ59913	109	17
NADH-Quinon-Oxidoreduktase	8	<i>nuoG</i>	n	82,5/ 6,3	AAZ60346	451	18
Malat-Dehydrogenase (decarboxylierend)	18	<i>maeB2</i>	v	65,6/ 5,7	AAZ62208	64	6
Transport							
TonB abhängiger Siderophor-Rezeptor	9	<i>Reut B4659</i>	n	83,9/ 6,5	AAZ64008	78	7
hypothetisches Protein (putativer ABC-Transporter, periplasmatische Komponente)	5	<i>Reut B5213</i>	n	28,8/ 8,5	AAZ64559	84	22
Andere							
Alkylhydroperoxid-Reduktase	4	<i>ahpC</i>	n	26,5/ 6,4	AAZ64332	85	6
Nitroreduktase	11	<i>nrp</i>	n	23,6/ 6,4	AAZ60424	357	40
uncharakterisiertes Protein UPF65	1	<i>Reut A1503</i>	n	30,7/ 9,3	AAZ60870	315	10
Protein mit unbekannter Funktion DUF 849	2	<i>Reut A1631</i>	n	27,9/ 5,8	AAZ60997	410	23

n: neu detektierte Proteine

v: mindestens 3-fach verstärktes Protein

Im Vergleich zu Zellen die auf Pyruvat kultivierten wurden, sind im Phenolproteom 24 neue und 21 verstärkte Spots detektiert worden, von denen insgesamt 27 via Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Die Unterschiede sind in Abb. 8b dargestellt und die identifizierten Proteine sind in Tabelle 18 aufgelistet. Sie wurden entsprechend ihrer Funktion den Kategorien Enzyme des i) Phenolmetabolismus, ii) der Translation/Proteinfaltung, iii) der Aminosäure- und Purinbiosynthese und des Anabolismus, iv) des Energiemetabolismus, v) des Transports und vi) andere geordnet.

i) Enzyme des Phenolmetabolismus

Acht der identifizierten Proteine wurden als Enzyme des Phenolabbaus identifiziert. Während nur zwei Komponenten von zwei unterschiedlichen Multikomponenten-Monooxygenasen identifiziert wurden, konnten vom nachfolgenden Abbauweg des Catechols zu den Tricarbonsäure-Intermediaten Succinat und Acetyl-CoA alle Enzyme im 2D-Gel identifiziert werden (vgl. Abb. 1). Zusätzlich zu den chromosomal kodierten Enzymen des *ortho*-Weges wurde die Plasmid kodierte Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase (*tfdCI*) beim Wachstum auf Phenol induziert.

ii) Translation/ Proteinfaltung

Es wurden zwei ribosomale Proteine S1 und S2 identifiziert, die beim Wachstum auf Phenol im *ortho*-Weg verstärkt exprimiert wurden. S1 wird durch *rspA* kodiert und ist das größte der ribosomalen Proteine. Anhand von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass S1 essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen ist, da es an der Bindung der mRNA an die 30S Untereinheit während der Initiation der Translation und der Elongation beteiligt ist [Sorensen et al 1998]. S1 bindet auch tmRNS, ein Moleküle das die Eigenschaften von t- und mRNA vereint [Wower et al. 2000].

Die periplamatische Peptidyl-Prolyl-Isomerease SurA ist als Chaperon an der Faltung von äußeren Membranproteinen im Periplasma beteiligt [Lazar et al. 1996]. Peptidyl-Prolyl-Isomerasen katalysieren die *cis-trans* Umwandlung von Peptidyl-Prolin-Bindungen. In *E. coli* ist die Aktivität von SurA vermutlich für die richtige Montage des Zellwand synthetisierenden Apparates verantwortlich [Lazar et al. 1998].

iii) Aminosäure- und Purinbiosynthese, Anabolismus

Verstärkt exprimiert wurden auch Enzyme des Aminosäuremetabolismus, die Cystein-Synthase CysK (Serinsynthese) und die Glycin-Hydroxymethyltransferase GlyA (Glycinsynthese). Die verstärkte Expression von Enzymen des Aminosäuremetabolismus wurde bisher mehrfach bei der Analyse von Stressantworten auf organische Lösungsmittel oder Xenobiotika beobachtet [Santos et al. 2004, Segura et

al. 2005, Benndorf et al. 2006]. Duche et al. [2002] beobachtete z. B. unter Salzstress eine verstärkte Expression von CysK in *Listeria monocytogenes*.

Neben der Phosphopyruvat-Hydratase, einem dimeren Enzym, das die Hydratisierung von Phosphoenolpyruvat zu 2-Phospho-D-Glycerate katalysiert, wurde auch die Adenylsuccinat-Synthetase, ein Enzym der Purinbiosynthese, verstärkt exprimiert. Die Adenylsuccinat-Synthetase katalysiert den ersten Schritt der Umwandlung von IMP zu AMP, und wird durch die Konzentration von GTP reguliert [Rappu et al. 1999].

Des Weiteren wurde die 3-Oxoacyl-ACP-Reduktase (FabG) (3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktase) identifiziert, die bei der Fettsäuresynthese die NADPH abhängige Reduktion von Acetoacetyl-ACP zu Hydroxybutyryl-ACP katalysiert. Ren et al. [2000] vermuten, dass FabG in *Pseudomonas aeruginosa* eine Rolle bei der Synthese von PHA spielt, da es augenscheinlich Intermediate der β -Oxidation, vermutlich 3-Ketoacyl-CoA, auf die PHA-Polymerase überträgt.

iv) Energiemetabolismus

Von den identifizierten Proteinen können vier dem Energiemetabolismus zugeordnet werden. Die Aconitase, ein Enzym des Citratzykluses, katalysiert die reversible Isomerisierung von Citrat und Isocitrat mit cis-Aconitat als Intermediat. Sie besitzt in ihrer aktiven Form ein kovalent gebundenes [4Fe-4S]-Eisen-Schwefel-Cluster. Varghese et al. [2003] beobachteten in *E. coli*, dass die Aconitase sehr sensitiv auf viele chemische Oxidantien reagiert. Die Succinyl-CoA-Synthetase ist ebenfalls ein Enzym des Citratzyklus und hydrolysiert die energiereiche Verbindung Succinyl-CoA unter Kopplung der Synthese eines ATP. Die decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (Malic Enzym) katalysiert die Oxidation von Malat zu Pyruvat, wobei NADH generiert wird. Die Protonen pumpende NADH-Quinon-Oxidoreduktase ist der erste Energietransduzierende Komplex in der Atmungskette der meisten Pro- und Eukaryoten [Anraku und Gennis 1987, Neijssel und Teixeira de Mattos 1994]. In *E. coli* besteht dieser, durch 14 Strukturgene (*nuoA-nuoN*) kodierte Enzym-Komplex, aus drei Subkomplexen: peripheres, verbindendes- und Membranfragment. Das hier identifizierte NuoG gehört zu den peripheren (auch als NADH-Dehydrogenase Fragment bezeichneten) Komponenten [Leif et al. 1995]. Falk-Krzesinski und Wolfe [1998] postulierten, dass NuoG essentiell für die Funktion des Komplexes ist und bei der Regulation der *nuo* Expression eine Rolle spielt.

v) Transport

Neben Enzymen des Phenolmetabolismus und der Aminosäure- und Purinbiosynthese sowie des Energiemetabolismus, wurde ein TonB-abhängiger Siderophor-Rezeptor neu

exprimiert, welcher für den aktiven Transport von Eisen, gebunden an ein Siderophor, durch die äußere Membran zuständig ist. Des Weiteren wurde die periplasmatische Komponente eines nicht näher charakterisierten ABC-Transporters identifiziert, die neu verstärkt wurde.

vi) andere

Die Expression der Untereinheit C der Alkylhydroperoxid-Reduktase (AhpC) nahm beim Wachstum auf Phenol im *ortho*-Weg ebenfalls zu. AhpC reduziert organische Hydroperoxide, die während des Wachstums entstehen, zu den jeweiligen untoxischen Alkoholformen [Ochsner et al. 2001]. Eine verstärkte Expression von AhpC wurde u. a. beim Wachstum von *Pseudomonas putida* KT2440 mit Phenol, Toluol und MTBE beobachtet [Santos et al. 2004, Fukomori und Kishii 2001, Krayl et al. 2003]. Die Nitroreduktase, ebenfalls verstärkt exprimiert, unterliegt wie AhpC, der Regulation durch das OxyR Regulon [Lushchak 2000]. Beide sind Proteine der oxidativen Stressantwort.

3.2.2 Exprimierte Proteine beim Phenolmetabolismus via *ortho*- und *meta*-Weg

Die Analyse der Proteinexpression in Abhängigkeit des Abbauweges von Phenol erfolgte mit Proben aus dem Chemostat bei unterschiedlichen Durchflussraten ($D=0,1 \text{ h}^{-1}$ und $D=0,25 \text{ h}^{-1}$), da der *meta*-Weg erst bei Durchflussraten größer $D=0,15 \text{ h}^{-1}$ zugeschaltet wird (vergleiche Abb. 4).

Der Vergleich der entsprechenden Proteinmuster zeigte neben der Induktion von 25 neuen und der verstärkten Expression von 6 Spots, auch die Abnahme der Expression von 6 Spots. Die Unterschiede sind in dem Proteinmuster in Abb. 9 dargestellt. Unter den 20 identifizierten Proteinen (Tabelle 19) sind Proteine i) des Phenolmetabolismus, ii) der Translation und Proteinfaltung, iii) des Purinmetabolismus, iv) des Transports, v) des Energiemetabolismus und vi) Proteine, die an anderen Prozessen beteiligt sind.

i) Enzyme des Phenolmetabolismus

Neben der offensichtlichen Induktion der Enzyme des *meta*-Weges bei Wachstum auf Phenol mit höheren Wachstumsraten, wurden drei weitere Komponenten von zwei unterschiedlichen Phenol hydroxylierenden Multikomponenten-Monooxygenasen (PhtB, TbcD, TbcF) induziert. Während PhtB und TbcD Proteine der oligomeren Oxygenase-Komponenten kodieren, kodiert TbcF eine Reduktase-Komponente.

Daneben wurden zwei separate Spots als Catechol-2,3-Dioxygenase identifiziert, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes unterschieden.

Der Abbau von Hydroxymuconsäure-Semialdehyd, dem Produkt der Catechol-2,3-Dioxygenase, kann über eine Hydrolase (unter Abspaltung von Formiat) oder Dehydrogenase erfolgen. Pieper et al. [1988] detektierten in *C. necator* JMP134 nur die Hydrolase.

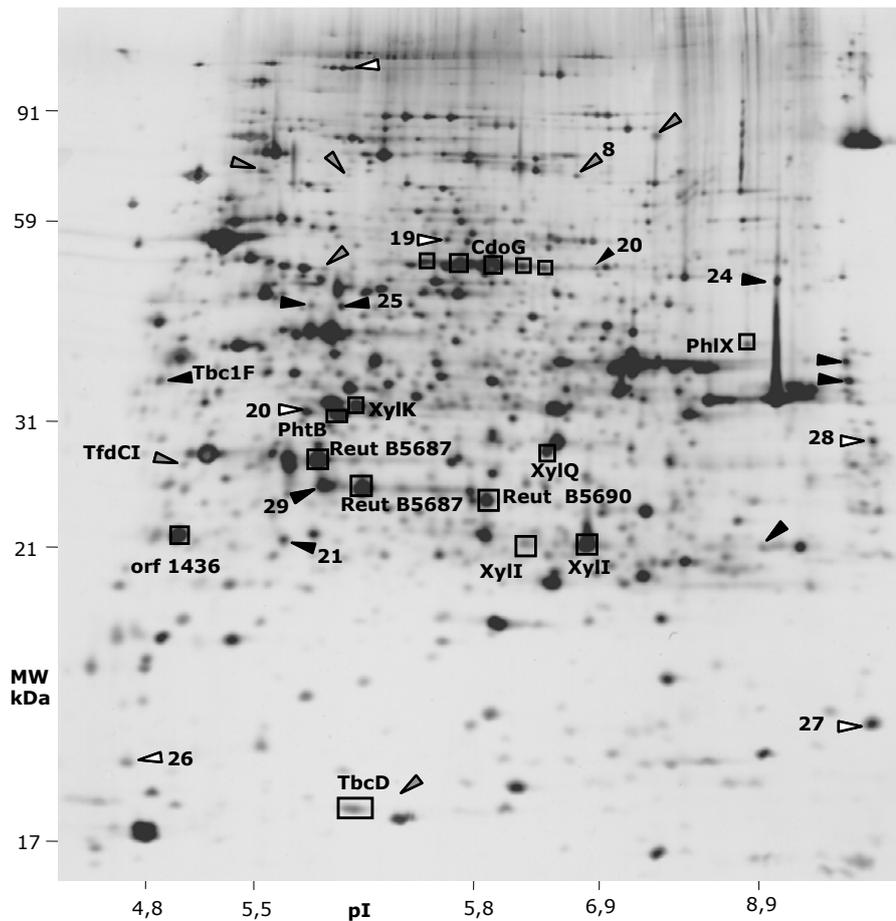


Abb. 9: Proteinmuster von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Phenol im *meta*-Weg. Die Kultivierung erfolgte im Chemostat bei $D=0,25 \text{ h}^{-1}$. Als Referenz diente das Proteinmuster auf Phenol kultivierter Zellen bei $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ (Abb. 8, S.46). Vierecke: Enzyme des Phenolabbaus *meta*-Weg (neu detektiert); schwarze Pfeile: neu induzierte Spots; weiße Pfeile: mindestens um das dreifache verstärkte Spots, graue Pfeile: mindestens um das dreifache abgeschwächte Spots. Die identifizierten Proteine sind in Tab. 19 wiedergegeben.

Ergebnisse

Tabelle 19: Beim Wachstum auf Phenol mit dem Zuschalten des *meta*-Wegs neu detektierte oder um mindestens das 3fache verstärkt exprimierte Proteine von *C. necator* JMP134. Die Zuordnung der Proteinfunktionen erfolgt mit Hilfe der *C. necator* JMP 134 Genomdatenbank (TIGR, <http://www.tigr.org>).

Funktion	Spot- nummer	Gen- name	Ex- pression	mol. Masse kDa/pI	Accession Nummer	Score	% Sequence Coverage
Enzyme des Phenolmetabolismus							
Phenolhydroxylase-Komponente		<i>phtB</i>	n	38,2/ 5,4	AAZ61065	156	15
Phenolhydroxylase-Komponente		<i>tbcD</i>	n	13,5/ 5,4	AAZ65029	162	36
Ferredoxin-Oxidoreduktase		<i>tbc1F</i>	n	38,5/ 4,8	AAZ65030	104	7
Catechol-2,3-Dioxygenase		<i>Reut B5687</i>	n	33,7/ 5,2	AAZ65032	69	19
Hydroxymuconsäure-Semialdehyd- -Dehydrogenase		<i>cdoG</i>	n	52,1/ 5,8	AAZ65034	202	25
Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Hydrolase		<i>Reut B5690</i>	n	30,7/ 5,9	AAZ65035	278	18
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase		<i>xylI</i>	n	28,3/ 6,2	AAZ65037	75	6
2-Oxopent-4-Enoate-Hydratase		<i>orf 1436*</i>	n	28,1/ 4,9	ZP_00167853	100	23
4-Hydroxy-2-Ketovalerat-Aldolase		<i>xylK</i>	n	38,47 5,8	AAZ65166	120	12
Phenol Transportfacilitator		<i>phIX</i>	n	47,7/ 8,8	AAZ65017	91	17
Aldehyd-Dehydrogenase		<i>xylQ</i>	n	32,7/ 6,1	AAZ65167	536	45
Translation/ Proteinfaltung							
ribosomales Protein L10	27	<i>rspl</i>	v	18,0/ 9,15	AAZ62551	521	39
Peptidase S1C	20	<i>degQ</i>	n	50,6/ 6,2	AAZ64906	112	10
Purinbiosynthese							
SAICAR-Synthetase	29	<i>purC</i>	v	33,3/ 5,3	AAZ59938	187	16
Transport							
Transport Protein	26	<i>exbD</i>	v	15,1/ 4,6	AAZ61600	80	10

Ergebnisse

Funktion	Spot- nummer	Gen- name	Ex- pression	mol. Masse kDa/pI	Accession Nummer	Score	% Sequence Coverage
Energie							
NAD abhängige Epimerase	21	<i>Reut B3470</i>	n	27,5/ 5,4	AAZ62828	118	19
putative Styrenoxygenase-Untereinheit	25	<i>Reut B3469</i>	n	48,0/ 5,5	AAZ62827	77	10
Nitrit/Sulfit-Reduktase	19	<i>cysI</i>	v	63,3/ 5,7	AAZ62057	115	8
andere							
Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase	28	<i>rbfA</i>	v	32,8/ 5,4	AAZ60096	449	44
unchar. ProteinDUF0065	22	<i>Reut A0166</i>	n	34,3/ 9,4	AAZ59548	286	22

n: neu detektierte Proteine

v: um mindestens das 3fache verstärkte Proteine

*: ORF mit bekannter Funktion

Im vorliegenden 2D-Gel konnten sowohl die Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Hydrolase als auch die Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase nachgewiesen werden, wobei bei letzterer 5 Isoformen, die sich in ihrem pI-Wert unterschieden, detektiert wurden. Außer der Oxalacronat-Isomerase wurden alle weiteren Enzyme des *meta*-Abbauweges identifiziert (Abb. 9), inklusive der Acetaldehyd-Dehydrogenase, die Acetaldehyd zu Acetyl-CoA umsetzt.

ii) Translation/ Proteinfaltung

Das ribosomale Protein L10 und die Peptidase S1C (DegQ), sind Proteine die in die Translation und Proteinfaltung involviert sind und nach dem Zuschalten des *meta*-Weges verstärkt exprimiert werden. DegQ, eine periplasmatische Serin-Endoprotease, gehört zur HtrA Proteinfamilie, die als ATP unabhängige Chaperon-Proteasen für die richtige Faltung von Proteinen im periplasmatischen Raum zuständig sind [Kim und Kim 2005, Waller und Sauer 1996, Kolmar et al 1996].

iii) Purinbiosynthese

SAICAR Synthetase (Phosphor-Ribosylaminoimidazol-Succinocarboxamide-Synthetase) synthetisiert den achten Schritt der Purinbiosynthese, die Umsetzung von ATP, L-Aspartate und 5-Aminoimidazole-4-Carboxyribonucleotide zu 5-Aminoimidazole-4-(N-Succinylcarboxamide) Ribonucleotide (SAICAR), ADP und Phosphat.

iv) Transport

ExbD ist am Transport von Siderophoren durch die äußere Membran beteiligt und wird in den Zellen nach zuschalten des *meta*-Weges verstärkt exprimiert. ExbD ist nur als Komplex mit TonB aktiv und erhöht damit vermutlich dessen Aktivität [Fischer et al 1989].

v) Energie

Zur Gruppe v) der verstärkt oder neu exprimierten Proteine gehört neben der nicht näher charakterisierten NAD abhängigen Epimerase auch eine Oxygenase Untereinheit einer putativen Styrenmonooxygenase.

vi) andere

Die Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase (RbfA) ist das erste Enzym bei der Synthese von (dTDP)-L-Rhamnose, einer wichtigen Zellwandkomponente in vielen Bakterien, die als verstärkt exprimiert detektiert wurde. L-Rhamnosyl-Reste sind

oftmals Komponenten in der Lipopolysaccharidschicht gram negativer Bakterien [Eun et al. 2001].

abgeschwächte Proteine

Neben neu detektierten und verstärkten Spots wurden auch 6 Spots, deren Expression abnahm, detektiert. Zu diesen gehörten die Chlorocatechol-1,2-Dioxygenase, ein Enzym des modifizierten *ortho*-Weges (Muconolacton-Isomerase) und die NADH-Quinon-Oxidoreduktase (NuoG). Die anderen konnte bisher nicht identifiziert werden.

3.2.3 Proteinexpression in Abhängigkeit der Phenolkonzentration: Vergleich Chemostat – pH-Auxostat

Der Einfluss der Phenolkonzentration auf das Proteinmuster von *C. necator* JMP134 wurde durch den Vergleich zweier Proben, die mit einer Phenolrestkonzentration von a) $c_R=0$ mM und b) $c_R=8,74$ mM kontinuierlich kultiviert wurden, untersucht. Dabei wurde die Induktion von 26 neuen Spots beobachtet, von denen 15 Spots auch im Proteinmuster von im Chemostat kultivierten Zellen mit induziertem *meta*-Weg detektiert wurden. Des Weiteren wurden vier Spots als verstärkt exprimiert detektiert (Abb. 10 und Tab. 20).

i) Enzyme des Phenolmetabolismus

Neben den Abbauenzymen des *meta*-Weges, die außer der Ferredoxin-Oxidoreduktase Tbc1F alle detektiert wurden, konnte eine weitere Komponente einer Phenolhydroxylase (PhIO), die in Chemostat kultivierten Zellen nicht detektiert wurde, identifiziert werden.

ii) Translation

Das ribosomale Protein L10, welches auch in Chemostat kultivierten Zellen mit induziertem *meta*-Weg identifiziert wurde, wurde auch in Zellen, die im pH-Auxostat kultiviert wurden, verstärkt exprimiert.

iii) Aminosäuresynthese

Die Acetylnithin-Aminotransferase (ArgD) katalysiert den Aminogruppentransfer von Acetylnithin zu α -Ketoglutarat, und wurde in Zellen, die bei einer Phenolrestkonzentration von $c_R=8,71$ mM kultiviert wurden, verstärkt exprimiert.

iv) Energie

Von der bereits im *meta*-Weg-Proteom identifizierten, als putative Styrenmonooxygenase charakterisierten Oxygenase-Untereinheit wurden drei weitere Isoformen identifiziert, die sich in Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt unterschieden.

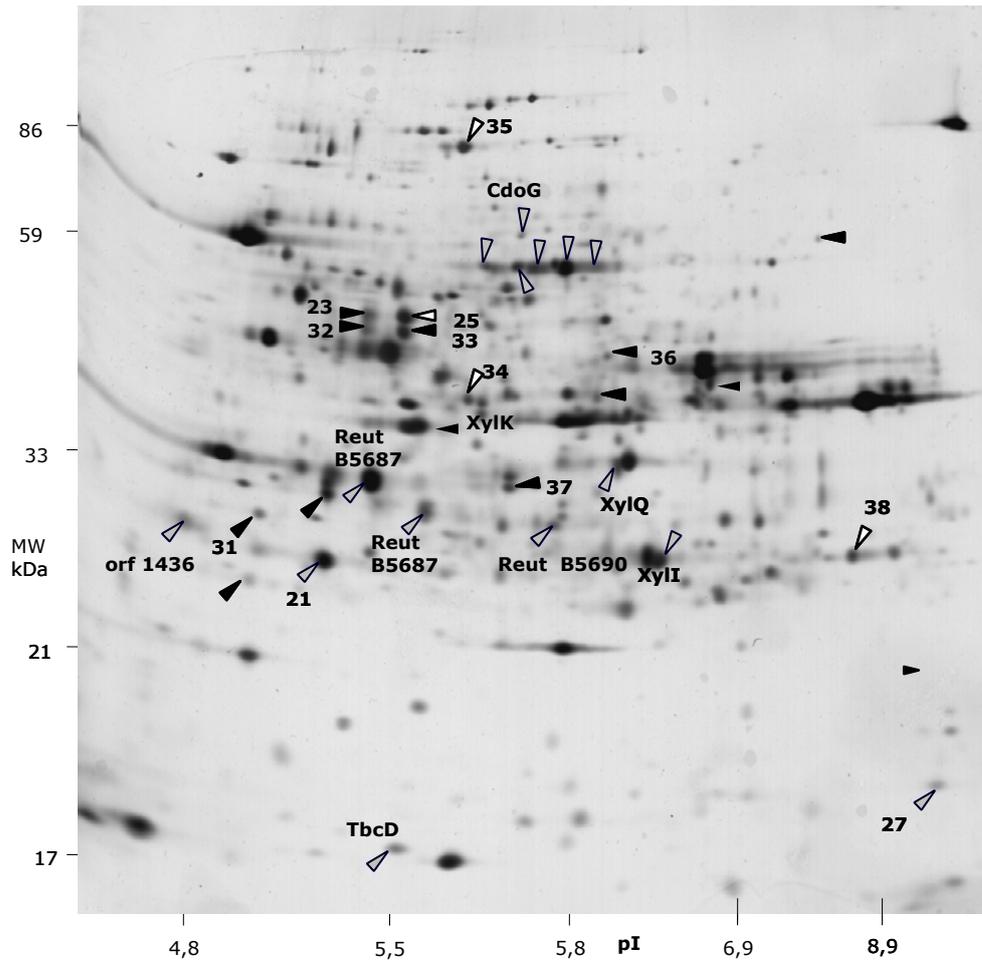


Abb. 10: Proteinmuster von *C. necator* JMP134 beim Wachstum im pH-Auxostat mit einer $c_R=8,74$ mM. Als Referenz diente das Proteinmuster auf Phenol-kultivierter Zellen bei $c_R=0$ mM und $D=0,05$ h⁻¹, dem Startpunkt der pH-Auxostatkultivierung. Graue Pfeile: Enzyme, die beim Wachstum im *meta*-Weges bei $c_R=0$ mM ebenfalls detektiert wurden, schwarze Pfeile: neu detektierte Spots die nicht, im *meta*-Weg Chemostat kultivierter Zellen detektiert wurden, weiße Pfeile: mindestens um das dreifache verstärkte Spots, die nicht im *meta*-Weg verstärkt wurden. Die identifizierten Proteine sind in Tab. 20 wiedergegeben.

Ergebnisse

Tabelle 20: Beim Wachstum mit einer Phenolrestkonzentration von $c_R=8,7$ mM neu detektierte oder um mindestens das 3fache verstärkte Proteine von *C. necator* JMP134. Die Zuordnung der Proteinfunktionen erfolgt mit Hilfe der *C. necator* JMP134 Genomdatenbank (TIGR, <http://www.tigr.org>).

Funktion	Spot- nummer	Gen- name	Ex- pression	mol. Masse kDa/pI	Accession Nummer	Score	% Sequence Coverage
Enzyme des Phenolmetabolismus							
Phenolhydroxylase-Komponente	37	<i>phlO</i>	n	37,7/ 5,8	AAZ65020	275	17
Phenolhydroxylase-Komponente		<i>tbcD</i>	n	13,5/ 5,4	AAZ65029	162	36
Catechol-2,3-Dioxygenase		<i>Reut B5687</i>	n	33,7/ 5,2	AAZ65032	69	19
Hydroxymuconsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase		<i>cdoG</i>	n	52,1/ 5,8	AAZ65034	202	25
Hydroxymuconsäure-Semialdehyd Hydrolase		<i>Reut B5690</i>	n	30,7/ 5,9	AAZ65035	278	18
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase		<i>xyII</i>	n	28,3 / 6,2	AAZ65037	75	6
2-Oxopent-4-Enoate-Hydratase		<i>orf 1436*</i>	n	28,1/ 4,9	ZP_00167853	100	23
4-Hydroxy-2-Ketovalerat-Aldolase		<i>xyIK</i>	n	38,4/ 5,8	AAZ65166	120	12
Aldehyd-Dehydrogenase		<i>xyIQ</i>	n	32,7/ 6,1	AAZ65167	536	45
Translation							
ribosomales Protein L10	27	<i>rspl</i>	v	18,0/ 9,15	AAZ62551	521	39
Aminosäuresynthese							
Acetylornithin-Aminotransferase	34	<i>argD</i>	v	42,8/ 5,6	AAZ62084	108	6
Energie							
NAD abhängige Epimerase	21	<i>Reut B3470</i>	n	27,5/ 5,4	AAZ62828	118	19
putative Styrenoxygenase Untereinheit	25	<i>Reut B3469</i>	n	48,0/ 5,5	AAZ62827	325	13
putative Styrenoxygenase Untereinheit	23	<i>Reut B3469</i>	n	48,0/ 5,2	AAZ62827	300	13
putative Styrenoxygenase Untereinheit	32	<i>Reut B3469</i>	n	47,6/ 5,2	AAZ62827	222	12

Ergebnisse

Funktion	Spot- nummer	Gen- name	Ex- pression	mol. Masse kDa/pI	Accession Nummer	Score	% Sequence Coverage
putative Styrenoxygenase Untereinheit	33	<i>Reut B3469</i>	n	47,6/ 5,5	AAZ62827	365	15
Acyl-CoA-Dehydrogenase	36	<i>fadD</i>	v	45,3/ 6,1	AAZ62961	75	2
Elektronen-Transfer-Flavoprotein	38	<i>eftB</i>	v	28,3/ 6,3	AAZ61911	320	54
<i>andere</i>							
Exoribonuklease	35	<i>pnp</i>	v	78,0/ 5,6	AAZ60336	275	7
Chlorocatechol-1,2-Dioxygenase II	31	<i>tfdcII</i>	n	29,1/ 5,3		144	13

*: ORF mit bekannter Funktion

n: neu detektierte Proteine

v: mindestens 3-fach verstärkte Proteine

Die Acyl-CoA-Dehydrogenase (FadD), ein Enzym des Fettsäureabbaus, katalysiert die α - und β -Dehydrogenierung eines Acyl-CoA Thioesters in sein korrespondierendes trans-2,3-Enoyl-CoA-Produkt, wobei FAD reduziert wird. Das gebildete FADH wird mit Hilfe des elektronentransferierenden Flavoproteins EtfB oxidiert. Die Elektronen werden auf das Ubichinon der Atmungskette übertragen. Beide Enzyme wurden verstärkt exprimiert.

v) andere

Die Exonribonuclease (Pnp) ist in den Abbau von mRNA involviert [Coburn und Mackie, 1999] und wurde neu detektiert. Die *pnp* Gene sind essentiell für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen in *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Yersinia enterocolitica* [Luttinger et al. 1996, Goverde et al. 1998, Zangrossi et al. 2000] und spielen eine signifikante Rolle bei globalen Adaptationsphänomenen, wie der Kälteschockantwort, bei der tief greifende Veränderungen bei der mRNA-Stabilität zu beobachten sind.

Zusätzlich zur Chlorocatechol-1,2-Dioxygenase (TfdCI), die während des Wachstums im *ortho*-Weg induziert und mit verminderter Expression im *meta*-Weg detektiert wurde, zeigte sich im Proteinmuster der im pH-Auxostat gewachsenen Zellen eine weitere Chlorocatechol-1,2-Dioxygenase (TfdCII).

3.3 Flowzytometrische Charakterisierung von *C. necator* JMP134 - Populationsdynamik beim Wachstum mit Phenol

Zunächst soll auf die analysierten Parameter und die gewählten Darstellungsarten eingegangen werden. Die Zellgröße wurde über das Vorwärtsstreulicht (FSC) der Zellen gemessen, und als *Mean-Wert*⁵ (m. I. = *mean Intensity*) angegeben. Die DNA-Gehalte der Zellen wurden durch die Detektion der Fluoreszenzintensität des A-T bindenden Farbstoffes DAPI, und der PHB-Gehalt der Population durch die Detektion der Fluoreszenzintensität des an Neutrallipide, und damit an PHB bindenden Farbstoffes Nilrot detektiert. Die DNA-Gehalte der Zellen werden graphisch als Subpopulations-Verteilungs-Muster (siehe Abb. 11a) präsentiert, während der PHB-Gehalt einer Population und deren Subpopulationen als *Mean-Wert* angegeben und in relativen Einheiten (rel. F. = *relative Fluorescence*) wiedergegeben wird. Die im nachfolgenden verwendeten Bezeichnungen **C₁ = einfaches Chromosomenäquivalent**, **C₂ = doppeltes Chromosomenäquivalent**, **C₄ = vierfaches Chromosomenäquivalent** sind auf Grund des Zellzyklusverhaltens von *C. necator* JMP134 gewählt wurden. Diese Einteilung erfolgte auf der Tatsache, dass die C₁-Subpopulation die erste detektierte der aufgelösten Verteilung ist. Ob Zellen in dieser Population jedoch nur 1 Chromosomäquivalent oder mehr besitzen kann nicht eindeutig gesagt werden. Die Linearität der ermittelten *Mean-Werte* der einzelnen Subpopulationen bestätigt jedoch die Verdopplung und Vervierfachung des DNA-Gehaltes (Abb. 11b).

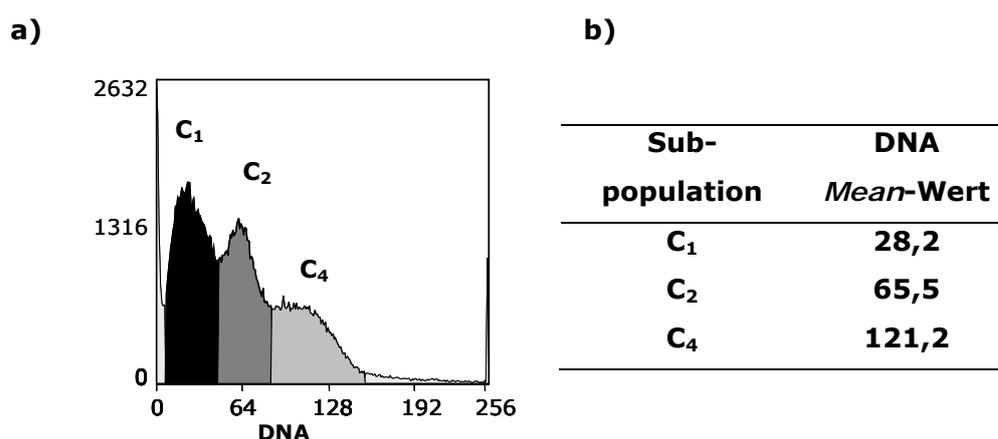


Abb. 11: DNA-Subpopulations-Verteilungsmuster und b) die dazu ermittelten *Mean-Werte* von *C. necator* JMP134 während des Wachstums auf Phenol.

⁵ *Mean-Wert*: 50 % der Ereignisse befinden sich rechts und links dieses Wertes

Die Daten werden einparametrisch als Histogramme oder zweiparametrisch als *Dot Plots* in den Anhängen 1-4 dargestellt. Durch das Setzen von *Gates* in einem Histogramm ist es mit Hilfe der Software möglich, sich auch andere Parameter der ausgewählten Zellen anzeigen zu lassen. Diese Option wurde genutzt, um den PHB-Gehalt der detektierten DNA-Subpopulationen zu ermitteln. Der PHB-Gehalt wird nur als Parameter der Gesamtpopulation gemessen. Durch gleichzeitiges färben und messen von DNA und PHB kann durch das Setzen von *Gates* mit Hilfe der Software der PHB-Gehalt der Subpopulationen ermittelt werden.

3.3.1 Populationsdynamik während der *Batch*-Kultivierung

Um das speziesspezifische Wachstumsverhalten bezüglich der DNA- und PHB-Synthese in den verschiedenen Wachstumsphasen zu beschreiben, wurde das Wachstum des Stammes unter *Batch*-Kultivierungsbedingungen untersucht. Die unausgewogenen Wachstumsbedingungen (Substratüberschuss, Substratmangel) denen der Organismus während der *Batch*-Kultivierung ausgesetzt ist, ähneln jenen, die Mikroorganismen in der Umwelt antreffen. Die Kenntnis dieser Parameter ist die Grundlage für das Verständnis der Populationsdynamik in weiteren Untersuchungen. Ein *Batch*-Ansatz, mit Phenol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle, wurde dafür zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt und sowohl DNA-Gehalt und Verteilung, als auch PHB-Gehalt und Verteilung in den Zellen flowzytometrisch analysiert. Die Parameter Biomassetrockensubstanz (BTS), Hydroxymuconsäure-Semialdehydkonzentration (HMS) und Substratrestkonzentration (c_R) sind in Abb. 12 wiedergegeben, der PHB-Gehalt der Population, Zellgröße und Proliferationsrate⁶ in Abb. 13. Die Histogramme mit den Subpopulations-Verteilungs-Mustern und der PHB-Verteilung in der Population sind in Anhang 1 dargestellt.

Abb. 12 zeigt den charakteristischen Wachstumsverlauf bei der *Batch*-Kultivierung von *C. necator* JMP134 auf Phenol. In der aktiven Wachstumsphase ($t > 7$ h) wurde HMS detektiert, welches mit Erreichen der stationären Wachstumsphase abgebaut wird.

Die DNA-Synthese von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Phenol erfolgt nach dem Modell des prokaryotischen Zellzyklus (1.2.2, S. 9) nicht entkoppelt vom Zellzyklus, d. h. ähnlich wie der eukaryotische Zellzyklus. Nach Zugabe des Inokulums und während der ersten zwei Stunden der Kultivierung wurde nur eine Subpopulation (C_2) detektiert (Anhang 1B). Mit dem Eintritt der Zellen in die aktive Wachstumsphase nahm die Größe der Zellen zu und es wurde eine zweite

⁶ Die Proliferationsrate ist der Anteil der Tochterzellen (C_4) in der Gesamtpopulation.

Subpopulation detektiert (C_4). In dieser befanden sich max. 48,5 % ($t = 7$ h) der Zellen (Abb. 13).

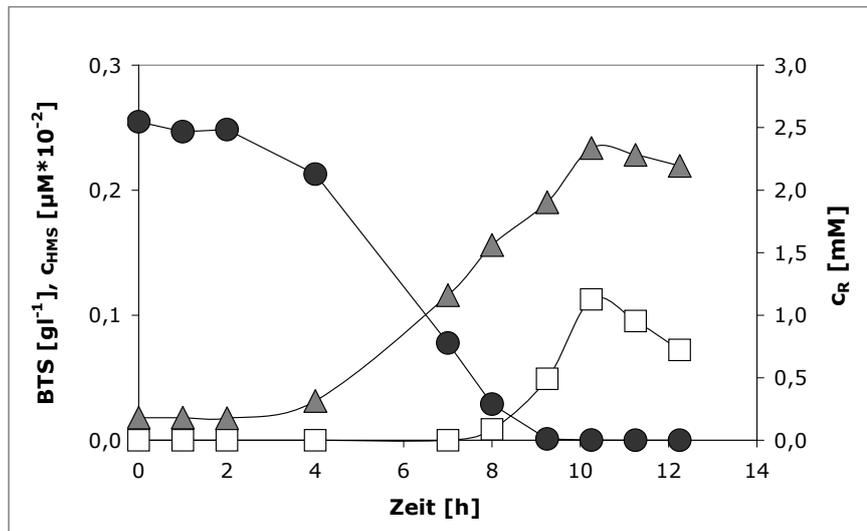


Abb.12: Der Verlauf der Wachstumsparameter während der *Batch*-Kultivierung auf 2,5 mM Phenol. \blacktriangle Biomassetrockensubstanz (BTS), \square Hydroxymuconat-Semialdehyd Konzentration (C_{HMS}), \bullet Phenolkonzentration (C_R).

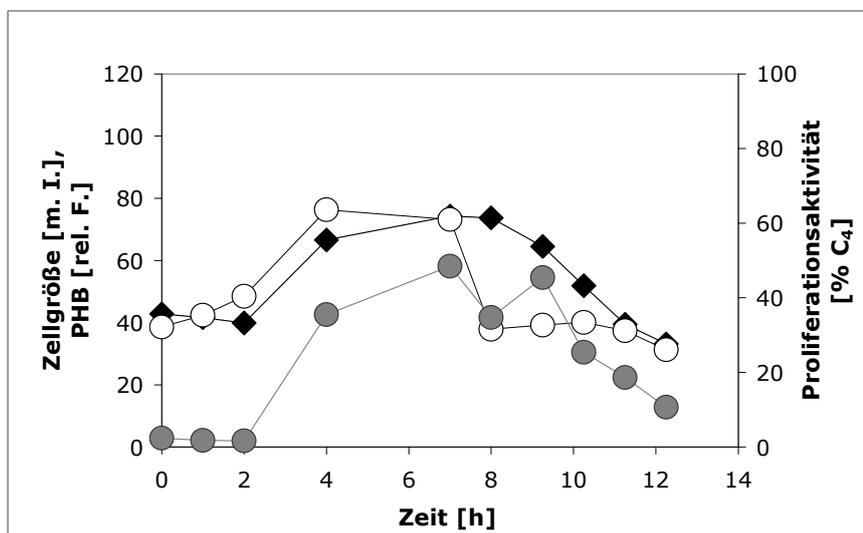


Abb. 13: Der Verlauf der \bullet Proliferationsaktivität, \blacklozenge Zellgröße und des \circ PHB-Gehaltes der Population während der *Batch*-Kultivierung auf 2,5 mM Phenol.

Mit Eintritt der Zellen in die späte aktive Wachstumsphase ($t=9,3$ h) nahm der Anteil der Zellen in dieser Population wieder ab, bis mit dem Erreichen der

stationären Phase und dem damit verbundenen Substratmangel 89,3 % der Zellen in der C₂-Population vorlagen, und die Zellgröße derjenigen zu Beginn des Versuches entsprach (Abb. 13, Anhang 1A). Der PHB-Gehalt der Zellen nahm sofort nach Zugabe des Inokulums in das frische Medium zu, sank ab der siebenten Stunde wieder auf den Ausgangswert, und nach Eintritt in die stationäre Phase weiter hin ab (Abb. 13).

Grundsätzlich unterschieden sich die PHB-Gehalte der Subpopulationen, mit einer Ausnahme, nicht mehr als 8 % voneinander. Zum Zeitpunkt t=4 h (Beginn der aktiven Wachstumsphase) besaßen Zellen der C₄-Subpopulation 76 % mehr PHB als die der C₂-Subpopulation (Abb. 14). Gleichzeitig erreichten sie ihre maximale Zellgröße (vgl. Anhang 1). Mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase kam es bei den C₄-Zellen zu einer Aufspaltung in 2 PHB-Populationen (Anhang 1D, E; t=12 h schwarzer Pfeil), bei denen die rechte noch PHB besaß. Das PHB wurde von den Zellen für die Zellteilung genutzt, um in den von *C. necator* JMP134 bevorzugten und offensichtlich stabilsten Zellzustand C₂ zu gelangen.

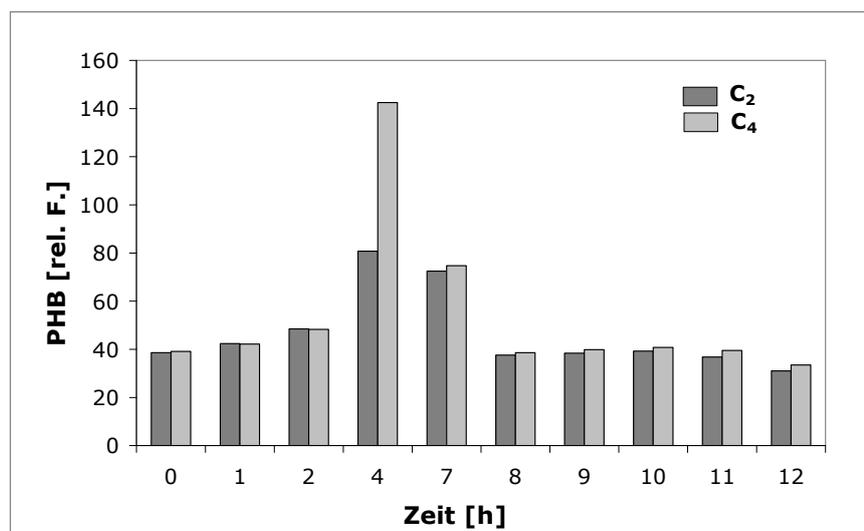


Abb. 14: PHB-Gehalte der Subpopulationen C₂ (dunkelgrau) und C₄ (hellgrau) während der Batch-Kultivierung auf 2,5 mM Phenol. Angegeben sind die *Mean*-Werte der gemessenen relativen Nilrot-Fluoreszenz.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Phenol zwei DNA-Subpopulationen bildete, wobei Zellen der C₂-Population vor allem in der lag- und der stationären-Phase dominierten. Die Chromosomenausstattung der Zellen wurde als Maß für die Proliferationsaktivität angesehen. Ein

hoher Anteil an C_4 -Zellen in einer Population ist demnach ein Ausdruck für eine hohe Zellteilungsrate, also sehr aktiven Zellen. Unter Substratmangel beendeten die Zellen von *C. necator* JMP134 ihren Zellzyklus mit der Zellteilung. Dieses Verhalten ist charakteristisch für diesen Stamm, da es Substrat- (getestet wurden Acetat, Succinat, Pyruvat und Fruktose; Ergebnisse nicht gezeigt) und damit Wachstumsraten-unabhängig beobachtet wurde.

3.3.2 Populationsdynamik während der Chemostat-Kultivierung

Bei der kontinuierlichen Kultivierung im Chemostat sollten Erkenntnisse über die Populationsdynamik unter ausgeglichenen, balancierten Wachstumsbedingungen gewonnen werden. Da der Chemostat Kohlenstoff-limitiert gefahren wurde, lag Phenol nur in geringsten, nicht messbaren, stationären Konzentrationen vor, die für die Zellen nicht toxisch waren. Nach Erreichen eines Fließgleichgewichtes (*steady state*) wurden bei der jeweiligen Durchflussrate D , die im Chemostat der Wachstumsgeschwindigkeit μ entspricht, Proben für die flowzytometrische Analyse entnommen und auf DNA- und PHB-Gehalt sowie deren Verteilung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 15-16 und Anhang 2 zusammengefasst.

Mit Zunahme der Durchflussrate von $D=0,05 \text{ h}^{-1}$ auf $D=0,10 \text{ h}^{-1}$ stieg der Anteil der Zellen in der C_4 -Population und damit die Proliferationsaktivität der Zellen. Ein weiterer, signifikanter Anstieg wurde ab einer Durchflussrate von $D=0,15 \text{ h}^{-1}$ beobachtet, was mit dem Zuschalten des *meta*-Abbauweges zusammenfiel (Detektion von HMS, siehe Abb. 4a, S. 40). Derselbe Verlauf spiegelte sich neben der BTS, auch in der Zellgröße der Gesamt- und beider Subpopulationen wieder (vgl. Histogramme Anhang 2A).

Der PHB-Gehalt der Zellen nahm bis zu einer Durchflussrate von $D=0,2 \text{ h}^{-1}$ zu, und sank danach etwas ab. Ein Vergleich der PHB-Gehalte der Subpopulationen C_2 und C_4 zeigte, dass beide Subpopulationen PHB speicherten. Die Zellen der C_4 -Subpopulation enthielten maximal 10 % mehr PHB als die Zellen der C_2 -Subpopulation (Abb. 16).

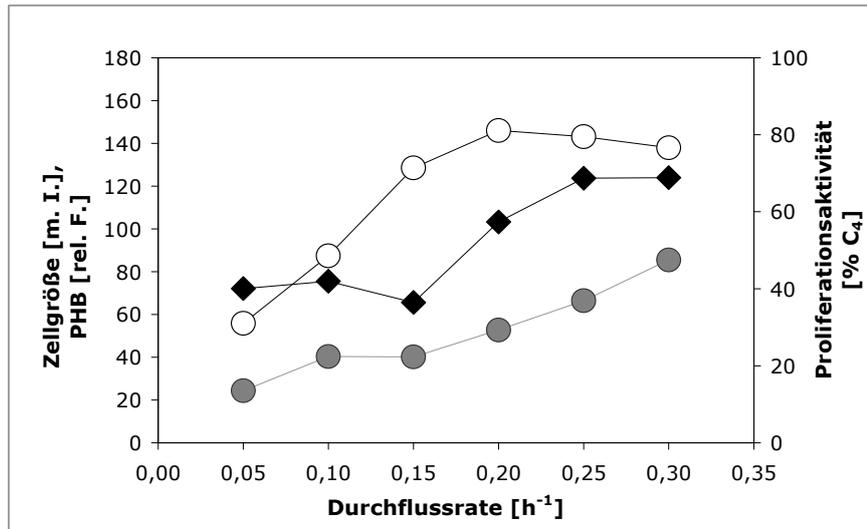


Abb. 15: Der Verlauf der \bullet Proliferationsaktivität, \blacklozenge Zellgröße und \circ des PHB-Gehaltes der Population während der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol.

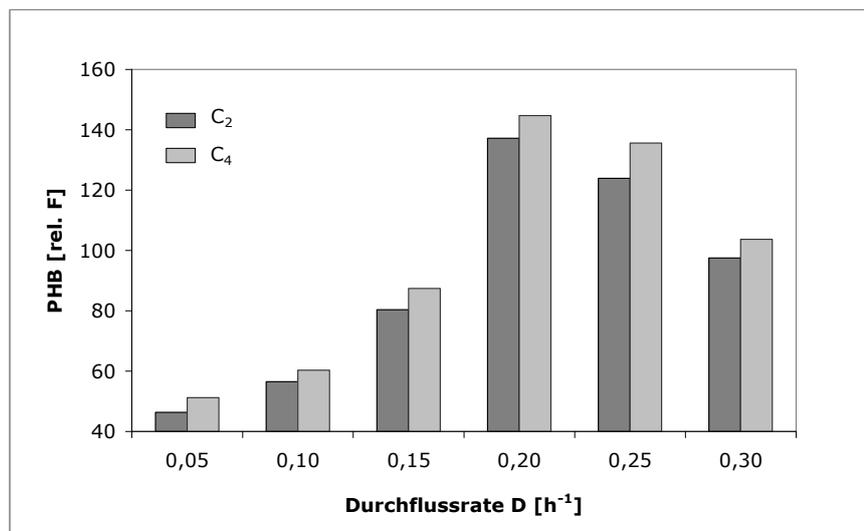


Abb. 16: PHB-Gehalte der Subpopulationen C₂ (dunkelgrau) und C₄ (hellgrau) während der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol. Angegeben sind die *Mean*-Werte der gemessenen relativen Fluoreszenz.

Wie bei der *Batch*-Kultivierung wurden während der kontinuierlichen Kultivierung im Kohlenstoff-limitierten Chemostat zwei Subpopulationen detektiert. Auch hier lag, abhängig von der Durchflussrate, und damit von μ , der Hauptteil der Zellen in der C₂-

Subpopulation vor. Mit dem Zuschalten des *meta*-Weges war eine deutliche Erhöhung der Proliferationsaktivität zu verzeichnen.

3.3.3 Populationsdynamik während der pH-Auxostat-Kultivierung

Da die toxische Wirkung von Phenol konzentrationsabhängig ist, wurde die Reaktion der Zellen auf zunehmende Phenolrestkonzentrationen untersucht, um a) ihren Einfluss auf physiologische Leistungen wie die PHB-Synthese und b) Adaptationsstrategien der Population und Subpopulationen zu analysieren. Die Analyse der Wachstumsparameter (3.1.2, S.45) hat bereits gezeigt, dass zunehmende Substratrestkonzentrationen zum einen zu einer Abnahme der BTS führen, und das zum anderen der *meta*-Weg auch bei Durchflussraten $D < 0,15 \text{ h}^{-1}$ induziert wird. Die Ergebnisse der flowzytometrischen Analyse der pH-Auxostat-Proben sind in den Abb. 17-20 sowie im Anhang 3 dargestellt.

Wie bereits gezeigt (Abb. 7, S.43), stiegen mit dem Start des pH-Auxostat sowohl die BTS und der PHB-Gehalt als auch die Substratrestkonzentration. Die Analyse der Proliferationsaktivität und der Zellgröße (Abb. 17) zeigten zu Beginn ebenfalls einen Anstieg, was nicht unerwartet war. Die Zellen wurden vorher im Kohlenstoff-limitierten Chemostat kultiviert und nutzten nun den Überschuss an Kohlenstoff, um zu wachsen und zu vermehren. Mit der Erhöhung der Substratausgangskonzentration im Zulauf ($t=75 \text{ h}$) auf $c_0=31,9 \text{ mM}$ erfolgte eine weitere Zunahme des Anteil der C_4 Zellen (von 23 % auf 33 %) und damit der Proliferationsaktivität.

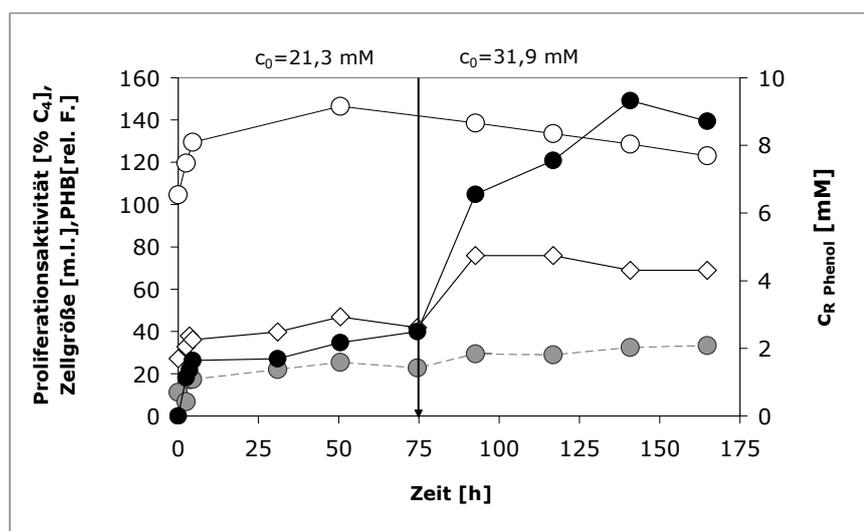


Abb. 17: ● Proliferationsaktivität, ◇ Zellgröße, ○ PHB-Gehalt der Population und ● Phenolrestkonzentration (c_R) während der kontinuierlichen Kultivierung im pH-Auxostat.

Die Zunahme des Anteils der C_4 -Zellen zeigt, dass *C. necator* JMP134 auch unter diesen Bedingungen die Proliferation nicht einstellt. Das ist aufschlussreich, denn es bedeutet, dass während bei der *Batch*-Kultivierung von *C. necator* JMP 134 auf Phenol kein Wachstum bei $c_R > 7,5$ mM beobachtet werden konnte (nicht gezeigt), im pH-Auxostat bei $c_R = 8,7$ mM Wachstum und Vermehrung möglich sind.

Die flowzytometrisch gemessene Zunahme der Zellgröße ab $t > 75$ h, konnte durch eine bildanalytische Auswertung nicht bestätigt werden. Ein Vergleich der Zellen zum Versuchszeitpunkt $t = 0$ h ($c_R = 0$ mM) und $t = 117$ h ($c_R = 7,6$ mM) zeigte deutlich, dass ein Großteil der Zellen kürzer, aber dicker wurden (Abb. 18). Diese Veränderungen wirken sich auch auf das Oberflächen/Volumen Verhältnis aus, das mit kleiner jedoch runder werden Zellen abnimmt (Tab. 20). Die Brechung der Zelloberfläche und des Zellvolumens erfolgte, ausgehend von einer zylindrischen Form der Zellen, nach folgenden Formeln:

$$V [\mu\text{m}^3] = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot l \quad \text{Gleichung 5}$$

$$A [\mu\text{m}^2] = \pi \cdot d \cdot (d/2 + l) \quad \text{Gleichung 6}$$

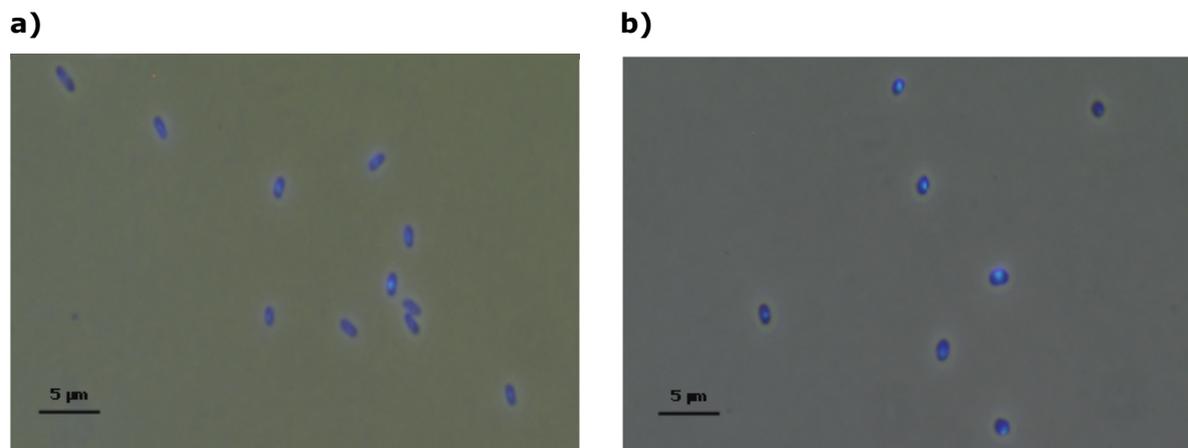


Abb. 18: Fotos von DAPI-gefärbten *C. necator* JMP134 Zellen beim kontinuierlichen Wachstum im a) Chemostat ($c_R = 0$ mM) und b) pH-Auxostat ($c_R = 7,6$ mM). Von jeder Probe wurden 50 willkürlich ausgewählte Zellen vermessen.

Tab. 21: Effekt der Substratrestkonzentration (c_R) auf die Zellgröße und das Zellvolumen

Substratrest- konzentration	Länge l [μm]	Durchmesser d [μm]	Oberfläche [μm^2]	Volumen [μm^3]	Oberfläche/ Volumen
$c_R = 0 \text{ mM}$	1,67 ($\pm 0,18$)	0,87 ($\pm 0,05$)	5,75	0,993	5,79
$c_R = 7,6 \text{ mM}$	1,44 ($\pm 0,17$)	1,00 ($\pm 0,10$)	6,09	1,131	5,39

Die Analyse der DNA-Gehalte und der DNA-Verteilung in der Population zeigte ein unerwartetes Bild (Anhang 3). Zu Beginn des Experiments traten die zwei Subpopulationen C_2 und C_4 auf, wobei 88 % der Zellen in der C_2 -Subpopulation vorlagen. Mit zunehmender Substratrestkonzentration $c_R > 1,7 \text{ mM}$ wurde eine weitere Population im Histogramm (Anhang 3, B, $c_R = 2,13 \text{ mM}$) vor der C_2 -Population sichtbar, die im Weiteren als C_1 -Subpopulation bezeichnet wurde, und deren Anteil sich mit zunehmender Substratrestkonzentration erhöhte. Die Linearität der ermittelten *Mean*-Werte (Abb.11b) bestätigte, dass es sich hierbei um eine Zellpopulation, und keine Artefakte handelt. Die in Abb. 19 dargestellten Anteile der jeweiligen Subpopulation geben einen Einblick in die Populationsdynamik von *C. necator* JMP134 während des Wachstums im pH-Auxostat. Während der Anteil der C_4 - und C_1 -Zellen zunahm, sankt der Anteil der Zellen in der C_2 -Subpopulation.

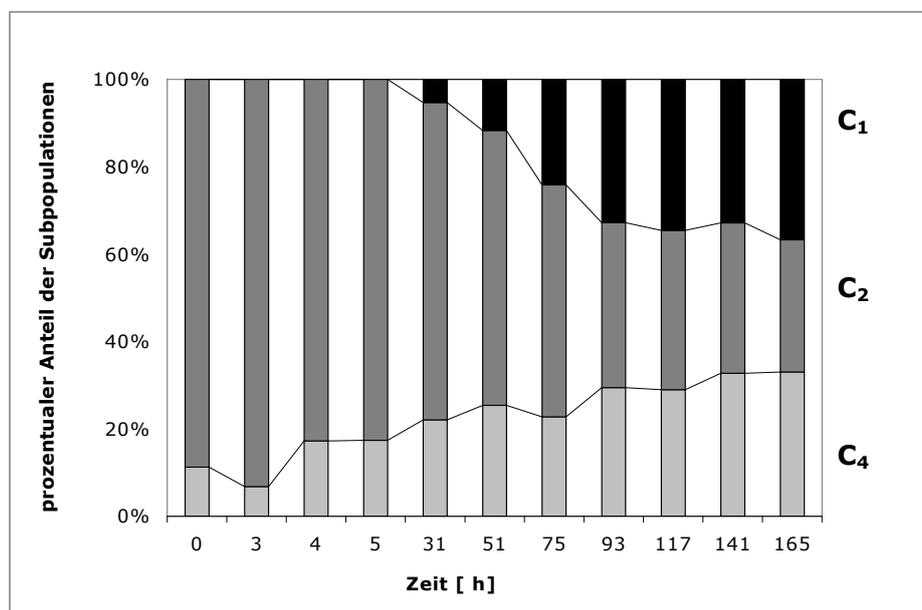


Abb. 19: Anteile der C_1 (schwarz), C_2 (dunkelgrau) und C_4 (hellgrau) Subpopulationen in Prozent während Kultivierung vom *C. necator* JMP134 im pH-Auxostat.

Eine bildanalytische Untersuchung DAPI-gefärbter Zellen lässt vermuten, dass Zellen der C_1 -Subpopulation nicht das Ergebnis einer Zellteilung sind, da keine Septumbildung und eine Aufteilung der DNA beobachtet werden konnte (nicht gezeigt). Vielmehr scheint sie das Ergebnis eines DNA-Abbaus zu sein.

Die Analyse der PHB-Gehalte der Subpopulationen (Abb. 20) zeigte, dass PHB in allen Subpopulationen detektiert werden konnte. Es wurde in den C_4 -Zellen durchschnittlich 10 % mehr und in den C_1 -Zellen durchschnittlich 5 % weniger PHB im Vergleich zu den C_2 -Zellen detektiert. Eine genaue Analyse der Histogramme, zeigte außerdem eine deutliche Auftrennung der PHB-Verteilung in Zellen der C_1 -Subpopulation (siehe Anhang 3E $c_R=7,6$ mM, 8,74 mM schwarzes Gate). Zellen der oberen Population synthetisierten PHB, während es die Zellen in der unteren Population (schwarzes Gate) nicht taten. Durch das Setzen von Gates war es mithilfe der Software möglich den DNA-Gehalt dieser Zellen zu ermitteln. Sie gehörten ausschließlich zur C_1 -Subpopulation (Anhang 3D, $c_R=8,7$ mM roter Pfeil).

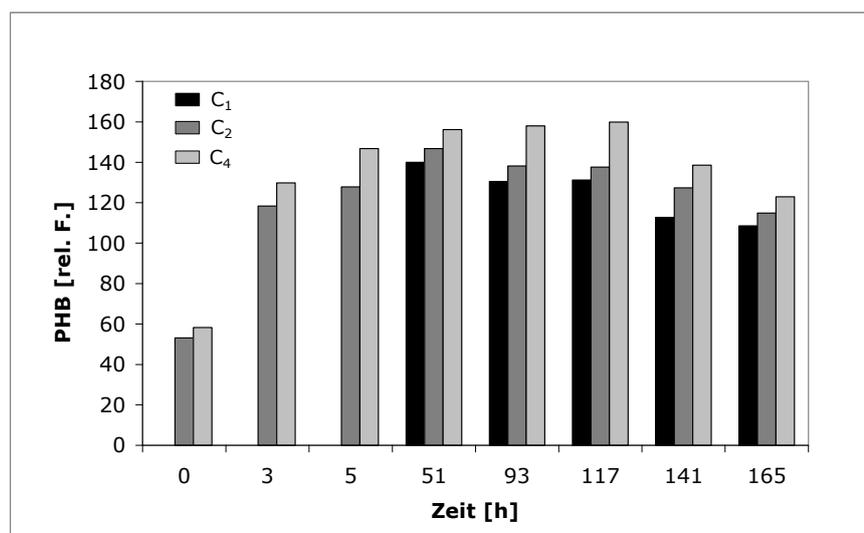


Abb. 20: PHB-Gehalt der Subpopulationen C_1 (schwarz) C_2 (dunkelgrau) und C_4 (hellgrau) während der kontinuierlichen Kultivierung im pH-Auxostat auf Phenol.

3.3.4 Populationsdynamik während der *Batch*-Rekultivierung

Um zu klären, ob es sich bei den Zellen der C_1 -Population um geschädigte oder tote Zellen handelte, wurde die gesamte Population am Ende des pH-Auxostat-Versuches geerntet, mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) gewaschen und anschließend mit frischen Medium und 2,5 mM Phenol in einem *Batch*-Ansatz rekultiviert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und auf ihren DNA- und PHB-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 21-23 dargestellt.

Wie aus Abb. 21 zu entnehmen stieg nach einer lag-Phase von fünf Stunden die BTS an und nach sieben Stunden begannen die Zellen mit der Synthese von PHB. Die in Abb. 22 dargestellten Anteile der Subpopulationen zeigen, dass nach 5 Stunden der Anteil der C_2 Zellen zunahm, während davor eine Abnahme dieser, bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils der C_1 -Zellen zu verzeichnen war.

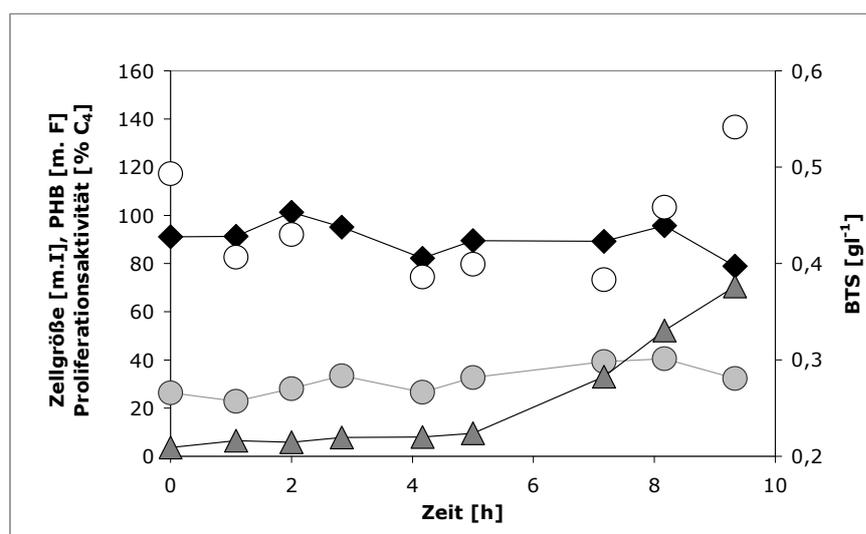


Abb. 21: ● Proliferationsaktivität, ◆ Zellgröße, ○ PHB-Gehalt und ▲ Biomassetrocken- substanz (BTS) während der *Batch*-Rekultivierung auf 2,5 mM Phenol von *C. nector* JMP134 Zellen, die vorher im pH-Auxostat kultiviert worden sind.

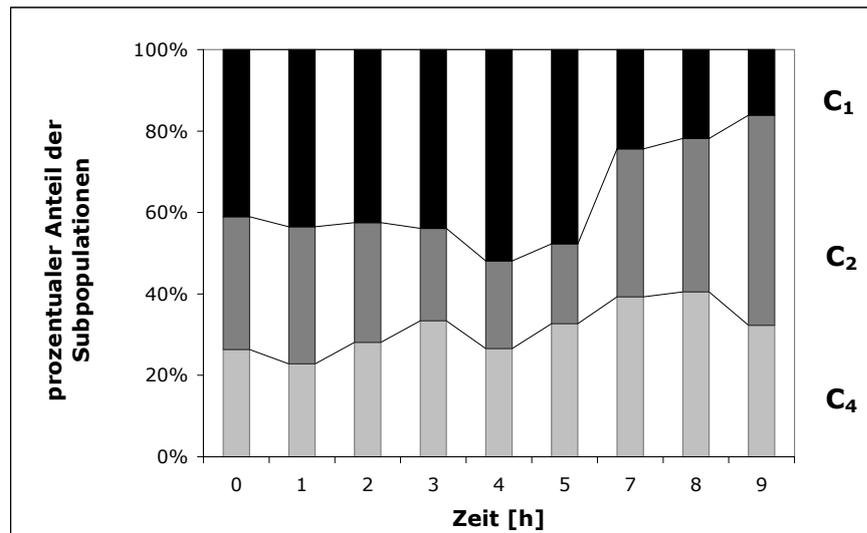


Abb. 22: Anteile der C₁-(schwarz), C₂-(dunkelgrau) und C₄ -Subpopulationen (hellgrau) in Prozent während der *Batch*-Rekultivierung vorher im pH-Auxostat kultivierter Zellen vom *C. necator* JMP134.

Mit der Bestimmung der Generationszeit der Zellen (Abb.23) während der Rekultivierung konnte ausgeschlossen werden, dass die detektierte Abnahme der C₁-Subpopulation auf ein „Überwachsen“ dieser Population zurückzuführen ist. Während der lag-Phase lag diese bei $g > 20$ Stunden und sank zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase $t = 8$ h auf eine Generationszeit von $g = 3,8$ h.

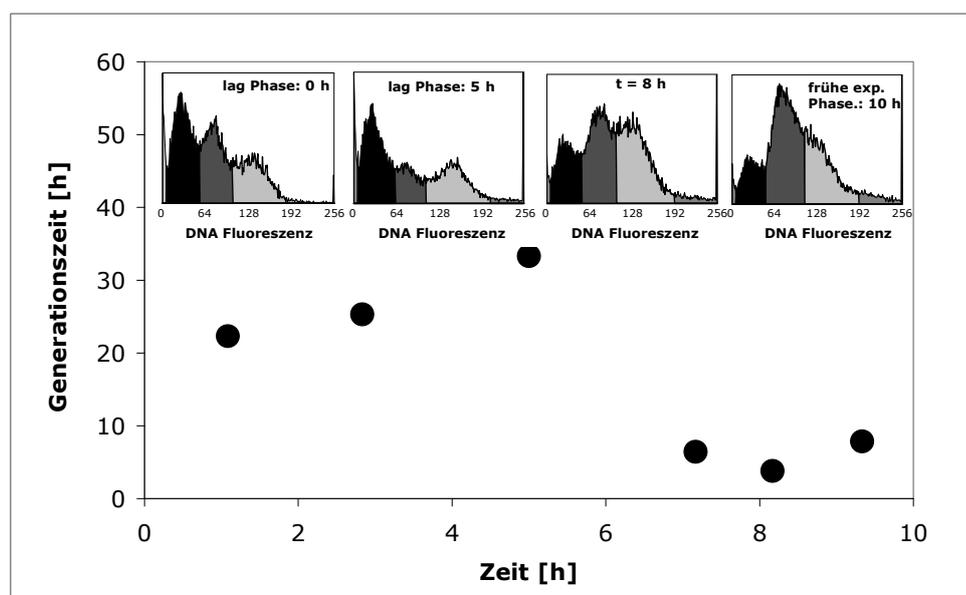


Abb. 23: Generationszeit und DNA-Subpopulations-Verteilungsmuster während der *Batch*-Rekultivierung vom *C. necator* JMP134 auf 2,5 mM Phenol.

Die Rekultivierung von Zellen aus dem pH-Auxostat zeigt, dass es sich bei Zellen in der C₁-Subpopulation wahrscheinlich um lebende Zellen handelt, die unter günstigeren Bedingungen wieder in der Lage sind dieses Stadium zu verlassen, und in den Zellzyklus eintreten können.

3.4 Proteomanalyse der Subpopulationen

Mit der Proteomanalyse der detektierten Subpopulationen sollten Daten über den metabolischen Status der genetisch und morphologisch identischen Zellen erhalten werden. Dazu wurden die Zellen anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehaltes mit Hilfe des MoFlo Cell Sorter (DakoCytomation) separiert. Die DAPI-gefärbten Zellen werden bei diesem Sortiervorgang mit *Sheath-Fluid* (S. 34) soweit verdünnt, das sie anschließend wie Perlen aufgereiht an einer Kette vermessen und sortiert werden konnten. Als Sortiermodus wurde der Modus mit der höchsten Genauigkeit (*single cell one*) gewählt. Dabei werden etwa 1000-2000 Zellen/ Sekunde sortiert.

3.4.1 Einfluss von Zellfixierung, Zellfärbung, Lagerung und Zellrückgewinnung auf die Proteomanalyse

Um qualitativ und quantitativ zuverlässige Daten zu gewinnen, wurde der Einfluss der Prozeduren, die für die Probenaufbereitung vor und während des Sortiervorganges notwendig waren, auf die Proteomanalyse untersucht.

Einfluss der Zellfixierung

Während bei der Proteomanalyse die frisch geernteten Zellen mit einem Proteasehemmer (PMSF) gewaschen im selben Puffer resuspendiert und bei -18°C eingefroren wurden, erfolgte die Zellfixierung für die flowzytometrische Analyse nach dem Waschen der Zellen mit einem Chloramphenicol und PMSF enthaltenden Puffer mit 10 %igem Natriumazid (NaN_3). Die so fixierten Zellen wurden anschließend im Kühlschrank aufbewahrt und waren, im Hinblick auf die flowzytometrisch gemessenen Parameter, 1 Jahr stabil. Es musste jedoch überprüft werden, ob Natriumazid die Proteine vor dem proteolytischen Abbau schützt.

Dazu wurde BSA (0,16 mg BSA gelöst in 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer) als Modellprotein mit Trypsin, sowohl mit als auch ohne 10 %igem Natriumazid, 20 h bei 37°C verdaut. Wie die ESI-MS/MS Analyse mit einer Vielzahl anderer Proben gezeigt haben, führen diese Bedingungen zu einem vollständigen Verdau. Als Kontrolle dienten BSA und BSA mit 10 %igem Natriumazid ohne Trypsin. Die Ansätze wurden anschließend mit 10 %iger TCA gefällt, dreimal mit Aceton gewaschen in SDS-Probenpuffer (Tab. 4) resuspendiert und anschließend in einem SDS-PAGE (12 % Polyacrylamid) aufgetrennt.

Beim Vergleich der Spuren 3 und 4 (Abb. 24) waren die Abbauprodukte des BSA in Spur 4, jedoch nicht in Spur 3 zu finden (schwarze Pfeile). Allerdings zeigte ein Vergleich der Spuren 2 und 3 minimale Veränderungen (weißer Pfeil), die nicht genauer quantifiziert werden konnten, und auch in Spur 5, welche nur BSA enthielt,

schwach zu erkennen waren. Bei dem dicken schwarzen Pfeil in der Spur 3 handelte es sich vermutlich um Trypsin. Die Gegenwart von Natriumazid inhibiert offensichtlich den Selbstverdau des Trypsin. Resultierend aus diesem Ergebnis wurde davon ausgegangen, dass während der Zellfixierung mit NaN_3 kein proteolytischer Abbau der Proteine in den Zellen stattfand.

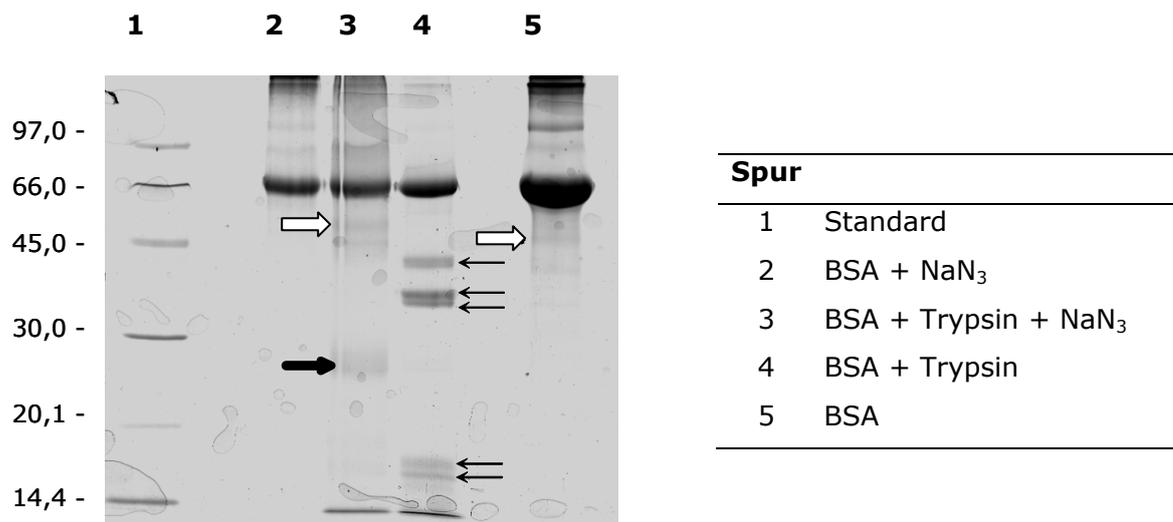


Abb. 24: Verdau (20 h, 37°C) von BSA mit Trypsin mit und ohne 10 %igem NaN_3

Einfluss der Zellfärbung

Das Sortieren der Zellen nach ihrem DNA-Gehalt erforderte das Färben der Zellen mit dem fluoreszierenden, an A-T reiche Regionen bindenden Farbstoff DAPI. Daher wurde der Einfluss der Färbeprozedur auf die Proteomanalyse ebenso geprüft. Dazu wurde eine frisch geerntete Zellsuspension für 1 h mit 10 %igem NaN_3 fixiert. Ein Teil wurde anschließend mit DAPI (2.5.2, S. 33) gefärbt, der andere diente als Kontrolle. Im Anschluss wurden die 2D-Proteinmuster von beiden Proben erstellt und verglichen.

Der Vergleich beider Muster (Abb. 25) zeigte weder Unterschiede in der Spotanzahl noch Veränderungen in der Spotintensität einzelner Spots. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Färbeprozedur keinen nachweisbaren Einfluss auf die Menge und Trennung von Proteinen in 2D-Gelelektrophorese, und damit auf die Proteomanalyse hat.

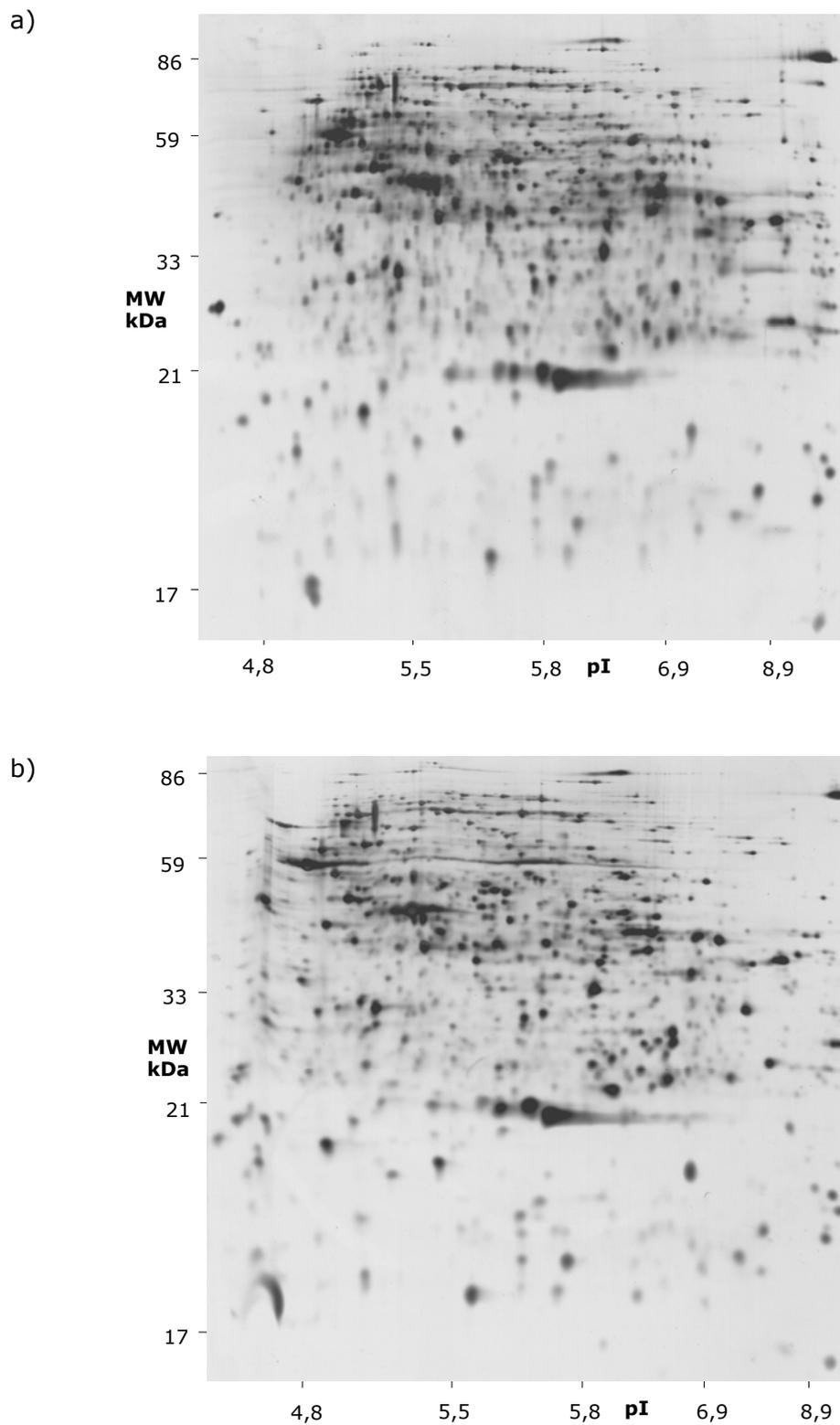


Abb. 25: Proteinmuster von *C. necator* JMP134 (auf Pyruvat kultiviert) a) Kontrolle (frisch geerntete und 1 h fixierte Zellen), b) 1 Stunde fixierte und anschließend mit DAPI gefärbte Zellen.

Einfluss der Lagerung der Zellen auf die Proteomanalyse

Da das Sortieren der Subpopulationen mehrere Wochen beanspruchte, musste der Einfluss der Lagerung auf die Proteinmuster untersucht werden. Dazu wurden die Proteinmuster von 8 und 16 Wochen alten, mit NaN_3 fixierten Zellen mit denen frisch geernteter und aufgeschlossener Zellen des gleichen Ansatzes verglichen. Auf den ersten Blick zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Proben, die Anzahl der detektierten Spots änderte sich nicht.

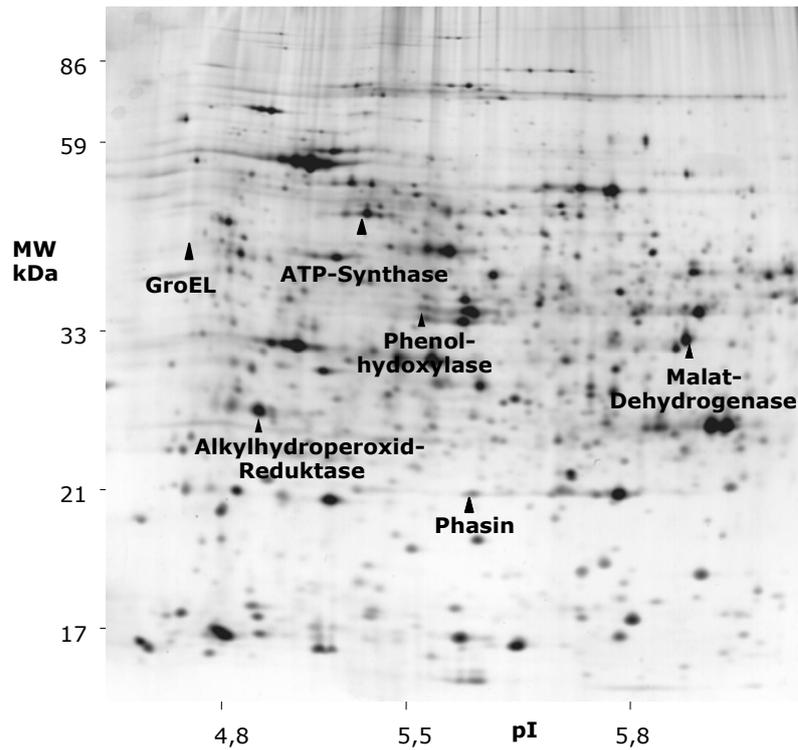
Es sind jedoch Unterschiede in der Intensität einzelner Spots detektiert wurden, von denen einige identifiziert wurden (Abb. 26). Die Ursache der auftretenden Veränderungen ist unklar, da diese Spots unterschiedlichen metabolischen Funktionen zugeordnet werden können (z.B. ATP-Synthase: Energiemetabolismus, Alkylhydro-peroxid-Reduktase: Detoxifizierung, GroEL: Proteinfaltung).

So wurden im 2D-Gel der fixierten Zellen (Abb. 26b) im Vergleich zur Kontrolle, bei dem Protein GroEL neue Spots mit kleinerem Molekulargewicht als beim ursprünglichen GroEL nachgewiesen, was auf eine eingeschränkte Proteolyse hindeutet. Der Vergleich von 8 und 16 Wochen alten fixierten Zellen zeigte keine Unterschiede, d.h. die Veränderungen fanden zu einem früheren Zeitpunkt statt.

Eine Verkürzung des Sortiervorganges, und damit der Lagerungszeit, ließ sich auf Grund der benötigten Menge an Zellen nicht bewerkstelligen. Deshalb wurden die Zellen während des Sortierens auf Eis aufbewahrt und schnell, aber so schonend wie möglich, zentrifugiert und in 200 μl Waschpuffer resuspendiert (Tab. 4) und eingefroren.

Ferner wurde davon ausgegangen, dass die Veränderungen in der gesamten Population stattfanden und somit die Analyse der Subpopulationen nicht beeinflussten.

a)



b)

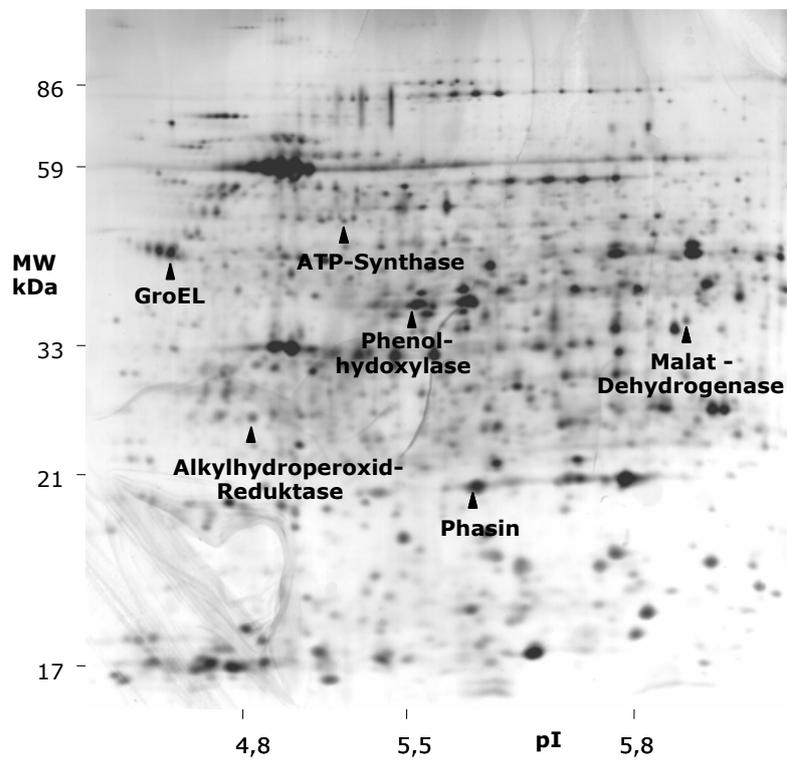


Abb. 26: Einfluss der Lagerungsdauer auf das Proteinmuster von *C. necator* JMP 134 (Phenol kultivierte Zellen) a) Kontrolle (frisch geerntet und aufgeschlossene Zellen), b) Proteinmuster von 16 Wochen alten mit NaN_3 fixierte Zellen.

Einfluss von Zellrückgewinnung und *Sheath Fluid*

Beim Separieren der Zellen nach ihrem DNA-Gehalt wird die Zellsuspension während der hydrodynamischen Fokussierung mit *Sheath Fluid* verdünnt. Der Einfluss des *Sheath Fluids* und der Rückgewinnung von Zellen aus der hochverdünnten Suspension auf die nachfolgende Proteomanalyse wurde demzufolge ebenfalls überprüft.

Dazu wurde ein Teil der für kurze Zeit (1 h) in NaN_3 -fixierten Zellen auf 10^5 Zellen/ml mit *Sheath Fluid* verdünnt. Diese Zellen wurden 4 h auf Eis aufbewahrt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, $12.000 \times g$ bei 0°C) zurückgewonnen und mit nicht verdünnten Zellen verglichen. Um den Salzgehalt (resultierend vom *Sheath Fluid*) in den zurückgewonnenen Proben zu minimieren, und so Störungen bei der IEF vorzubeugen, wurden die Proben zusätzlich zweimal mit Waschpuffer (Tab. 4, S.24) gewaschen. Die Proteinmuster sind in Abb. 27 dargestellt.

Die Verdünnung und anschließende Rückgewinnung hatte einen signifikanten Einfluss auf die Spotanzahl, die abnahm, und auf die Spotintensität. Einige Spots schienen von der Veränderung der Spotintensität weniger beeinträchtigt zu sein als andere. Ein Vergleich mit 2D-Gelen, bei denen nur 40 % bzw. 20 % der sonst aufgetragenen Gesamtproteinmenge eingesetzt wurde, zeigte, dass es sich bei diesen Spots um solche handelte, die in den Silberfärbungen überfärbte Spots darstellten, deren Menge unterschätzt wird. Wegen ihren hohen Konzentrationen sind sie selbst nach Auftragung im Gel noch sehr deutlich sichtbar.

Die Auflösung und Sensitivität der 2D-Gele wird durch diesen letzten Schritt am stärksten beeinflusst. Allerdings kann weder auf die Verdünnung mit *Sheath Fluid* verzichtet werden, noch konnte eine bessere Methode der Zellrückgewinnung gefunden werden.

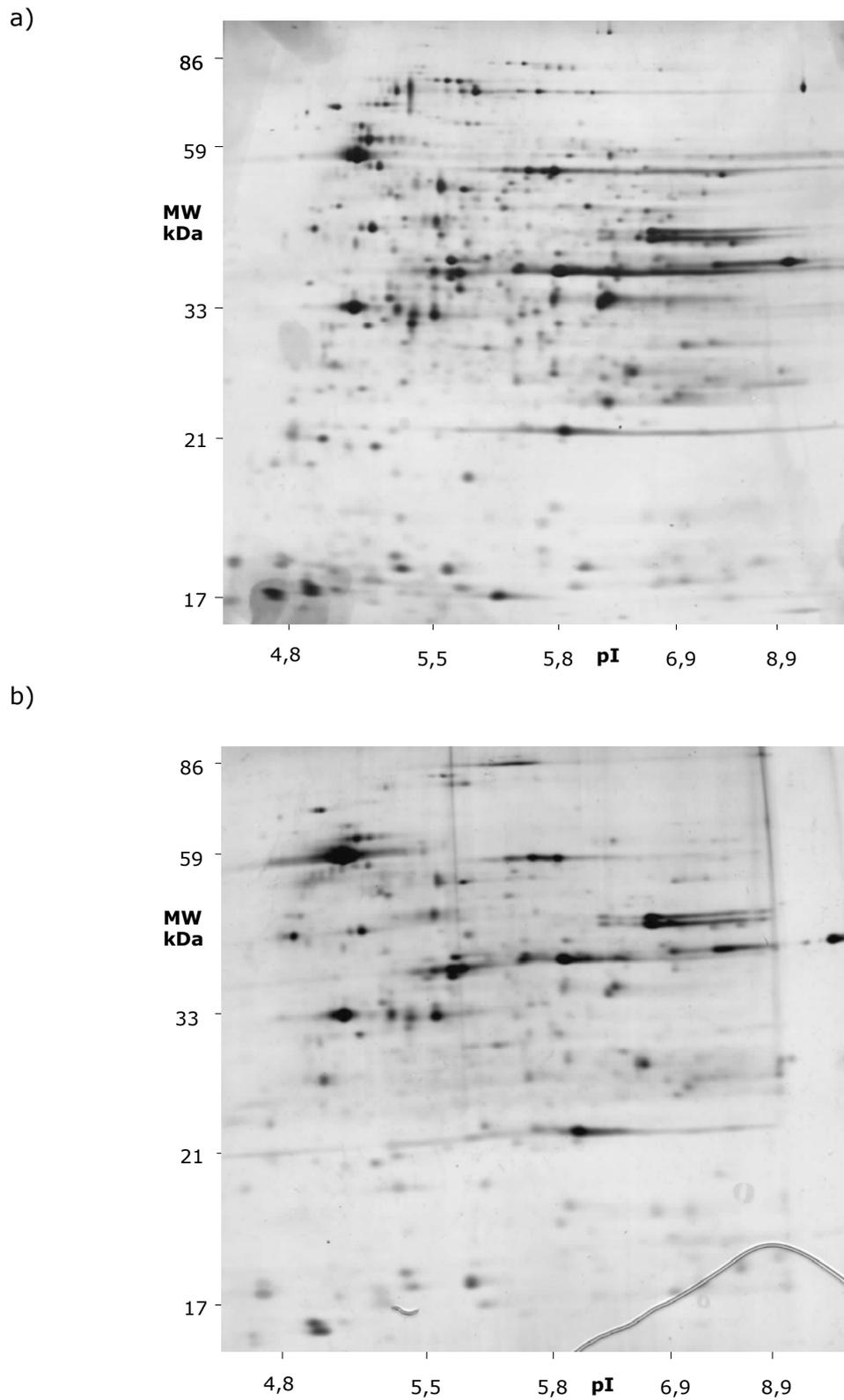


Abb. 27: Einfluss der Verdünnung von *Sheath Fluid* und Rückgewinnung durch Zentrifugation auf das Proteinmuster von *C. necator* JMP134 (Phenol-kultivierte Zellen)
a) Kontrolle, b) Proteinmuster von Zellen die mit *Sheath Fluid* verdünnte und durch Zentrifugation zurückgewonnen wurden.

3.4.2 Proteomanalyse von Subpopulationen

Voraussetzung für einen quantitativen und qualitativen Vergleich von Proteinmustern ist eine adäquate Auftrennung der Proteine für die anschließende Färbung und Identifizierung. Obgleich die Geschwindigkeit beim Sortieren zwischen 1000 und 2000 Zellen/ Sekunde lag, nahm das Sortieren mehrere Wochen in Anspruch. Nach 20 Tagen konnten bis zu 10^9 Zellen pro Subpopulation separiert werden. Nach dem Zellaufschluss standen so 80 - 100 μg Protein/Subpopulation für die weitere Analyse zur Verfügung. Für eine gesicherte quantitative Analyse der Subproteinmuster war es notwendig, die Trennung der Proteinmuster mehrfach zu wiederholen. Wegen der geringen Proteinmenge wurden die Proben deshalb für die isoelektrische Fokussierung auf 7 cm Strips und nicht wie anfänglich auf 18 cm Strips aufgetragen. So wurde pro Strip nur $\frac{1}{5}$ der Proteinmenge (10 μg) eingesetzt. Für die zweite Dimension, der SDS-PAGE, wurden Gradientengele gewählt, die eine bessere Auftrennung boten. Das gewählte Format mag ungewöhnlich sein, zeigte unter den gegebenen Umständen jedoch die besten Ergebnisse. Sortiert wurden Proben von zwei unabhängigen pH-Auxostatexperimenten. Entsprechend ihres DNA-Gehaltes wurden die Subpopulationen C_1 , C_2 und C_4 separiert. Von jeder Subpopulation wurden je 3 Gele angefertigt. Nur Spots, die sich in allen drei Gelen veränderten (2-fach verstärkt oder neu exprimiert wurden), wurden auch als solche quantifiziert.

Obwohl die Qualität der 2D-Gele nicht der der unsortierten Gesamtpopulation entsprach, konnten mehr als 130 Spot/ Subpopulation detektiert werden. Der Vergleich der Proteinmuster der Subpopulationen sollte Informationen über Zellzyklus regulierte Mechanismen und über die physiologischen Veränderungen der Subpopulation C_1 , die unter zunehmenden Phenolrestkonzentrationen detektiert wurde, liefern. Insgesamt wurden 13 Spots (das entspricht 8,5 % aller detektierten Spots), die sich in ihrem Expressionsmuster während der einzelnen Zellzyklusphasen unterschieden, detektiert (Abb. 28, Tab. 22). Bei zwei Spots handelt es sich um Isoformen mit unterschiedlichen molaren Massen bzw. isoelektrischen Punkten. Zwei weitere Spots konnten bisher nicht identifiziert werden. Das Proteinmuster der Subpopulation C_2 wurde als Referenz ausgewählt, da dieser Zustand der bevorzugte von *C. necator* JMP134 ist. Die veränderten Proteine wurden drei unterschiedlichen funktionellen Gruppen zugeordnet: i) spezifische Reaktionen des Metabolismus, ii) Proteine des Transportes und iii) der Translation.

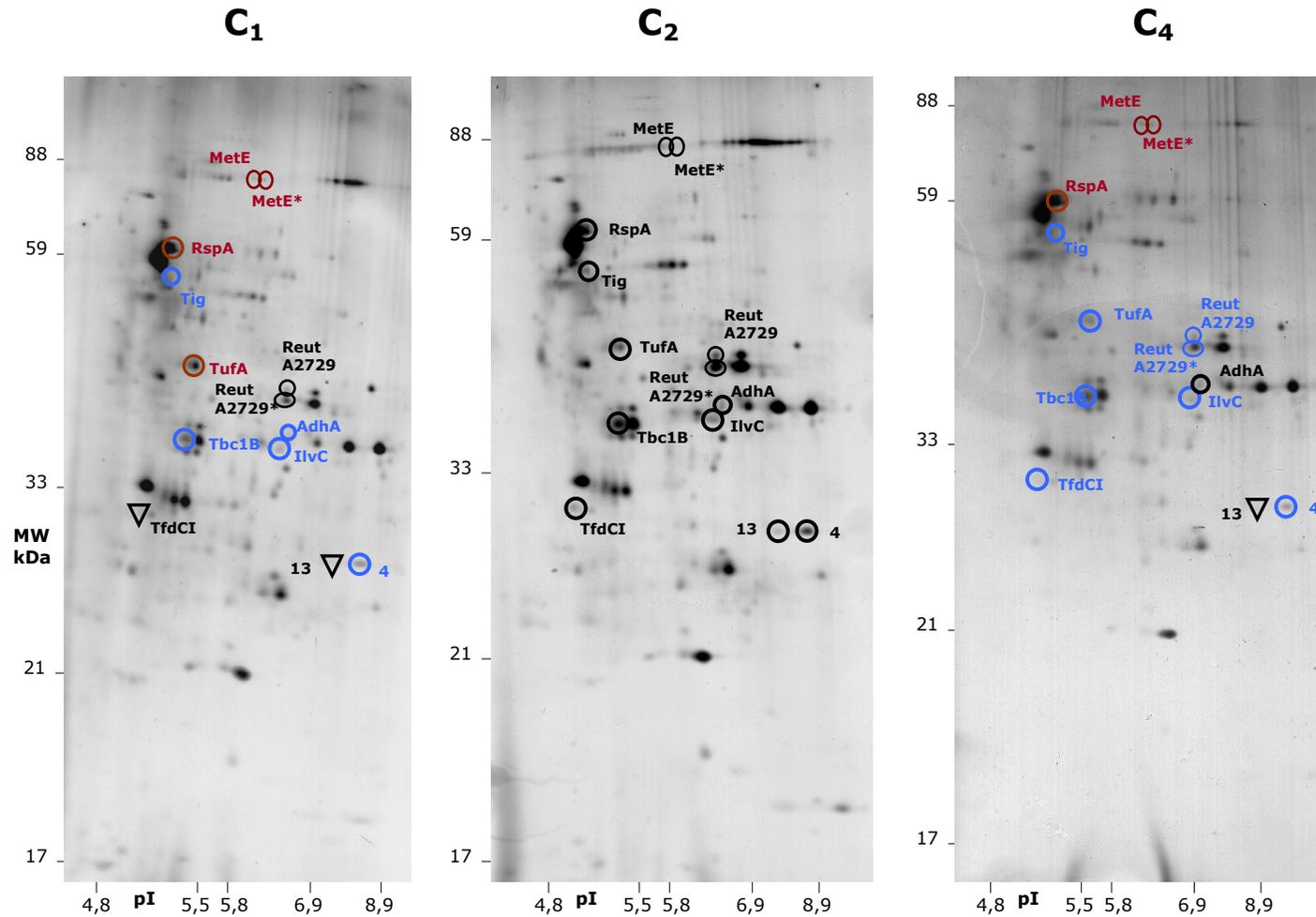


Abb. 28: Proteinmuster der Subpopulationen C₁, C₂ (Referenz) und C₄. ○ Proteine im Referenzgel (C₂), bzw. mit unveränderter Expression in C₁ oder C₄, ● Proteine die im Vergleich zu C₂ um das 2-fache abgeschwächt sind, ○ Proteine die im Vergleich zu C₂ um das 2-fache verstärkt exprimiert wurden, ▽ Proteine die im Vergleich zu C₂ in C₁ oder C₄ nicht detektiert wurden.

Ergebnisse

Tabelle 22: Unterschiede zwischen den Proteinmustern der Subpopulationen von *C. necator* JMP134. Die Zuordnung der Proteinfunktionen erfolgte mit Hilfe der *C. necator* JMP134 Genomdaten (TIGR, <http://www.tigr.org>). (* : Isoformen)

Funktion	Gen-name	mol. Masse kDa/ pI	Accession Nummer	Score	% sequence coverage	% sequence coverage		
						C ₁	C ₂	C ₄
i) Metabolismus								
Phenolhydroxylase-Komponente	<i>tbc1B</i>	37,1/ 5,5	AAZ61065	764	32	0,37 ↓	1,01	0,29 ↓
Chlorocatechol-1,2-Dioxygenase	<i>tfdCI</i>	30,3/ 4,9	YP025387	843	53	-	0,28	0,06 ↓
Energie Metabolismus								
Zink-abhängige Alkohol- Dehydrogenase	<i>adhA</i>	38,9/ 6,0	AAZ63035	673	23	0,13 ↓	0,28	0,16 ↓
Aminosäurebiosynthese								
Ketolsäure-Reduktoisomerase	<i>ilvC</i>	36,9/ 5,9	AAZ60328	861	40	0,30 ↓	0,62	0,17 ↓
Methionin-Synthase	<i>metE</i>	86,8/ 5,7	AAZ63598	911	16	0,05 ↑	0,01	0,06 ↑
Methionin-Synthase*	<i>metE</i>	86,8/ 5,7	AAZ63598	1120	26	0,10 ↑	0,02	0,06 ↑
ii) Translation								
ribosomales Protein S1	<i>rspA</i>	61,2/ 5,2	AAZ61930	1679	46	4,19 ↑	1,95	7,46 ↑
Elongationsfaktor Tu	<i>tufA</i>	44,4/ 5,5	AAZ62556	1079	42	1,70 ↑	0,48	0,18 ↓
Triggerfaktor	<i>tig</i>	54,4/ 5,2	AAZ60749	922	35	0,17 ↓	0,34	0,11 ↓
iii) Transport								
extrazellulärer Liganden- Bindungsrezeptor	Reut A2729	42,8/ 5,9	AAZ62090	681	28	1,89 ↓	2,23	0,87 ↓
extrazellulärer Liganden- Bindungsrezeptor*	Reut A2729	43,8/ 5,9	AAZ62090	1195	45	0,34 ↓	0,59	0,14 ↓
iv) andere								
3	n. i.	26,9/ 9,0	-	-	-			
14	n.i.	26,9/ 8,5	-	-	-			

i) Proteine des Metabolismus

Die Phenolhydroxylase ist das initiale Enzym der Phenolassimilation. Die detektierte Komponente Tbc1B nahm in Zellen der C₁- und C₄-Subpopulation ab. Ähnlich verhielt sich die Ketolsäure-Reduktoisomerase, ein Enzym, das in die Synthese der verzweigten Aminosäuren Isoleucin und Valin involviert ist. Die Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase (TfdCI) katalysiert den ersten Schritt beim Chlorcatecholabbau, konnte aber auch während des Wachstums von *C. necator* JMP134 auf nichtchlorierten Aromaten wie Phenol (Abb. 8, S.47) und Catechol detektiert werden. Die Expression dieses Enzyms nahm in C₄-Zellen ab und konnte in C₁-Zellen nicht detektiert werden, wohingegen die Zink-abhängige Alkohol-Dehydrogenase in C₁-Zellen abnahm, ihr Expressionslevel in C₄-Zellen jedoch konstant blieb. Alkohol-Dehydrogenasen katalysieren die reversible Oxidation von Alkoholen und sind in verschiedenen metabolischen Wegen wie Glycolyse, Gluconeogenese oder Fettsäuresynthese involviert. Die Funktion der hier detektierten Alkohol-Dehydrogenase konnte nicht geklärt werden.

Des Weiteren konnten zwei Isoformen der Methionin-Synthase detektiert werden, die unterschiedliche Expressionsmuster während der Zellzyklusphasen zeigten. Die Methionin-Synthase katalysiert den finalen Schritt in der Methioninbiosynthese. Beide Isoformen wurden in allen Subpopulationen detektiert, wobei ihre Expression am niedrigsten in C₂-Zellen war. Verschieden Autoren fanden eine veränderte Expression der Methionin-Synthase unter verschiedenen Stressbedingungen, konnten jedoch keine Erklärung dafür geben [Smith und Neidhardt 1983, Burt et al. 1999, Hondrop und Matthwes 2004].

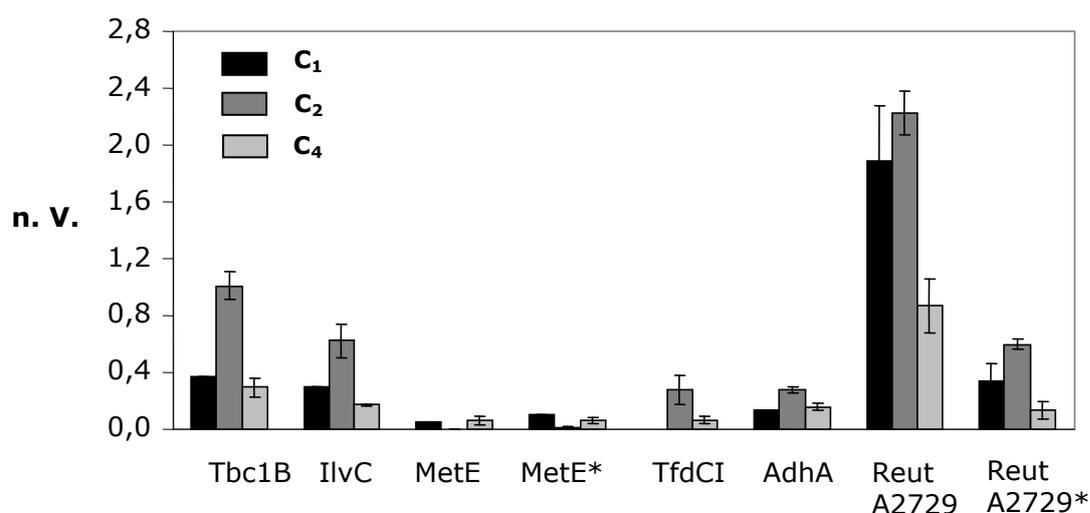


Abb. 29: Transportproteine und Proteine des Metabolismus, die sich in ihrer Expression in den Subpopulationen unterscheiden. n.V.: normalisiertes Volumen. Schwarze Balken: C₁, dunkelgraue Balken: C₂, hellgraue Balken: C₄.

ii) Proteine des Translation

Elongationsfaktor Tu (TufA) und ribosomales Protein S1 (RspA) sind in die Proteintranslation involviert und essentiell für die Lebensfähigkeit einer Zelle. Das ribosomale Protein S1 bindet an die 30S Untereinheit des Ribosoms und ist an der Bindung der tRNA und mRNA am Ribosom beteiligt [Wower et al. 2000]. Die Expression von S1 ist in C₁-Zellen erhöht, während sie in C₄-Zellen erniedrigt ist.

Elongationsfaktor Tu fördert die GTP abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an die A-Seite des Ribosoms und scheint ebenfalls an der Faltung und den Schutz von Proteinen unter Stresssituationen beteiligt zu sein, da es *in-vitro* Chaperonaktivität aufweist [Caldas et al. 1998]. Der Triggerfaktor gehört zur Familie der Ribosom-assoziierten Chaperone und schützt naszierende Proteine vor Missfaltung und Aggregation. Des Weiteren agiert er zusammen mit GroEL und GroES beim selektiven Abbau verschiedener Polypeptide [Kandror et al. 1995]. Seine Expression nahm in C₁- und C₄-Zellen ab.

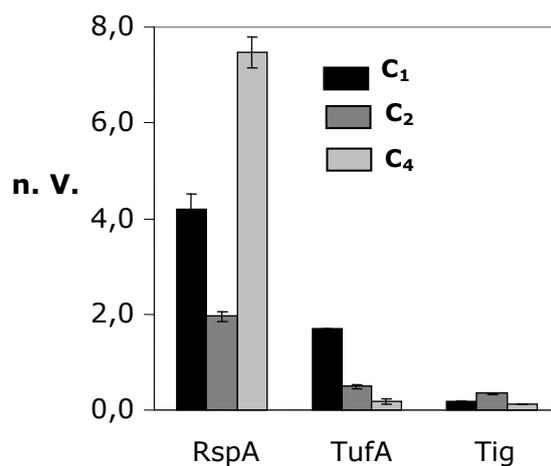


Abb. 30: Proteine der Translation, die sich in ihrer Expression in den Subpopulationen unterscheiden. n.V.: normalisiertes Volumen. Schwarze Balken: C₁, dunkelgraue Balken: C₂, hellgraue Balken: C₄.

iii) Proteine der Transportes

Das extrazelluläre Liganden-Bindungsrezeptorprotein des Aminosäuretransporters Reut2729 wurde mit zwei Isoformen im 2D-Gel detektiert. Er ist vermutlich in den Transport der Aminosäuren Isoleucin, Valin, Leucin und Threonin involviert. Während in C₁-Zellen der Expressionslevel von beiden Isoformen unverändert blieb, nahm er in C₄-Zellen ab.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die aktiven und passiven Adaptionsmechanismen von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Phenol untersucht.

Neben der Bestimmung physiologischer Parameter und Enzymaktivitäten, erfolgte mit Hilfe der Proteomanalyse eine globale Analyse der exprimierten Proteine. Durch die flowzytometrische Analyse der Population konnten weitere Adaptionsmechanismen auf zellulärer Ebene aufgezeigt werden. Mit der Etablierung einer Methode, welche Flowzytometrie, Zellsortierung und Proteomanalyse kombinierte, war es möglich, Mechanismen nicht nur auf Populations-, sondern auch auf Subpopulationsebene zu untersuchen, und so einen tieferen Einblick in die Dynamik der Population während des Wachstums mit toxischen Phenolkonzentrationen zu erhalten.

4.1 Adaptionsmechanismen auf Populationsebene

4.1.1 Die Entgiftung von Phenol: Wachstum versus PHB-Synthese

Bereits zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass in *C. necator* JMP134 zwei Phenolassimilationswege, *ortho*- und *meta*-Weg, in Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit induziert werden [Pieper et al. 1989, Müller et al. 1996]. Des Weiteren war bekannt, dass *C. necator* JMP134 in der Lage ist PHB zu synthetisieren. Dies wurde von Maskow und Babel [2001] bei der Kultivierung unter Stickstoff-limitierten Bedingungen beobachtet. Dabei wurde von ihnen, auf Grund theoretischer Betrachtungen, ein Zusammenhang zwischen Assimilationsweg und PHB-Synthese vermutet. Ihre Hypothese geht davon aus, dass bei der Assimilation von Phenol via *ortho*-Weg, im Gegensatz zum *meta*-Weg, Energie in Form von Reduktionsäquivalenten anfällt, welche als PHB gespeichert werden könnten. Der Substratkohlenstoff kann also für Wachstum und Vermehrung genutzt und/oder in PHB festgelegt werden. Da sowohl der produktive Abbau von Phenol als auch dessen Metabolisierung in PHB zu einer Abnahme der Konzentration des Phenols führt, können beide Mechanismen als aktive Adaptionsmechanismen betrachtet werden.

Wofür der Kohlenstoff letztendlich genutzt wird und ob es einen Zusammenhang zwischen den Abbauwegen und der Synthese von PHB gibt, wurde während der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen und bei Substratüberschuss untersucht.

AcCoA ist ein Intermediat in beiden Abbauwegen und Ausgangssubstrat für die PHB-Synthese. Es kann via Tricarbonsäurezyklus für die Energiesynthese genutzt, mittels Ketothiolase in PHB gespeichert oder mit Hilfe der Glyoxylatzyklus Enzyme in die Gluconeogenese eingeschleust [Kronberg 1966] und so für die Synthese von

Zellbausteinen genutzt werden. In den meisten Bakterien erfolgt die Synthese von PHB überwiegend unter Bedingungen, bei denen Kohlenstoff im Überschuss vorliegt, während z.B. Stickstoff und Phosphat limitiert sind.

Die gewonnenen Resultate von *C. necator* JMP134 zeigen, dass dieser auch unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen PHB synthetisiert. Während des Wachstums auf Phenol via *ortho*-Weg verläuft die PHB-Synthese wachstumsassoziiert (Abb. 4, S.39), d.h. der Kohlenstoff wird sowohl für Wachstum und Vermehrung, als auch für die PHB-Synthese genutzt. Die Tatsache, dass mit steigender Wachstumsrate die PHB-freie Biomasse konstant bleibt, während der PHB-Gehalt steigt, zeigt, dass zunehmend mehr Kohlenstoff in die PHB-Synthese fließt. Ein Grund für dieses Verhalten könnte ein metabolischer „Flaschenhals“ sein. Die Aktivitätsbestimmung der Citrat-Synthase, die mit der Ketothiolase (dem ersten Enzym der PHB-Synthese) um das Substrat AcCoA konkurriert [Senior und Dawes 1971, Mothes 1997], zeigte mit zunehmender Wachstumsrate eine Aktivitätsabnahme des Enzyms während des Wachstums im *ortho*-Weg (Abb. 6, S.42). Normalerweise sollte davon auszugehen sein, dass mit zunehmender Wachstumsrate auch der Energiebedarf der Zellen steigt, und somit die Aktivität der Citrat-Synthase. Die gemessene Aktivitätsabnahme könnte also ein Grund für die wachstumsassoziierte PHB-Synthese sein, wie es z.B. auch für die wachstumsassoziierte PHB-Synthese in *Methylobacterium rhodesianum* postuliert wurde [Ackermann und Babel 1997].

Mit der Induktion des *meta*-Weges bei einer Durchflussrate von $D \leq 0,15 \text{ h}^{-1}$, nimmt die Aktivität der Citrat-Synthase zu und der PHB-Anteil in den Zellen ab ($D \leq 0,20 \text{ h}^{-1}$), während der Anteil der PHB-freien Biomasse zunimmt (Abb. 4, S.39). Es wird mehr Kohlenstoff in Wachstum und Vermehrung eingeschleust als in die PHB-Synthese. Dies spiegelt sich auch in der Proliferationsaktivität der Zellen wieder, welche mit der Induktion des *meta*-Weges deutlich zunimmt (Abb. 15, S.66).

Da der *ortho*-Weg jedoch weiterhin exprimiert bleibt, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob während des Wachstums im *meta*-Weg eine PHB-Synthese stattfindet. Dies wurde von Leonard und Lindley [1998] in dem Bakterium *Ralstonia eutopha* 335, das Phenol nur via *meta*-Weg assimiliert, beobachtet. Die Ursache dafür wurde in der geringen Aktivität der Glyoxylatzyklus-Enzyme, die ein Einschleusen von AcCoA in die Gluconeogenese erlauben, vermutet. Die Aktivität dieser Enzyme betrug im Vergleich zu auf Acetat kultivierten Zellen nur ein Fünftel. Die Aktivitäten der Glyoxylatzyklus-Enzyme in *C. necator* JMP 134 waren höher. Während die Malat-Synthase-Aktivität sogar etwas höher war, als in Zellen, die auf Acetat kultiviert wurden, betrug die Aktivität der Isocitrat-Lyase jedoch nur ein Drittel deren von Zellen, die auf Acetat kultiviert worden waren (Tab. 17, S.40). Ausschlaggebend für die Aktivität des

Glyoxylatzyklus ist jedoch das erste Enzym, die Isocitrat-Lyase. Da dessen Aktivität signifikant geringer war, als bei Zellen, die auf Acetat kultiviert wurden, ist es möglich, dass die Kapazität des Glyoxylatzyklus nicht ausreicht und AcCoA in PHB kanalisiert werden kann. Für eine eindeutige Aussage müssten Untersuchungen mit Mutanten durchgeführt werden, bei denen jeweils nur ein Abbauweg induziert wird.

Mit der kontinuierlichen Kultivierung im pH-Auxostat wurde die Rolle der Abbauwege und der PHB-Synthese bei Substratüberschuss, d. h. unter zunehmenden toxischen Phenolkonzentrationen, untersucht. Hier erfolgte die Induktion des *meta*-Weges bereits bei Durchflussraten $D > 0,05 \text{ h}^{-1}$, nach dem die Phenolrestkonzentration $c_R \geq 1,7 \text{ mM}$ betrug (Abb. 7, S.43). PHB wurde während des Wachstums im *ortho*-Weg gebildet, und auch nach der Induktion des *meta*-Weges nahm der Anteil des PHBs in den Zellen zu. Erst nachdem die Phenolrestkonzentration $c_R \geq 2 \text{ mM}$ ($t = 50 \text{ h}$) überschritt, nahm der PHB-Gehalt signifikant ab (Abb. 7, S.43). Die zunehmende Phenolrestkonzentration führte zur Induktion des *meta*-Weges und vor allem zu einer Hemmung des Wachstums. Die Wachstumsrate und die gebildete Biomasse nahmen bei einer Phenolrestkonzentration von bei $c_R = 8,7 \text{ mM}$ bis zu 80% ab, es fanden aber weiterhin Wachstum, Vermehrung und PHB-Synthese statt.

Die durch die Analyse von Wachstumsparametern und Enzymaktivitäten gewonnenen Erkenntnisse geben nur begrenzt Auskunft über die Adaptationsvorgänge. So bleibt die Ursache für die Wachstumshemmung unklar. Sie könnte z.B. das Ergebnis von beeinträchtigten Transportvorgängen, verursacht durch Veränderungen der Membranpermeabilität sein. Um dies zu klären wurden weiterführend die Proteinmuster von *C. necator* JMP134 analysiert.

4.1.2 molekulare Analyse der globalen Adaptionsmechanismen

Die Analyse von Proteinmustern liefert Einblicke in die globalen Mechanismen, die der Toxizität und Toleranz verschiedener Substrate in Bakterien zu Grunde liegen. Dabei werden im Allgemeinen zwei Strategien verfolgt. Zum einen wird der Stressor zu Zellen gegeben, die zu diesem Zeitpunkt auf einem nicht toxischen Substrat wachsen, um so die Mechanismen zu identifizieren, die kurzfristig induziert werden [Santos et al. 2004, Segura et al. 2005]. Zum anderen wird das Wachstum mit dem toxischen Substrat untersucht, um so Abbauenzyme oder weitere Proteine, die die Zellen passiv gegen eine Vergiftung schützen, identifizieren zu können, und langfristige Adaptionsmechanismen zu erkennen. In der Literatur sind diverse Beispiele beschrieben, bei denen mit Hilfe der Proteomanalyse die Abbauwege aromatischer Substanzen charakterisiert wurden, z.B. von *Acinetobacter radioresistens*, *Azoarcus evansii*

Acinetobacter sp. KS-1, *Pseudomonas* sp. K82 oder *Pseudomonas* sp. pHDV1 [Giuffrida et al. 2001, Gescher et al. 2002, Kim et al. 2003, Kim et al. 2004, Tsirogiani et al. 2004].

Mit der Analyse der Proteinmuster von Zellen, die kontinuierlich mit Phenol kultiviert wurden, sollten zum einen Aussagen über das primäre *Target* von Phenol in *C. necator* JMP134 Zellen getroffen, und zum anderen die langfristigen Adaptationsstrategien (aktive, passive), die bei einem Einsatz des Mikroorganismus in Sanierungsverfahren von Bedeutung sind, untersucht werden.

4.1.2.1 Identifizierte aktive Mechanismen

Der Vergleich der Proteinmuster von Zellen, die auf Pyruvat (Kontrolle) und Phenol kultiviert wurden zeigt, dass eine Vielzahl der identifizierten Proteine Enzyme des Phenolmetabolismus (42 %) sind (Tabelle 18 und 19, S.47, 53). Neben den Enzymen des *ortho*-Weges wurden auch die induzierten Enzyme des *meta*-Weges identifiziert. Interessant hierbei ist die beobachtete unterschiedliche Induktion verschiedener Monooxygenasen, von denen Komponenten von vier Monooxygenasen (Tbc, Phl, Pht und eine putative Styrenmonooxygenase) identifiziert wurden. Ihre Gene sind sowohl auf dem Chromosom 1 (*pht*) als auch auf dem Chromosom 2 (*phl*, *tbc*, Styrenmonooxygenase) lokalisiert. (*C. necator* JMP134 gehört zu den multichromosomalen Mikroorganismen und besitzt neben 2 Chromosomen auch zwei Plasmide.) Alle identifizierten Monooxygenasen gehören zu den Multikomponenten-Monooxygenasen und wurden in Abhängigkeit des genutzten Abbauweges und der Phenolrestkonzentration unterschiedlich induziert (Tab. 23, Abb. 31, S. 90).

Im Proteinmuster von Zellen die im Chemostat kultiviert wurden, und nur den *ortho*-Weg induziert hatten, konnten Komponenten der Phenolhydroxylasen Tbc, Pht identifiziert werden. Während die Enzyme des *ortho*-Weges und die Pht Phenolhydroxylase auf dem Chromosom 1 lokalisiert sind, sind die Gene der Tbc Phenolhydroxylase auf dem Chromosom 2 lokalisiert.

Im Proteinmuster Chemostat kultivierter Zellen, die zusätzlich den *meta*-Weg induzierten, der auf dem Chromosom 2 lokalisiert ist, wurden außerdem eine Komponente der Phl Phenolhydroxylase, sowie die Oxygenase-Untereinheit einer putativen Styrenmonooxygenase identifiziert. Beide sind ebenfalls auf dem Chromosom 2 lokalisiert.

Im Proteinmuster pH-Auxostat kultivierter Zellen, die zusätzlich den *meta*-Weg induzierten, wurde im Vergleich zu Chemostat kultivierten Zellen mit *ortho*- und *meta*-Weg, eine andere Komponente der Phl Phenolhydroxylase sowie eine putativen Styrenmonooxygenase Komponente mit vier Isoformen identifiziert.

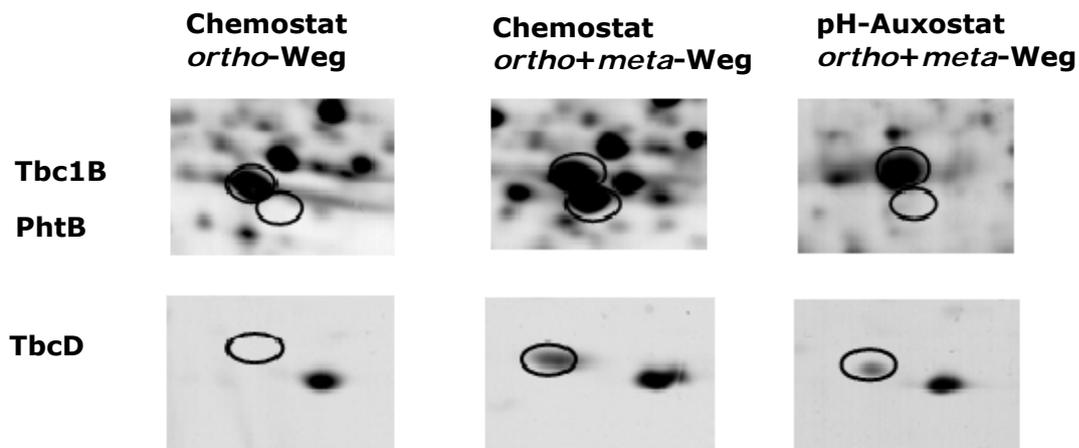


Abb. 31: Unterschiedliche Expression einzelner Phenolhydroxylase-Komponenten bei der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol von *C. necator* JMP134 im Chemostat oder pH-Auxostat.

Tabelle 23: Identifizierte Monooxygenase-Komponenten von *C. necator* JMP134. Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe der Genomdatenbank von *C. necator* JMP134 (www.tigr.org).

Protein	Funktion	Lokalisation	Chemostat <i>ortho</i> -Weg	Chemostat <i>ortho</i> + <i>meta</i> - Weg	pH-Auxostat <i>ortho</i> + <i>meta</i> - Weg
PhtB	Oxygenase	Chromosom 1	-	x	-
PhyD ^{*)}	n.b.	Chromosom 1	x	x	x
PhIX	Transport	Chromosom 2	-	x	-
PhIO	Oxygenase	Chromosom 2	-	-	x
TbcD	Oxygenase	Chromosom 2	-	x	x
Tbc1B	Oxygenase	Chromosom 2	x	x	x
Tbc1F	Reduktase	Chromosom 2	-	x	-
Reut 3469 ^{**)}	Oxygenase	Chromosom 2	-	x	x

^{*)} gehört zur Pht Monooxygenase, ^{**)} putative Styrenmonooxygenase Untereinheit,
n.b.: nicht bekannt

Die drei detektierten Phenolhydroxylasen gehören zu den Multikomponenten Phenolhydroxylasen und werden laut Notomista et al. [2003] von einem einzelnen Operon, das fünf bis sechs Polypeptide kodiert, transkribiert.

Die Tbc und Pht Monooxygenasen gehören, nach einer Einteilung von Notomista [2003], zur Gruppe 1 der bakteriellen Monooxygenasen, in der Phenolhydroxylasen die Mehrheit bilden. Diese setzen sich aus drei Komponenten zusammen (Abb. 32). Erstens einer, aus drei Monomeren (α , β , γ) bestehenden Oxygenase, die das Substrat und den Sauerstoff bindet. Die γ -Untereinheit ist dabei mit dem $\alpha\beta$ -Komplex assoziiert [Notomista et al. 2003]. Zweitens eine Reduktase, ein monomeres Eisen-Schwefel-Protein [Harayama et al. 1992], welches das NAD(P)H bindet und für den Elektronentransfer vom NAD(P)H zur Oxygenase verantwortlich ist. Bei der dritten Komponente handelt es sich um ein 90-140 Da großes Protein, welches ebenfalls die Oxidation von NAD(P)H mit der Hydroxylierung des Substrates koppelt und somit den Umsatz erhöht [Powlowski und Shingler 1994, Notomista et al. 2003]. Informationen über die Struktur der letzten Komponente lassen vermuten, dass die Reduktase und die dritte Komponente physisch miteinander interagieren und die Aktivität der Oxygenase-Komponente modulieren [Gallagher et al. 1999, Wallar und Lipscomb 2001]. Die PhI Phenolhydroxylase gehört zur Gruppe zwei der Multikomponenten-Monooxygenasen. Bei diesen wurde noch eine vierte Komponente identifiziert, ein Rieske-Typ Ferredoxin, welches ebenfalls den Elektronentransfer von der Reduktase zur Oxygenase vermittelt [Pikus et al. 1996]. In dieser Klasse sind hauptsächlich Toluol- und Benzen Monooxygenasen vertreten.

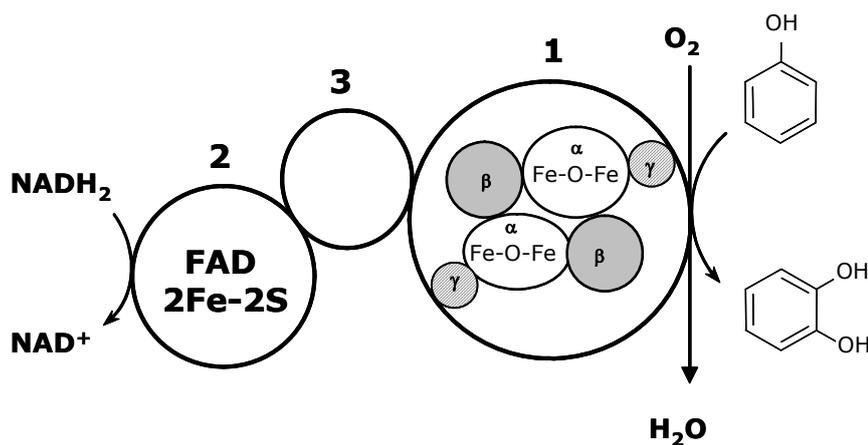


Abb. 32 : Schematische Darstellung der aus drei Komponenten bestehenden Multikomponenten-Phenolhydroxylase. 1: Oxygenase-Komponente, 2: Reduktase-Komponente, 3: Komponente 3. Adaptiert nach Powlowski und Shingler et al. [1994] und Notomista [2003].

Bisher sind in *C. necator* JMP134 nur Komponenten der Monooxygenase PhI sequenziert worden, die für den cometabolischen Abbau von Trichlorethen verantwortlich gemacht wird [Ayoubi und Harker 1998]. Es gab keine Hinweise auf das Vorhandensein weiterer Phenol-Monooxygenasen. Die Induktion mehrere Monooxygenasen bei der Assimilation eines Substrates ist zwar ungewöhnlich, aber nicht unbekannt, wie Untersuchungen mit *Pseudomonas stutzeri* OX1 zeigen [Cafaro et al. 2004]. Dieser Stamm gehört zu den wenigen (neben *Ralstonia metallidurans* CH34 und *Burkholderia cepacia* JS150 [Notomista et al. 2003]) bei denen mehrere Multikomponenten-Monooxygenasen im Genom identifiziert wurden. Beim Wachstum auf nichthydroxylierten Aromaten induziert *Pseudomonas stutzeri* OX1 sowohl eine Phenolhydroxylase, als auch eine Toluemonooxygenase. Es wird vermutet, dass dadurch der Abbau der aromatischen Komponenten optimiert wird.

Die in *C. necator* JMP134, mit dem Zuschalten des *meta*-Weges, detektierte Induktion zweier weiterer Monooxygenasen, lässt eher vermuten, dass eine oder beide der bereits im *ortho*-Weg induzierten Phenolhydroxylasen (Pht, Tbc) ein *bottleneck* darstellen und die Induktion einer weiteren Phenolhydroxylase (PhI) zur Stabilisierung der Phenol-assimilation führt. Unterstützt wird diese Annahme durch Aktivitätsmessungen von Müller und Babel [1996]. Die von ihnen bestimmte Phenolhydroxylaseaktivität in *C. necator* JMP134 Zellen weist nach dem Zuschalten des *meta*-Weges keine Zunahme auf, obwohl zwei weitere Monooxygenasen induziert wurden.

Die Induktion der Styrenmonooxygenase scheint dagegen eher das Ergebnis einer unspezifischen Reaktion zu sein, die durch die zunehmende Phenolrestkonzentration, oder dem akkumulierenden Hydroxyumuconsäure-Semialdehyd, Styren wird ebenfalls über den *meta*-Weg assimiliert [Warhurst et al. 1994], ausgelöst wird.

Neben der Induktion zusätzlicher Monooxygenasen wurde auch die unterschiedliche Induktion einzelner Komponenten innerhalb einer Monooxygenase beobachtet (Abb. 31). Dabei wurden alle identifizierten Phenolhydroxylase-Komponenten des *ortho*-Weges auch in Zellen mit induziertem *meta*-Weg detektiert. Wohingegen nicht alle identifizierten Phenolhydroxylase-Komponenten des *meta*-Weges im Chemostat kultivierter Zellen auch bei Zellen die im pH-Auxostat kultivierten wurden detektiert werden konnten (Tab. 23).

Während es sich bei den Komponenten PhIO, PhtB und TbcD um Untereinheiten der Oxygenase handelt, ist Tbc1F die Reduktase und PhIX ein putativer Phenoltransporter. Aus Untersuchungen mit *Pseudomonas stutzeri* OX1 ist bekannt, dass Multikomponenten-Phenolhydroxylasen auch ohne funktionstüchtige Reduktase den

Abbau des Aromaten katalysieren, allerdings weniger effizient [Cafaro et al. 2004]. Die in *C. necator* JMP134 detektierte Repression von Tbc1F in Zellen mit *ortho*-Weg und in Zellen, die im pH-Auxostat kultiviert wurden, führt demnach zu einer verringerten Aktivität der Tbc Phenolhydroxylase, und bedingt so die Induktion der PhI Phenolmonooxygenase.

Bisher ist nicht bekannt, ob für die Funktionsweise der Phenolhydroxylase alle drei Oxygenase-Untereinheiten notwendig sind. Essentiell ist die, für die Bindung des Sauerstoffs und Substrates zuständige, α -Untereinheit, auf der das *Diiron-Cluster* lokalisiert ist [Divari et al. 2003, Leahy et al. 2003]. Die γ -Untereinheit übernimmt dagegen nur eine stabilisierende Funktion [Notomista et al. 2003]. Da auch Monooxygenasen ohne γ -Untereinheit identifiziert wurden (*Pseudonocardia* sp. K1, *Nocardia corallina* B-267 und *Rhodobacter spaeroides* 2.41 [Notomista et al. 2003]), wäre es möglich, dass ein Verlust dieser die Funktion des Enzyms nicht oder zumindest nicht vollständig beeinträchtigt, bzw. die Funktion von der Komponente einer anderen Oxygenase übernommen werden könnte.

Auf den Proteinmustern konnten zwar nicht alle Komponenten der Multikomponenten-Monooxygenasen detektiert werden, die Analyse der identifizierten Komponenten deutet jedoch darauf hin, dass diese Monooxygenasen unterschiedlich reguliert werden.

Neben den Enzymen des Phenolmetabolismus wurde die verstärkte Expression der Untereinheit C (AhpC) der Alkylhydroperoxid-Reduktase detektiert. AhpC reduziert organische Hydroperoxide, die während des Wachstums entstehen, zu den jeweiligen untoxischen Alkoholformen und gehört zu den Enzymen, die bei oxidativem Stress induziert werden [Ochsner et al. 2001]. Eine verstärkte Expression von AhpC wurde u. a. beim Wachstum von *Pseudomonas putida* KT2440 mit Phenol [Santos et al. 2004], Toluol [Fukomori und Kishii 2001] und MTBE beobachtet [Krayl et al. 2003]. Ein Vergleich mit dem Proteinmuster Catechol kultivierter *C. necator* JMP134 Zellen (nicht gezeigt) zeigte, dass das Enzym auch hier, im Vergleich zu den auf Pyruvat kultivierten Zellen, verstärkt exprimiert wurde. Das lässt vermuten, dass Catechol, das erste Abbauprodukt des Phenolmetabolismus, und nicht Phenol, für die Induktion verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass Catechole in Organismen zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen durch Redoxcycling führen [Schweigert et al. 2001]. Unabhängig davon ob die reaktiven Sauerstoffverbindungen von außen in den Organismus eindringen, oder innerhalb des Organismus durch Redoxcycling gebildet werden, reagieren die Organismen darauf mit der Synthese von entgiftenden Enzymen, wie AhpC. So induziert *Acinetobacter calcoaceticus* in Gegenwart von Catechol AhpC

und die Katalase HPI, während dieser Organismus bei Phenol Hitzeschockproteine induziert [Benndorf et al. 1999]. Obwohl im Kulturüberstand kein Catechol detektiert werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass es in den Zellen zur Akkumulation kleiner Mengen kommt, was letztendlich zur verstärkten Induktion des oxidativen Stressproteins AhpC führt.

4.1.2.2 Identifizierte passive Mechanismen

Wachstum im Chemostat ($c_R \approx 0$ mM)

Der Einfluss von Stress führt bei Organismen zur Schädigung von Proteinen, welche daraufhin akkumulieren und durch den Verlust ihrer 3D-Struktur ihre Aktivität verlieren. Diese Proteine müssen abgebaut werden, da sie die Lebensfähigkeit der Zelle beeinträchtigen [Gottesmann und Wickner 1995]. Diese Aufgabe übernehmen molekulare Chaperone und Proteasen, die unter anderem durch die Hitzeschockantwort induziert werden und in der Lage sind geschädigte Proteine zu reparieren bzw. abzubauen. In *Acinetobacter calcoaceticus* wurde die Induktion von GroEl und Dnak, Komponenten zweier Chaperonkomplexe, in Gegenwart von primären Alkoholen und Phenol beobachtet [Benndorf et al. 1999, Benndorf et al. 2001], in *Pseudomonas putida* KT2440 die Induktion der Hitzeschockproteine (HtpG und ClpB) [Santos et al., 2004].

Im Proteinmuster von *C. necator* JMP134 Zellen wurde währenddessen keine verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen oder Proteasen, die im Cytoplasma lokalisiert sind beobachtet, was bedeutet, dass die Schädigung cytoplasmatischer Proteine gering und das Cytoplasma nicht das *Target* des Phenols ist. Während im Cytoplasma ATP-abhängige Proteasen wie ClpXP, Lon und FtsH die Funktion der Proteinreparatur bzw. des Proteinabbaus übernehmen [Schumann 1994], gibt es im Periplasma Gram negativer Bakterien ATP-unabhängige Chaperone mit Proteasefunktion. Der erste Kontaktpunkt für toxische Stoffe sind die Membranen der Zelle. Hydrophobe organische Lösungsmittel, wie Phenol, beeinflussen die Integrität und Funktionalität der Zellmembran, da sie dort wegen ihrer lipophilen Eigenschaften Wechselwirkungen mit den biologischen Strukturen eingehen und dadurch deren Funktion beeinträchtigen [Davidson und Branen 1981 und Heipieper et al. 1991]. Mit der in *C. necator* JMP134 verstärkten Induktion von DegQ wirken die Zellen der Schädigung der Membranen entgegen. DegQ ist eine periplasmatische Serin-Endoprotease und gehört zu diesen ATP-unabhängigen Chaperonen mit Proteasefunktion, welche für die richtige Faltung der Proteine im periplasmatischen Raum zuständig sind [Waller und Sauer 1996, Kolmar et al. 1996, Kim und Kim 2005].

Mit dem Abbau denaturierter und ungefalteter Proteine übernimmt DegQ so eine entscheidende Funktion bei der Kontrolle der Proteinqualität.

Mit der verstärkten Expression der Peptidyl-Prolyl-Isomerase SurA wurde ein weiteres im Periplasma lokalisiertes, an der Faltung von äußeren Membranproteinen beteiligtes, [Lazar et al. 1996] Protein identifiziert. Rouvière und Gross [1996] stellten fest, dass das Fehlen von SurA die Expression der Porine OmpC, OmpF, OmpA und LamB negativ beeinflusst. Über die Porine erfolgt der Stoffaustausch zwischen dem Periplasma und der Umwelt [Liu und Ferenci 1998]. Die verstärkte Expression der Peptidyl-Prolyl-Isomerase kann somit auch eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Nährstoffaufnahme und des Stoffaustausches der Zellen haben.

Neben diesen Enzymen wurden auch Unterschiede in der Expression einiger Transporter-Komponenten erfasst. So wurden ein nicht näher identifiziertes Liganden-Bindungsrezeptorprotein eines putativen Aminosäure-ABC-Transporters und die periplasmatische Komponente eines ABC-Transporters neu induziert. Die Induktion von Aminosäure-ABC-Transportern, auch in *Pseudomonas putida* KT2440 beim Wachstum mit Phenol, 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure, 2,4-Dichlorphenoxyssäure und 2,4-Dichlorphenol von Kurbatov et al. [2006] und Benndorf et al. [2006] beobachtet, wird als Indiz dafür angesehen, dass die Zellen versuchen, zusätzliche Substrate zu erschließen. Neben Aminosäure-Transporten wurden auch andere Enzyme des Aminosäuremetabolismus verstärkt exprimiert. Ein solches Verhalten wurde bereits mehrfach bei der Analyse von Stressantworten auf organische Lösungsmittel oder Xenobiotika beobachtet [Santos et al. 2004, Segura et al. 2005]. *C. necator* JMP134 Zellen exprimierten verstärkt Enzyme der Serin- und Glycinbiosynthese (CysK, GlyA). CysK spielt auch eine Rolle bei der Adaptation an oxidativen-, Kälte- und Salzstress [Graumann et al. 1996, Antelmann et al. 1997, Duche et al. 2002]. Welche Funktion es hierbei genau einnimmt ist bisher nicht bekannt, doch deuten die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen darauf hin, dass vermutlich ähnliche Regulationsmechanismen bei der Anpassung an diese unterschiedlichen Stresssituationen beteiligt sind.

Es wurden auch Enzyme verstärkt exprimiert, die in die Purinbiosynthese involviert sind. Purine- und Pyrimidin-Nucleotide sind die Hauptenergie-Carrier Komponenten der Nucleinsäuresynthese und Precursor für die Synthese von NAD. In *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* erfolgt die *de novo* Synthese von IMP, dem ersten Purin-Nucleotid Intermediat, in elf Schritten [Zalkin 1993, Zalkin und Nygaard 1996]. IMP ist ein Zweigmetabolit, und wird anschließend entweder zu Adenin- oder zu

Guaninnucleotiden umgesetzt. Die beim Wachstum auf Phenol in *C. necator* JMP134 verstärkt induzierte Adenylsuccinat-Synthetase (PurA) katalysiert den ersten Schritt der Umwandlung von IMP zu AMP und wird durch die Konzentration von GTP reguliert [Rappu et al. 1999]. Die ebenfalls identifizierte SAICAR Synthetase (PurC) katalysiert den achten Schritt der Purinbiosynthese. Die verstärkte Expression beider Enzyme zeigt einen erhöhten Energiebedarf der Zellen beim Wachstum auf Phenol an, der sich auch in der verstärkten Induktion anderer, in den Energiemetabolismus der Zelle involvierten Enzyme, wie z.B. der NADH-Quinon-Oxidoreduktase oder Enzyme des Tricarbonsäurezykluses (Tab. 18 S.48) widerspiegelt.

Des Weiteren wurden die Proteine ExbD sowie ein TonB-abhängiger Siderophor-Rezeptor verstärkt bzw. neu exprimiert. ExbD ist, wie TonB, am Transport von Siderophoren durch die äußere Membran beteiligt und nur als Komplex mit TonB aktiv [Fischer et al. 1989]. Wie die meisten Gene, die an der Eisen-, und Häm-Akquisition beteiligt sind, gehört ExbD zu einem Operon, welches in *Escherichia coli* durch Eisen mittels Fur (*ferric uptake regulator*) reguliert wird [Dubrac und Touati 2000, Létoffé et al. 2004]. Fur fungiert hierbei als Transkriptionsregulator, der die Expression der Zielgene reprimiert. Es bindet als Homodimer an eine spezifische DNA-Sequenz und blockiert so den Zugang der RNA-Polymerase an den Promotor, was zu einer Inhibierung der Initiation der Transkription führt [Bagg und Neilands 1987, De Lorenzo et al. 1987]. Unter Eisenmangelbedingungen wird Fur durch die Ablösung des Eisen-Cofaktors inaktiviert und die Gene, die unter der Kontrolle von Fur stehen, werden induziert. Die verstärkte Expression der für die Eisenaufnahme zuständigen Proteine deuten auf einen gesteigerten Bedarf von Eisenionen hin, was zum einem durch die Induktion der eisenabhängigen Monooxygenasen und Catechol-Dioxygenasen des Phenolabbaus hervorgerufen sein könnte. Zum anderen wurde von Zheng et al. [1999] bei *Escherichia coli* nachgewiesen, dass die Regulatoren der oxidativen Stressantwort OxyR und SoxRS auch den Level von Fur modulieren, und so der Eisenmetabolismus koordiniert mit der oxidativen Stress-Antwort reguliert wird. Da mit AphC ein Mitglied der oxidativen Stressantwort identifiziert worden ist, scheint es möglich, dass auch in *C. necator* JMP134 ein solcher Zusammenhang besteht.

Wachstum im pH-Auxostat ($c_R=8,7$ mM)

Bei hohen Phenolrestkonzentrationen ($c_R=8,7$ mM) wurde neben der Induktion der *meta*-Weg die verstärkte Expression einer Exoribonuklease (Pnp) beobachtet. Die Exoribonuklease ist in den Abbau von mRNA involviert [Coburn und Mackie 1999]. In *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Yersinia enterocolitica* [Luttinger et al. 1996,

Goverde et al. 1998, Zangrossi et al. 2000] sind die *pnp* Gene essentiell für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen und spielen eine signifikante Rolle bei globalen Adaptationsphänomenen, wie der Kälteschockantwort aber auch der stationären-Phase-Antwort, bei der tief greifende Veränderungen bei der mRNA-Stabilität zu beobachten sind. Die Induktion eines Enzyms der Stationären-Phase-Antwort scheint, wegen des vorliegenden Substratüberschusses im Medium, merkwürdig. Doch wurde dieses Phänomen auch bei *Pseudomonas putida* mt-2 während des Wachstums auf Toluol beobachtet [Vercellone-Smith und Herson 1997]. In den Zellen von *C. necator* JMP134 führt die hohe Phenolrestkonzentration vermutlich zur Hemmung der Phenoloxidation, wie es auch von Leonard und Lindley [1999] bei *Ralstonia eutropha* 335 beschrieben wurde. Die Induktion weiterer Phenolhydroxylasen stützt diese Vermutung. Die Hemmung der Phenoloxidation führt in den Zellen zu einem Mangel an Kohlenstoff und Energie und so zur Induktion von Proteinen der stationären-Phase-Antwort.

Da letztendlich nicht alle der verändert exprimierten Spots identifiziert werden konnten (76% identifiziert), ist es möglich, dass neben den bisher diskutierten Mechanismen auch weitere existieren, die für die Adaptation an hohe Phenolkonzentrationen in *C. necator* JMP 134 verantwortlich sind. Eine Limitation der 2D-Gelelektrophorese ist, dass z. B. sehr saure und basische Proteine nicht detektiert werden können, oder Proteine, die nur in geringen Konzentrationen vorkommen, nicht erfasst werden. Des Weiteren wurden mit den verwendeten Gradientengelen nur Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 120 kDa erfasst. Trotz dieser Limitationen bietet kaum eine andere Methode die Möglichkeit, eine große Anzahl von Proteinen auf einmal qualitativ und quantitativ zu untersuchen.

4.2 Adaptionsmechanismen auf Subpopulationsebene

Obwohl Zellen innerhalb einer Population genetisch identisch sind, können sie sich hinsichtlich ihrer Physiologie und ihrer metabolischen Fähigkeiten voneinander unterscheiden. Die Heterogenität einer Population hat Auswirkungen auf ihre Leistungen [Hewitt et al. 1998, Powell et al. 2000, Schuster et al. 2000, Sumner und Avery 2002] und ihre Widerstandsfähigkeit [Baptista et al. 1999, Suller und Lloyd 1999, Turner et al. 2000].

Stresssituationen ziehen Veränderungen des physiologischen Zustandes und der reproduktiven Aktivität der Zellen nach sich [Krayl et al. 2003, Benndorf et al. 2006]. Da diese durch Untersuchungen der Gesamtpopulation mit dem Messen von

Parametern wie optische Dichte oder Atmungsaktivität erfasst werden, erlauben sie keinen Einblick in individuelle Reaktionen. Die flowzytometrische Analyse hat sich als eine geeignete Methode zur Untersuchung der Dynamik von Zellen in einer Population und zur Charakterisierung ihres physiologischen Zustandes erwiesen [Srienc et al. 1984, Skarstad et al. 1986, Lundgren et al. 2004]. Sie wurde aus diesem Grund in dieser Arbeit genutzt um Adaptationsmechanismen und Überlebensstrategien von *C. necator* JMP134 beim Wachstum auf Phenol auch auf Subpopulationsebene zu untersuchen.

Dies erfolgte mit Hilfe der Kombination von Flowzytometrie, Zellsortierung und Proteomanalyse. *C. necator* JMP134 wurde dazu bei unterschiedlichen Phenolkonzentrationen und Versuchsregimen kultiviert, und der physiologische Status der Zellen durch Bestimmung der Proliferationsaktivität, sowie der Fähigkeit zur PHB-Synthese verfolgt. Eine vertiefende Analyse der detektierten Subpopulationen erfolgte anschließend auf Proteinebene.

4.2.1 DNA-Sicherungsmodus und PHB-Synthese bei nicht toxischen Phenolkonzentrationen

Mit der Analyse der Proliferationsmuster können Informationen über die Aktivität und Vitalität von Zellen gewonnen werden. Sie reflektieren die Replikationsfähigkeit einer Population auf einem bestimmten Substrat oder unter bestimmten Umweltbedingungen, und sind substrat- und stammspezifisch. So haben z.B. die Mehrzahl (80 %) der Zellen von *Ochrobacter antropi* K2-14 ein Chromosomäquivalent, wenn sie auf Glukose, 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure oder Dichlchlorphenol wachsen [Müller et al. 2002], während auf Acetat kultivierte Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* eins, zwei oder drei Chromosomenäquivalente enthalten können, beim Wachstum auf Phenol weisen sie jedoch nur ein oder zwei Chromosomenäquivalente auf [Müller et al. 2000]. Des Weiteren geben die Histogramme Informationen, wie ein Organismus unter limitierenden Wachstum-sbedingungen seinen Zellzyklus beendet, d.h. wie der DNA-Sicherungsmodus ist. Während manche Spezies nur die Replikation beenden, wie z.B. *Methylobacterium rhodesianum* oder *Rhodococcus erythropolis* [Ackermann et al. 1995, Müller et al. 2000a], versuchen andere auch noch die Zellteilung durchzuführen, wie z.B. *Ochrobacter antropi* K2-14 [Müller et al. 2000a], und mobilisieren notfalls dazu alle nötigen Reserven, wie z.B. eingelagerte Speicherstoffe.

Typisch für *C. necator* JMP134 ist das Auftreten von zwei DNA-Subpopulationen (C_2 und C_4) während des Wachstums. Dies wurde sowohl während der *Batch*- und Chemostat-Kultivierung auf Phenol (Anhang 1, 2), als auch während der *Batch*-Kultivierung auf nicht toxischen Substraten wie Acetat, Succinat, Pyruvat oder Fruktose

beobachtet (nicht gezeigt). Dabei steht ein hoher Anteil an C₄-Zellen für eine hohe Proliferationsaktivität und somit sehr aktive Zellen. Unter limitierten Bedingungen, wie den Übergang von der aktiven in die stationäre Wachstumsphase, beendete *C. necator* JMP134 sowohl Replikation als auch Zellteilung, so dass 90 % der Zellen in der C₂-Subpopulation, der B-Phase des Zellzykluses vorliegen (Anhang 1). Dazu wird das, während der exponentiellen Wachstumsphase synthetisierte PHB mobilisiert und als Energie- und Kohlenstoffquelle verwendet (Abb. 13, S. 63). Ackermann et al. [1995] beobachteten beim Wachstum von *Methylobacterium rhodesianum* auf Methanol ein anderes Verhalten. Hier erfolgte unter wachstumslimitierenden Bedingungen eine Verdoppelung des DNA-Gehaltes mit nachfolgender Speicherung von PHB.

Die Analyse der Histogramme geben außerdem Auskunft, ob ein Mikroorganismus eine vom Zellzyklus entkoppelte DNA-Synthese betreibt, oder die am häufigsten beobachtete *eukaryotic like* DNA-Synthese. Erstere ist ein Indiz für optimale Wachstumsbedingungen, da sie vorwiegend bei unlimitiertem Wachstum auf Substraten wie Glukose oder Pyruvat plus Hefe beobachtet wurde [Helmstetter 1967, Cooper und Helmstetter 1968, Müller et al. 2003]. Bei der vom Zellzyklus entkoppelten DNA-Synthese erfolgt die Zellteilung der Bakterien parallel zur Replikation. Da die Tochternukleotide während der bereits erfolgten Synthese der nächsten Generation separiert werden, können sich die Zellen in kürzeren Zeiträumen teilen, als Zeit für die Replikation benötigt wird. Ohne diese Möglichkeit der Entkopplung der DNA-Synthese vom Zellzyklus, ließen sich die Generationszeiten bei *E. coli* von 20 min, bei einer DNA-Synthesezeit von 60 min, nicht erreichen.

Die DNA-Synthese nach dem *eukaryotic like* Prinzip erfolgt in den in 1.2.2 (S.9) beschriebenen vier Phasen (B-, C-, preD- und D-Phase), wobei die Dauer der Replikation (C-Phase) und der Zellteilung (D-Phase) konstante Größen sind, während die B- und preD-Phase variabel in ihrer Länge sein können [Cooper 1991]. Bei *Acinetobacter calcoaceticus* wurde sogar eine Kombination von entkoppelter und *eukaryotic like* DNA-Synthese während der kontinuierlichen Kultivierung auf Phenol beobachtet. Bei kleinen Wachstumsraten erfolgt der Zellzyklus nach dem *eukaryotic like* Prinzip, während bei höheren Durchflussraten eine Entkopplung von DNA-Synthese und Zellteilung beobachtet wurde [Müller et al. 2000].

Bei *C. necator* JMP 134 wurde dagegen bei keinem der untersuchten Substrate und Wachstumsbedingungen eine entkoppelte DNA-Synthese beobachtet, obwohl wie von Müller et al. [1999] beschrieben, dieses Bakterium unter bestimmten Bedingungen dazu befähigt ist.

Die Untersuchungen im Bezug auf die Fähigkeit der individuellen Zelle PHB zu synthetisieren zeigte, dass Zellen beider Subpopulationen PHB speichern, sie

unterscheiden sich in ihrem durchschnittlichen PHB-Gehalt nicht mehr als 10 % voneinander (Abb. 14 und 16, S. 64 und 66). Innerhalb der C₂- und C₄-Subpopulation gibt es jedoch Zellen mit viel und wenig PHB (Anhang 1 und 2 Reihe D).

Die Frage, ob die PHB-Synthese gekoppelt an den Zellzyklus erfolgt, wie es z. B. für *Methylobacterium rhodesianum* unter Phosphatlimitation beschrieben wurde [Ackermann et al. 1995], kann mit den gewonnenen Daten nicht beantwortet werden. Wäre in *C. necator* JMP134 die Synthese von PHB zellzyklusabhängig und würde sie während der C-, preD-, oder D-Phase stattfinden, wäre in den Zellen der C₄-Subpopulation mehr PHB als in den Zellen der C₂-Subpopulation detektiert worden, da während der Zellteilung neben den Chromosomen auch die Zellinhaltsstoffe an die Tochterzellen aufgeteilt werden. Somit müssten in den C₂-Zellen maximal 50 % des PHB-Gehaltes der C₄-Zellen detektiert worden sein, was aber nicht der Fall war. Fände die PHB-Synthese allerdings in der B-Phase des Zellzykluses, in dem sich die Zellen auf die Replikation vorbereiten, statt, wäre der PHB-Gehalt in beiden Subpopulationen gleich. Da ungefähr gleiche PHB-Gehalte in beiden Subpopulationen detektiert wurden, bedeutet das, dass a) die PHB-Synthese entweder in der B-Phase Zellzyklus reguliert stattfindet oder b) ganz und gar unabhängig vom Zellzyklus erfolgt, da sich Phasen von Synthese (B-Phase und preD-Phase) und Abbau (C-Phase) abwechseln könnten.

4.2.2 DNA-Sicherungsmodus und PHB-Synthese bei toxischen Phenolkonzentrationen

Dass sich der DNA-Sicherungsmodus und die Fähigkeit zur PHB-Synthese von *C. necator* JMP134 mit zunehmendem Stress, hier ausgelöst durch die zunehmende Phenolrestkonzentration, (c_R) ändern (Abb. 33), zeigen die Ergebnisse der pH-Auxostatexperimente.

So wurde bei einer Phenolrestkonzentration c_R ≤ 1,7 mM eine dritte Subpopulation, C₁ genannt, detektiert. Zellen dieser Population waren durch einen geringeren DNA-Gehalt gekennzeichnet. Die mikroskopische Untersuchung deutet darauf hin, dass diese Subpopulation nicht durch Zellteilung entstand, da weder Septumbildung noch eine Auftrennung der Chromosomen in den C₂-Zellen beobachtet werden konnte. Sie ist vermutlich das Ergebnis eines Abbaues von DNA in Zellen der C₂-Subpopulation. Zusätzlich wurde eine Aufspaltung der Gesamtpopulation in zwei PHB-Subpopulationen detektiert, bei denen Zellen der einen Subpopulation PHB synthetisierten, während in Zellen der anderen Subpopulation kein PHB detektiert werden konnte (Anhang 3, Reihe E). Zur letzteren gehörten ausschließlich Zellen der C₁-Subpopulation.

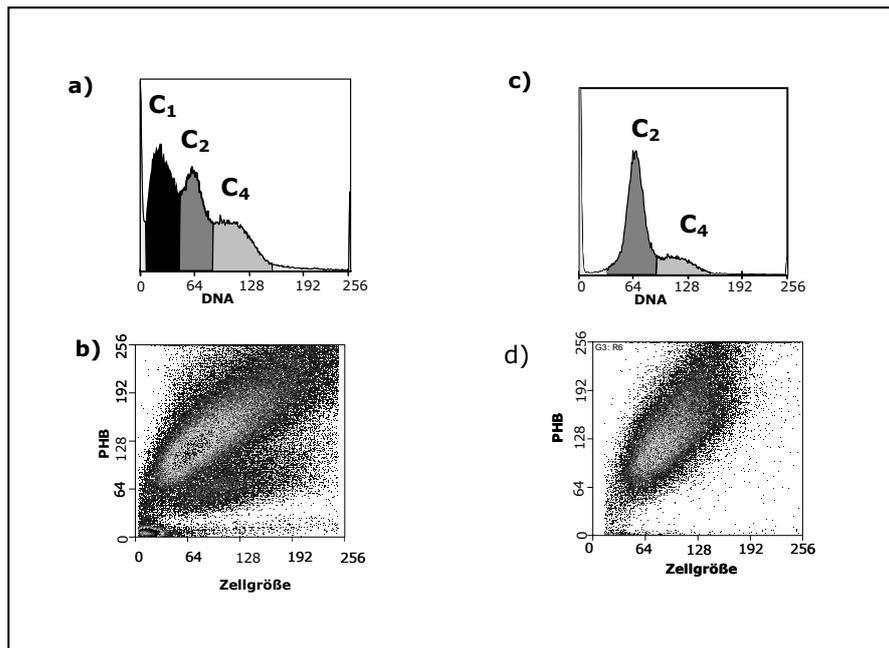


Abb. 33: Einfluss hoher Phenolrestkonzentrationen auf die DNA- und PHB-Synthese in *C. necator* JMP134 Zellen. a) DNA- und b) PHB-Verteilung bei Phenolstress. c) DNA- und d) PHB Verteilung bei ungestressten Zellen.

Da diese Subpopulation unter keinen der vorher untersuchten Bedingungen detektiert wurde, und sich die Proliferationsaktivität (definiert als Anteil der C_4 -Zellen) der Population nicht veränderte, wird vermutet, dass es sich hier um aus dem Zellzyklus ausgestiegene Zellen handelt, die geschädigt oder tot sind und deshalb nicht mehr proliferieren. Es könnte sich auch um dormante oder *viable but not culturable* (VBNC) Zellen handeln.

Dormante Zellen sind definiert als metabolisch nicht bzw. gering aktive, aber kultivierbare Zellen. Bis vor wenigen Jahren wurde *dormancy* hauptsächlich im Zusammenhang mit morphologisch spezialisierten Formen wie Sporen und Cysten, Strukturen die nur von einigen Bakterienspezies gebildet werden können, in Zusammenhang gebracht. Seit einiger Zeit gibt es jedoch vermehrt Diskussionen zur Existenz von dormanten Stadien vegetativer, nicht sporulierender Zellen [Kaprelyants et al. 1993]. *Dormancy* bei nicht sporulierenden Zellen tritt unter Nährstoffmangelsituationen auf [Kaprelyants et al. 1993] und führt zu Veränderungen in der Zellmorphologie, zu einer Zunahme der Oberflächenhydrophobizität und einer Abnahme des Lipid- und RNA-Gehaltes. Auch Änderungen in der Fettsäurezusammensetzung,

sowie der Abbau von Proteinen und Reservestoffen, wie PHB, wurden beobachtet [Kjelleberg et al. 1987, Morita 1990, Lappin-Scott und Costerton 1990, Siegele und Kolter 1992].

Genau wie dormante Zellen befinden sich VBNC (*viable but non culturable*) Zellen in einem Stadium, das ein Überleben unter ungünstigen Bedingungen sichern soll. Während dormante Zellen jedoch metabolisch nicht oder nur gering aktiv, aber kultivierbar sind, versteht man unter VBNC Zellen genau das Gegenteil. Als VBNC Zellen werden jene bezeichnet, die nach längeren Hungerphasen oder anderen Stresssituationen (z.B. Kälte [Besnard et al. 2002], Kupferstress [Grey et al. 2001]) in ein Stadium eintreten, in dem sie durch gängige Kultivierungsmethoden nicht mehr detektiert werden können [Borgosian und Bourneuf 2001]. Die Frage, ob diese Zellen wirklich lebendig oder tot sind, wird kontrovers diskutiert. Die meisten Nachweise, dass es sich um lebende Zelle handelt, basieren auf Methoden, die die Lebensfähigkeit auf indirektem Weg untersuchen. Sie liefern hierbei keinen direkten Nachweis auf die Fähigkeit der Zellen zu wachsen und zu proliferieren. Diese Methoden beinhalten u.a. Nukleinsäurefärbungen, die Verwendung von Redoxindikatoren oder Membranpotentialsonden [Übersicht in Kell et al. 1998]. Allerdings konnte für einige dieser Methoden nachgewiesen werden, dass diese sowohl tote als auch lebende Zellen markieren [Josephson et al. 1993, Ericsson et al. 2000, Villarino et al. 2000]. Es gibt viele Berichte die zu bestätigen scheinen, dass es sich bei VNBC Zellen um lebendige Zellen handelt [Oliver 1993, Barer und Harwood 1999, Oliver 2000], die über einen langen Zeitraum aktiv bleiben und unter bestimmten Umständen auch „wiederbelebt“ werden können.

Der, bei C_1 -Zellen von *C. necator* JMP134, detektierte Abbau von PHB und Nukleinsäuren, als auch die beobachtete Verringerung der Zelloberfläche legen nahe, dass es sich bei Zellen der C_1 -Subpopulation um dormante Zellen handelt. Allerdings lag im pH-Auxostat keine Substratlimitation vor, sondern im Gegenteil, ein Überschuss an Phenol vor. Leonard und Lindley [1999] beschrieben bei *Ralstonia eutropha* 335 und Benndorf et al. [2004] zeigte an *Acinetobacter calcoaceticus*, dass hohe Phenolkonzentrationen zu einer zunehmenden Inhibition der Phenoloxidation zu Catechol durch die Phenolhydroxylase führen. Diese Sensitivität der Zellen bzw. der Phenolhydroxylase gegenüber hohen Phenolkonzentrationen führt wiederum zur einer Nährstoffmangelsituation, die die Bildung dormanter Zellen nach sich zieht. Ein Verhalten, wie es die Zellen von *C. necator* JMP134 zeigen.

Die *Batch*-Rekultivierung von Zellen, die im pH-Auxostat kultiviert worden waren, gab einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei Zellen der C_1 -Subpopulation um dormante Zellen handelte, da diese nach einer langen Adaptionsphase in der Lage

waren zu proliferieren, und damit in ein aktives Stadium zurückzukehren (Abb. 22 und 23, S.72).

4.2.3 molekulare Charakterisierung der Subpopulationen

Um detaillierte Informationen über die detektierten Subpopulationen zu erhalten, wurden diese anhand ihres DNA-Gehaltes sortiert und die Proteinmuster erstellt. Ausgewählt wurde dazu eine Probe aus dem pH-Auxostat, da so außer Informationen über den Status der C₁-Subpopulation auch Zellzyklus abhängige Mechanismen analysiert werden konnten. Untersuchungen zum Zellzyklus konnten bisher nur an synchronisierten Populationen erfolgen [Spellmann et al. 1998, Quon et al. 1998, Grünenfelder et al. 2001], wobei die Notwendigkeit der Synchronisierung die Analyse z.B. gestresster Zellen ausschließt. Zudem können Kulturen nicht zu 100 % synchronisiert werden, während die Sortierung der Zellen mit Hilfe der Flowzytometrie mit einer Genauigkeit von 99 % erfolgt. Die Analyse der Funktionen der identifizierten Proteine zeigt, dass diese in Translation (Elongationsfaktor Tu, ribosomale Protein S1, Triggerfaktor), Metabolismus (Methionin-Synthase, Phenolhydroxylase, Alkohol-Dehydrogenase, Ketolsäure-Reduktoisomerase, Chlorocatechol-1,2-Dioxygenase) und Transport (Aminosäure-Transporter-Komponenten) involviert sind und abhängig vom Zellzyklus-Stadium reguliert werden. Zu den identifizierten Proteinen gehörten keine der bekannten Zellzyklusproteine, wie DnaA, dem Initiator Protein der Replikation, oder FtsZ, dem Tubulin ähnlichen Protein, das bei der Zellteilung an der Bildung des Septums (Z-Ring) beteiligt ist [Bernander et al. 1995, Boye et al. 1996, Atlung und Hansen 1999, Blaauwen et al. 1999]. Dies lag zum einen an der bisher noch geringen Sensitivität der Methode. Einige der Zellzyklusproteine sind nur in einer kleinen Anzahl pro Zelle vorhanden oder nur für sehr kurze Zeit stabil. Ein weiterer Grund für die fehlende Detektion von z.B. DnaA war, dass dieses membrangebunden in der Zelle vorliegt [Newman und Crooke 2000], die angewandten Methoden der Proteinanalyse jedoch für den Aufschluss und die Trennung cytosolischer Proteine optimiert war.

Bei einem Vergleich der Proteinmuster der nach dem *eukaryotic like* Mechanismus proliferierenden C₂-und C₄-Zellen wurde festgestellt, dass die meisten der identifizierten metabolischen Proteine herunterreguliert (Abb. 28, S.83 und Tab. 22, S.84) waren. Die höhere katabolische und anabolische Kapazität von C₂-Zellen korreliert mit der Position der C₂-Zellen im Zellzyklus. Diese befinden sich in der B-Phase, und müssen erst wachsen, um die kritische Zellmasse zu erreichen, die wie in 1.1.2 beschrieben, für den Start der Replikation notwendig ist. Die verstärkte Induktion einer Vielzahl von Proteinen mit metabolischer Funktion wurde u.a. auch bei

Caulobacter crescentus und *Saccharomyces cerevisia* gefunden [Grünenfelder et al. 2001, Spellmann et al. 1998].

Der Vergleich der Proteinmuster der aus dem Zellzyklus ausgestiegenen C₁-Subpopulation und der C₂-Subpopulation zeigt, dass die detektierten metabolischen Proteine in der C₁-Subpopulation, in ihrer Expression herunterreguliert wurden. Daneben wurden sowohl das ribosmale Protein S1, als auch der Elongationsfaktor Tu, beide in die Translation involviert, verstärkt in Zellen der C₁-Subpopulation exprimiert. Das erscheint widersprüchlich, da die verstärkte Expression Energie und Kohlenstoff erfordert. Davon ausgehend, dass es sich bei den C₁-Zellen um dormante Zellen handelt, ist es wahrscheinlicher, dass diese auch metabolisch weniger aktiv sind, was mit der detektierten Repression metabolischer Enzymen korreliert.

Eine Antwort, für die verstärkt exprimierten Proteine der Translation, kann in ihrer Funktion in den Zellen gefunden werden. Elongationsfaktor Tu agiert als Chaperon und unterstützt die Faltung nascenter oder teilweise denaturierter Proteine [Caldas et al. 1998], deren Anzahl bei der auftretenden Phenolkonzentration erhöht sein dürfte, was zu einer verstärkten Expression führt. Mit der verstärkten Expression des ribosmalen Proteins S1 könnten die Zellen versuchen ihre Proteinsynthese-Maschinerie erneut zu aktivieren. Dadurch können sie, bei verbesserten Wachstumsbedingungen, umgehend mit der Zellsynthese und der Replikation starten. Unterstützung findet die Hypothese in der Arbeit von Keiler und Shapiro [2003]. Die Autoren beschreiben, dass der Elongationsfaktor Tu und das ribosmale Protein S1 mit tmRNA kooperieren, um blockierte Ribosomen zu aktivieren, und so die Proteinsynthese vor der Replikation zu initiieren. Um die Replikation zu initiieren muss jedoch erst eine bestimmte Konzentration an DnaA, dem Replikationsinitiator, synthetisiert werden [Messer 2002, Bernander et al. 1995], wofür die Ribosomen und Translationfaktoren benötigt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse geben einen kleinen Einblick in die Populationsdynamik von Mikroorganismen und die Vielfältigkeit der Adaptionsmechanismen, die nicht nur auf Populationsebene, sondern auch auf Individuen/ Subpopulationsebene sichtbar gemacht werden konnten.

Mit sensitiveren Detektionsmethoden in der Proteinanalyse, z.B. durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen und einer verbesserten Rückgewinnung der mit *Sheath Fluid* hochverdünnten Zellen, dürfte die Zeit der Zellsortierung, und die damit einhergehenden Zellveränderungen verringert bzw. umgangen werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das physiologische Verhalten des schadstoffabbauenden Bakteriums *Cupriavidus necator* JMP134 bei dessen Konfrontation mit dem toxischen Modellsubstrat Phenol untersucht. Es wurden Strategien und Mechanismen, die der Stressbewältigung und Adaptation an zunehmende Phenolkonzentrationen dienen, auf Populations- und individueller Ebene identifiziert. Dazu wurde eine Methode etabliert, mit der Zellen anhand ihrer physiologischen Eigenschaften separiert und deren metabolische Fähigkeiten mit Hilfe der Proteomanalyse näher charakterisiert werden konnten.

Metabolische und molekulare Untersuchungen der Gesamtpopulation zeigten, dass der produktive Abbau, als aktiver Mechanismus, eine wichtige Funktion bei der Adaptation an zunehmende Phenolkonzentrationen einnimmt. Das Phenol, welches dem Bakterium als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle dient, wird hierbei in Abhängigkeit des Abbauweges zum einen in Biomasse und zum anderen in Polyhydroxybutyrat (PHB) metabolisiert. Im *ortho*-Weg wird, auf Grund eines metabolischen Flaschenhalses, Phenol sowohl für die Synthese von PHB, als auch für Wachstum und Vermehrung genutzt. Somit führt die Synthese von PHB während dieser Wachstumsphase ebenfalls zur Erhöhung der Überlebensfähigkeit, da mit dieser die Konzentration des für die Zellen toxischen Substrats verringert wird. Mit der Induktion des *meta*-Weges wird Phenol zunehmend nur für Wachstum und Vermehrung genutzt.

Die Untersuchungen auf molekularer Ebene haben gezeigt, dass neben der Induktion des *meta*-Weges zusätzliche Monooxygenasen, die an der Oxidation des Phenols beteiligt sind, exprimiert werden. Die Gründe dafür werden zum einen in einer konzentrationsabhängigen Hemmung der bereits aktiven Phenolhydroxylasen, und zum anderen in einer unspezifischen, durch die hohe Substratkonzentration ausgelösten Induktion vermutet.

Die verstärkte Expression periplasmatischer Proteine mit Chaperon- und Proteasefunktion, wie DegQ und SurA, weisen darauf hin, dass die Membranen der Zelle primäres *Target* des lipophilen Phenols sind, und dass in *C. necator* JMP134 neben aktiven auch passive Mechanismen induziert werden, um die Wirkung toxischer Verbindungen einzuschränken.

Mit Hilfe flowzytometrischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zellen innerhalb einer Population unterschiedlich auf zunehmende Phenolkonzentrationen reagieren. So wurde bei einer Substratrestkonzentration $c_R \geq 1,7$ mM eine neue DNA-Subpopulation (C_1) detektiert. Die Zellen in dieser Subpopulation waren gekennzeichnet durch einen geringeren DNA- und PHB-Gehalt. Sie sind wahrscheinlich das Ergebnis eines Abbaus von DNA und nicht einer Zellteilung.

Eine molekulare Analyse dieser Zellen unterstützt die durch Rekultivierungsversuche gewonnene Annahme, dass es sich bei diesen um dormante Zellen handelt, welche mit Abnahme der Phenolrestkonzentration in der Lage sind, in einen aktiven Zustand zurückzukehren. Im Proteinmuster von Zellen der C_1 -Subpopulation konnte neben reprimierten Enzymen des Metabolismus und Transportes auch die verstärkte Expression von Proteinen der Translation (RspA, TufA) detektiert werden. Diese weisen darauf hin, dass die Zellen versuchen ihre Proteinsynthese-Maschinerie erneut zu aktivieren. Dadurch können sie bei verbesserten Wachstumsbedingungen umgehend mit der Zellsynthese und der Replikation, und damit der Sicherung der genetischen Informationen, starten. Sie erfüllen dadurch die Voraussetzung, dass eine individuelle Mindestbiomasse notwendig ist, bevor eine Induktion der Replikation der DNA erfolgen kann. Die dafür benötigte Energie und erforderlichen Zellbausteine werden durch den Abbau von PHB und der DNA bereitgestellt.

Durch die erstmalige Kombination von Flowzytometrie, Zellsortierung und Proteomanalyse von Subpopulationen mit verschiedener Eigenschaften wurde eine Methode für die Mikrobiologie erschlossen, mit der sich, unabhängig von der Kultivierbarkeit, die Funktion von Zellen innerhalb einer Population oder Gemeinschaft näher untersuchen lässt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse gewähren einen Einblick in die Adaptationsmechanismen von Individuen innerhalb einer Population bei der Konfrontation mit dem Schadstoff Phenol. Während ein Teil der Population Wachstum und Vermehrung aufrechterhält, nimmt ein anderer Teil der Population einen dormanten Zustand ein und sichert so Leben und Überleben der Gesamtpopulation für den Fall einer weiteren Zunahme der Stresssituation. Die Kenntnis solcher Überlebensstrategien und die Möglichkeit, bestimmte metabolische Leistungen mit definierten Zellzuständen in Verbindung zu bringen, weisen den Weg für die Entwicklung subtiler Lösungsansätze, um Leistungsgrenzen von Mikroorganismen rechtzeitig zu erkennen bzw. Zellstatus-bedingte Leistungsspitzen gezielt zu nutzen.

Literaturverzeichnis

- Ackermann, J.-U., Müller, S., Lösche, A., Bley, T., Babel, W., 1995. *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *J. Biotechnol.*, 39, 9-20.
- Ackermann, J.-U., Babel, W., 1997. Growth-associated synthesis of poly-(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of internal bottleneck. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 144-147.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G., 1996. An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6059-6063.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalcanoates. *Microbiol. Rev.*, 54, 450-472.
- Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Mach, H., Völker, U., Hecker, M., 1997. First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis*, 18, 1451-1463.
- Anraku, Y., Gennis, R. B., 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.*, 12, 262-266.
- Arneborg, N., Jespersen, L., Jakobsen, M., 2000. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH response to acetic acids. *Arch Microbiol.*, 174, 125-128.
- Atlung, T., Hansen, F. G., 1999. Low-temperature-induced DnaA protein synthesis does not change initiation mass in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 181, 5557-5562.
- Arai, H., Ohishi, T., Chang, M. Y., Kudo, T., 2000. Arrangement and regulation of the genes for *meta*-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiol.*, 146, 1701-1715.
- Ayoubi, P. J., Harker, A. R., 1998. Whole-Cell Kinetics of Trichloroethylene Degradation by Phenol Hydroxylase in a *Ralstonia eutropha* JMP134 Derivative. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4353-4356.
- Babel, W., Ackermann, J.-U., Breuer, U., 2001. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 71, 125-158.
- Bagg, A., Neilands, J. B., 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochem.*, 26, 5471-5477.
- Baptista, M., Rodriguez, P., Depardieu, F., Courvalin, P., Arthur, M., 1999. Single cell analysis of glycopeptide resistance gene expression in teicoplanin-resistant mutants of a VanB-type *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.*, 32, 17-28.

- Barer, M. R., Harwood, C. R., 1999. Bacterial viability and culturability. *Adv. Microb., Physiol.*, 41, 93-137.
- Bayly, R. C., Wigmore, G. J., 1973. Metabolism of phenol and cresol by mutants of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 113, 1112-1120.
- Benndorf, D., 2000. Molekulare Mechanismen der Resistenz von Bakterien gegenüber Xenobiotika. Dissertation. ISSN 0948-9452.
- Benndorf, D., Loffhagen, N., Babel, W., 2001. Protein synthesis pattern in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress. *FEMS Microbiol. Letter*, 200, 247-252.
- Benndorf, D., Loffhagen, N., Härtig, C., Babel, W., 2004. Growth on Phenol at Chemostress Levels Amplifies the Expression of Phenol Degradation Pathway in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Eng. Life Sci.*, 4, 38-42
- Benndorf, D., Thiersch, M., Loffhagen, N., Kunath, S., Harms, H., 2006. *Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites. *Proteomics*, 6, 3319-3329.
- Bernander, R., Åkerlund, T., Nordström, K., 1995. Inhibition and restart of initiation of chromosome replication: effect on exponentially growing *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.*, 177, 1670-1682.
- Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F., Cappellet, J.-M., 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.*, 33, 359-370.
- Blaauwen, T. D., Buddelmeijer, N., Aarsman, M. E. G., Hameete, C. A., Nanninga, N., 1999. Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181, 5167-5175.
- Blokpoel, M. C. J., Smeulders, M. J., Hubbard, J. A. M., Keer, J., Williams, H.D., J., 2005. Global Analysis of Proteins Synthesized by *Mycobacterium smegmatis* Provides Direct Evidence for Physiological Heterogeneity in Stationary-Phase Cultures. *J. Bacteriol.*, 187, 6691-6700.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J., 1987. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- Borgosian, G., Bourneuf, E. V., 2001. A matter of bacterial life and death. *EMBO reports*, 2, 770-774.
- Bormann, E. J., Leißner, M., Beer, B., 1998. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 84-88.

- Boye, E., Stokke, T., Kleckner, N., Skarstad, K., 1996. Coordinating DNA replication initiation with cells growth: differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12206-12211.
- Braunegg, G., Bogensberger, B., 1985. Zur Kinetik des Wachstums und der Speicherung von Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure bei *Alcaligenes latus*. *Acta Biotechnol.*, 5, 339-345.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. F., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.*, 65, 127-161.
- Bridson, E. Y., Gould, G. W., 2000. Quantal microbiology. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 95-98.
- Burt, E. T., O'Connor, C., Larsen, B., 1999. Isolation and identification of a 92-kDa stress induced protein from *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 147, 13-20.
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casberra, A., Pucci, P., Di Donato, A., 2004. Phenol Hydroxylase and Toluene/o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzerie* OX1: Interplay between Two Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 221-2219.
- Caldas, T. D., Yaagoubi, A. E., Richarme, G., 1998. Chaperone Properties of Bacterial Elongation Factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.*, 273, 11478-11482.
- Che, W. M., Chang, J. S., Wu, C. H., Chang, S. C., 2004. Characterization of phenol and trichlorethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Res. Microbiol.*, 155, 672-680.
- Coburn, G. A., Mackie, G. A., 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 62, 55-108.
- Cooper, S, Helmstetter, C. E., 1968. Chromosome replication and division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.*, 31, 519-550.
- Cooper, S., 1991. Bacterial Growth and Division. Biochemistry and Regulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles. Academic Press, San Diego, Californien.
- Dahlberg, C., Bergström, M., Hermansson, M., 1998. In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2670-2675.
- Davey, M. E., O'Toole, G. A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 847-867.
- Davidson, P. M., Branen, A. L., 1981. Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *J. Food Prot.*, 44, 623-632.
- De Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., Neilands, J. B., 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bacteriol.* 169, 2624-2630.

- de Smet, M. J., Kingma, J., Witholt, B., 1978. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 506, 64-80.
- Divari, S., Valetti, F., Caposio, P., Pessione, E., Cavaletto, M., Griva, E., Gribaudo, G., Gilardi, G., Giunta, C., 2003. The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem.*, 270, 2244-2253.
- Dixon, G. H., Kornberg, H. L., 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.*, 72, 3P.
- Doi, Y., 1990. Microbial Polyesters. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Don, R. H., Weightman, A. J., Knackmuss, H.-J., Timmis, K. N., 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathway for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.*, 161, 85-90.
- Donachie, W. D., 1968. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature*, 219, 1077-1079.
- Dubrac, S., Touati, D., 2000. Fur Positive Regulation of Iron Superoxide Dismutase in *Escherichia coli*: Functional Analysis of the *sodB* Promotor. *J. Bacteriol.*, 182, 3802-3808.
- Duche, O, Tremoulet, F., Glaser, P., Labadie, J., 2002. Salt Stress Proteins Induced in *Listeria Monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1491-1498.
- Egan, E. S., Fogel, M. A., Waldor, M. K., 2005. Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.*, 56, 1129-1138.
- Ericsson, M., Hanstorp, D, Hagberg, P, Enger, J., Nystrom, T., 2000. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *J. Bacteriol.*, 182, 5551-5555.
- Errington, J., Daniel, R. A., Scheffers, D.-J., 2003. Cytokinesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 52-65.
- Eun, S. H., Kim, D. J., Kim, Y. S, 2001. *Acinetobacter calcoaceticus* Glucose-1-phosphate Thymidyltransferase: Cloning, Sequencing, and Expression in *E.coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 34, 230-236.
- Falk-Krzesinski, H. J., Wolfe, A. J., 1998. Genetic Analysis of the *nuo* Locus, Which Encodes the Proton-Translocating NADH Dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 180, 1174-1184.
- Fialova, A., Boschke, E., Bely, T., 2004. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *Int. Biodegr. Biodegr.*, 54, 69-76.

- Fischer, E., Gunther, K., Braun, V., 1989. Involvement of ExbB and TonB in Transport across the Outer Membrane of *Escherichia coli*: Phenotypic Complementation of *exb* Mutants by Overexpressed *tonB* and Physical Stabilization of TonB by ExbB. *J. Bacteriol.*, 171, 5127-5134.
- Fukumori, F., Hirayama, H., Takami, A., Inoue, A., Horikoshi, K., 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent tolerance. *Extremophiles*, 2, 395-400.
- Fukumori, F., Kishii, M., 2001. Molecular cloning and transcriptional analysis of the alkyl hydroperoxide reductase genes from *Pseudomonas putida* KT2442. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 269-277.
- Gallagher, S. C., Callaghan, A. J., Zhao, J., Dalton, H., Trehwella, J., 1999. Global conformational changes control the reactivity of methane monooxygenase. *Biochem.*, 38, 6752-6760.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., Mische, S. M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, 20, 601-605.
- Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schägger, H., Fuchs, G., 2002. Genes Coding for a New Pathway of Aerobic Benzoate Metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.*, 184, 6301-6315.
- Giuffrida, M. G., Pessione, E., Mazzoli, R., Dellavalle, G., Barello, C., Conti, A., Giunta, C., 2001. Media containing aromatic compounds induce peculiar proteins in *Acinetobacter radioresistens*, as revealed by proteome analysis. *Electrophoresis*, 22, 1705-1711.
- Gottesmann, S., Wickner, S., Jubete, Y., Singh, S. K., Kessel, M., Maurizi, M., 2001. Selective energy-dependent proteolysis in *Escherichia coli*. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. X. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1995, 533-548.
- Goverde, R. L. J., Veld, J. H. J., Kusters, J. G., Mooi, F. R., 1998. The psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* requires expression of *pnp*, the gene for polynucleotide phosphorylase, for growth at low temperature (5°C). *Mol. Microbiol.*, 28, 555-569.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R., Marahiel, M. A., 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 178, 4611-4619.
- Grey, B., Todd, B., Steck, R., 2001. Concentrations of Copper Thought To Be Toxic to *Escherichia coli* Can Induce the Viable but Nonculturable Condition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5325-5327.
- Grünenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Röder, D., Langen, H. et al., 2001. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4681-4686.

- Gurujeyalakshmi, G., Oriol, P., 1989. Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 500-502.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Jendrossek, D., 2000. Mobilization of poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.*, 182, 5916-5918.
- Harayama, S., Kok, M., Neidle, E. L., 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 565-601.
- Härtig C, Loffhagen N, Babel W., 1999. Glucose stimulates a decrease of the fatty acid saturation degree in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Microbiol.*, 171, 166-172.
- Harwood, C. S., Burchhardt, G., Herrmann, H., Fuchs, G., 1999. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 439-458.
- Heipieper, H. J., Keweloh, H., Rehm, H. J., 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1213-1217.
- Heipieper, H. J., Diefenbach, R., Keweloh, H., 1992. Conversion of cis unsaturated fatty acid to trans, a possible mechanism for the protection of phenol degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1847-1852.
- Helmstetter, C. E., 1967. Rate of DNA synthesis during the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.*, 24, 417-427.
- Hewitt, C. J., Nebe-von-Caron, G., Nienow, A. W., 1998. Use of Multi-Staining Flow Cytometry to Characterise the Physiological State of *Escherichia coli* W3110 in High Cell Density Fed-Batch Cultivation. *Biotechnol Bioeng.* 63, 705-711.
- Hondrop, E. R., Matthwes, R. G., 2004. Oxidative Stress Inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase(MetE) in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, 2, 1738-1753.
- Holtzhauer, M., Hahn, 1988. Biochemische Labormethoden: Arbeitsvorschriften und Tabellen, Springer, Berlin.
- Iuchi, S., Weiner, L., 1996. Cellular and Molecular Physiology of *Escherichia coli* in the Adaptation to Aerobic Environments. *J. Biochem*, 120, 1055-1063.
- James, B. W., Mauchline, W. S., Dennis, P. J., Keevil, C. W., Wait, R., 1999. Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 822-827.
- Johnson, B. F., Stanier, R. Y., 1971. Dissimilation of aromatic Compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, 107, 468-475.
- Josephson, K. L., Gerba, C. P., Pepper, I. L., 1993. Polymerase chain reaction of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3513-3515.

- Kabelitz N., Santos P. M., Heipieper H. J., 2003. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220, 223-227.
- Kabir, M. D., Shimizu, K., 2003. Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi* knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR. *J. Biotechnol.*, 105, 11-31.
- Kadouri, D., Jurkevitch, D., Okon, Y., 2003. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. *App. Environ. Microbiol.*, 69, 3244-3250.
- Kandror, O., Sherman, M., Rhode, M., Goldberg, A. L., 1995. Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in *Escherichia coli* and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. *EMBO J.*, 14, 6021-6027
- Kappus, H., Sies, H., 1981. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37, 1233-1258.
- Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., 1993. Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3187-3196.
- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Barer, M. R., 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 169-187.
- Keiler, K. C., Shapiro, L., J., 2003. tmRNA Is Required for Correct Timing of DNA Replication in *Caulobacter crescentus*. *Bacteriol.*, 185, 573-580.
- Keweloh, H., Weyrauch, G., Rehm, H. J., 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 66-71.
- Keyer, K., Imlay, J. A., 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13635-13640.
- Khang, L. S., Shapiro, L., 2003. Polar Localisation of Origins in Multireplicon Bacteria. *J. Bacteriol.*, 185, 3385-3391.
- Kieboom, J., Dennis, J. J., deBont, J. A. M., Zylstra, G. J., 1998. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.*, 273, 85-91.
- Kim, Y, Ayoubi, P., Harker, A. R., 1996. Constitutive Expression of the Phenol Hydroxylase Gene(s) from *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and Concomitant Trichloroethylene Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3227-3233.
- Kim, Y.B, Lenz, R.W., 2001. Polyesters from Microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 71, 51-79.

- Kim, S. I., Song, S.-Y., Kim, K.-W., Ho, E.-M., Oh, K.-H., 2003. Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. *Res. Microbiol.*, 154, 697-703.
- Kim, S. I., Kim, J. Y., Yun, S.-H., Kim, J.-H., Leem, S.-L., Lee, C., 2004. Proteome analysis of *Pseudomonas* sp. K82 biodegradation pathways. *Proteomics*, 4, 3610-3621.
- Kim, D. Y., Kim, K. K., 2005. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol.*, 38, 266-274.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B., Marshall, K. C., 1987. Initial phase of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 978-984.
- Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mårdén, M., Jones, G. W., 1998. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria with emphasis on the marine environment. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41, 25-49.
- Kim, D. Y., Kim, K. K., 2005. Structure and Function of HtrA Family Proteins, the Key Players in Protein Quality Control. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 38, 266-274.
- Kleinsteuber, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H., Müller, S., 2006. Population Dynamics within a Microbial Consortium during Growth on Diesel Fuel in Saline Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3531-3542.
- Klose, J., 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissue - novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26, 231-243.
- Kolmar; H., Waller, P. R. H., Sauer, R. T., 1996. The DegP and DegQ Periplasmic Endoproteases of *Escherichia coli*: Specificity for Cleavage Sites and Substrate Conformation. *J. Bacteriol.*, 178, 5925-5929.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., Hughes, C., 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405, 914-919.
- Krayl, M., Benndorf, D., Loffhagen, N., Babel, W., 2003. Use of proteomics and physiological characterisation to elucidate ecotoxic effects of methyl tert-butyl ether in *Pseudomonas putida* KT2440. *Proteomics*, 3, 1544-1552.
- Kornberg, H. L., 1966. Anaplerotic sequences and their role in metabolism, p. 1-31. In P. N. Campbell and D. Greville (ed.), *Essays in biochemistry*, Vol. 2, Academic Press, Inc., New York.
- Kurbatov, L., Albrecht, D., Herrmann, H., Petruschka, L., 2006. Analysis of the proteome of *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different sources of carbon and energy. *Environ. Microbiol.*, 8, 466-478.

- Kurokawa, K., Nishida, S., Emoto, A., Sekimizu, K., Katayama, T., 1999. Replication cycle-coordinated change of the adenine nucleotide-bound form of DnaA protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 18, 6642-6652.
- Lafferty, R. M., Braunegg, G., 1984a. Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Poly (D(-)-3-hydroxybuttersäure. EP149744.
- Lafferty, R. M., Braunegg, G., 1984a. Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Poly (D(-)-3-hydroxybuttersäure. EP144017
- Law, J. H., Slepecky, R. A., 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.*, 82, 33-36.
- Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W., 1990. Starvation and penetration of bacteria in soils and rocks, *Experientia*, 46, 807-812.
- Lazar, S. W., Kolter, R., 1996 SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.*, 178, 1770-1773.
- Lazar, S. W., Torma, A. M., Kolter, R., 1998. Role of the *Escherichia coli* SurA Protein in Stationary-Phase Survival. *J. Bacteriol.*, 180, 5704-5711.
- Leahy, J. G., Batchelor, P. J., Morcomb, S. M., 2003. Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 449-479.
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., Friedrich, T., 1995. Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 230, 538-548.
- Leonard, D., Lindley, N. D., 1998. Carbon and energy flux constraints in continuous cultures of *Alcaligenes eutrophus* grown on phenol. *Microbiology*, 144, 241-248.
- Leonard, D., Lindley, N. D., 1999. Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylases activity. *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 271-277.
- Leonard, D., Youssef, C. B., Destruhaut, C., Lindley, N. D., Queinnec, I., 1999. Phenol Degradation by *Ralstonia eutropha*: Colorimetric Determination of 2-Hydroxymuconate Semialdehyde Accumulation to Control Feed Strategy in Fed-Batch Fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 407-415.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersmann, C., 2004. Free and Hemeophore-Bound Heme Acquisitions through the Outer Membrane Receptor HasR Have Different Requirements for the TonB-ExbB-ExbD Complex. *J. Bacteriol.*, 186, 4067-4074.
- Li, X.-Z., Zhang, L., Poole, K., 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent resistance. *J. Bacteriol.*, 180, 2987-2991.
- Liochev, S., Fridovich, I., 1992. Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by *soxRS* regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5892-5896.

- Liu, X., Ferenci, T., 1998. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 180, 3917-3922.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lundgren, M., Andersson, A., Chen, L., Nilsson, P., Bernander, R., 2004. Three replication origins in species: Synchronous initiation of chromosome *Sulfolobus* in replication and asynchronous termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 7049-7051.
- Lushchak, V. I., 2001. Oxidative Stress and Mechanisms of Protection Against It in Bacteria. *Biochem. (Moskow)*, 66, 592-609.
- Luttinger, A., Hahn, J., Dubnau, D., 1996. Polynucleotide phosphorylase is necessary for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 19, 343-356.
- Maraha, N., Backmann, A., Jansson, J. K., 2004. Monitoring physiological status of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* SBW25 under different nutrient conditions and in soil by flow cytometry. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 51, 123-132.
- Maskow, T., Babel, W., 2001. A calorimetrically based method to convert toxic compounds into poly-3-hydroxybutyrate and to determine the efficiency and velocity of conversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 234-238.
- Meistrich, M. L., Göhde, W., White, R. A., 1978. Resolution of X and Y spermatids by pulse cytophotometry. *Nature*, 274, 821-823.
- Mejia, R., Gomez-Eichelmann, M. C., Fernandez, M. S., 1995. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim. Biophys. Acta*, 1239, 195-200.
- Messer, W., 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 355-374.
- Mothes, G., Skinfill Rivera, I., Babel, W., 1997. Competition between β -ketothiolase and citrate synthase during poly(β -hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*. *Arch Microbiol*, 166, 405-410.
- Morita, R. Y., 1990. The starvation-survival state of microorganism in nature and its relationship to bioavailable energy. *Experientia*, 46, 813-817.
- Müller-Kraft, G., Babel, W., 1986. Microbial citrate synthase. Properties and classification. *Biol. Rundsch.*, 24, 165-177.
- Müller, R. H., Babel, W., 1996. Growth-rate dependent expression of phenol-assimilation pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 - the influence of formate as an auxillary energy source on phenol conversion characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 156-162.

- Müller, S., Bley, T., Babel, W., 1999. Adaptive response of *Ralstonia eutropha* to master feast and famine conditions analysed by flow cytometry. *J. Biotechnol.*, 75, 81-97.
- Müller, S., Lösche, A., Mertingk, H., Beisker, W., Babel, W., 2000a. Flow cytometric monitoring of *Rhodococcus erythropolis* and *Ochrobactrum anthropi* in a mixed culture. *Acta Biotechnol.*, 20, 219-233.
- Müller, S., Ullrich, S., Lösche, A., Loffhagen, N., Babel, W., 2000. Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Microbiol. Meth.*, 40, 67-77.
- Müller, S., Lösche, A., Schmidt, M., Babel, W., 2001. Optimisation of high gravity and diet beer production in a German brewery by flow cytometry. *Journal of the Institute of brewing*, 107, 373-382.
- Müller, S., 2002. Multiparametric Cytometry - individuelle Zustandsbeschreibung der Dynamik mikrobieller Populationen in der Biotechnologie. Habilitationsschrift, TU Dresden.
- Müller, S., Sträuber, H., Lösche, A., Babel, W., 2002. Population analysis of a binary bacterial culture by multi-parametric flow cytometry. *J. Biotechnol.*, 97, 163-176.
- Müller, S., Babel, W., 2003. Analysis of bacterial pattern – an approach for controlling biotechnological processes. *J. Microbiol. Meth.*, 55, 851-858.
- Namba, H., Takaoka, Y., Hasegawa, J., 2003. Purification and Characterization of Formate Dehydrogenase from *Ancylobacter aquaticus* Strain KNK607M, and Cloning of the Gene. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 67, 720-728.
- Neijessel, O. M., Teixeira de Mattos, M. J., 1994. The energetic of bacterial growth: a reassessment. *Mol. Microbiol.*, 13, 179-182.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H., 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, 6, 427-448.
- Newman, G., Crooke, E., 2000. DnaA, the Initiator of *Escherichia coli* Chromosomal Replication, Is Located at the Cell Membrane. *J. Bacteriol.*, 182, 2604-2610.
- Notomista, E., Lahm, A., Di Donato, A., Tramontano, A., 2003. Evolution of Bacterial and Archaeal Multicomponent Monooxygenases. *J. Mol. Evol.*, 56, 435-445.
- Ochsner, U. A., Hassett, D. J., Vasil, M. J. L., 2001. Genetic and Physiological Characterization of *ohr*, Encoding a Protein Involved in Organic hydroperoxide Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 183, 773-778.
- Odgen, G. B., Pratt, M. J., Schaechter, M., 1988. The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membrane only when hemimethylated. *Cell*, 54, 127-135.

- O'Farrell, P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- Oh, K. H., Tuovinen, O. H., 1990. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mixed cultures of bacteria. *J. Ind. Microbiol.*, 6, 275-278.
- Oh, J.-I., Bowien, B., 1998. Structural Analysis of the *fds* Operon Encoding the NAD⁺-linked Formate Dehydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J. Biol. Chem.*, 273, 26349-26360.
- Oliver, J. D., 1993. Formation of viable but nonculturable cells. In: Startvation in bacteria, 239-272. Edited by Kjelleberg, S., New York: Plenum.
- Oliver, J. D., 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: Nonculturable Microorganisms in the environment, 277-300. Edited by Colwell, R.R., Grimes, D. J. Washington DC: ASM Press.
- Ornston, L. N., Stanier, R. Y., 1966a. The conversion of Catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*, II Enzymes of the protocatechuate pathway. *J. Biol. Chem.*, 241, 3787-3794.
- Ornston, L. N., Stanier, R. Y., 1966b. The conversion of Catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*, III Enzymes of the catechol pathway. *J. Biol. Chem.*, 241, 3795-3799.
- Page, W. J., Knosp, O., 1989. Hyperproduction of Poly- β -Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2866-2873.
- Paller, G., Hommel, R. K., Kleber, H.-P., 1995. Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *J. Bacis. Microbiol.*, 35, 4451-4454.
- Pikus, J. D., Studts, J. M., Achim, C., Kauffmann, K. E., Munck, E., Steffan, R. J., McClay, K., Fox, B. G., 1996. Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mossbauer studies of the purified diiron and rieske components of a four-protein complex. *Biochem.*, 35, 9106-9119.
- Pieper, H. D., Reineke, W., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J., 1988. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.*, 150, 95-102.
- Pieper, H. D., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J., 1989. Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.*, 151, 356-371.
- Pomposiello, P. J., Bennik, M. H., J., Demple, B., 2001. Genome-wide Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate. *J. Bacteriol.*, 183, 3890-3902.

- Powell, C. D. S., Van Zandycke, S. M., Quain, D. E., Smart, K. A., 2000. Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*, 146, 1023-1034.
- Powlowski, J., Shingler, V., 1994. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*. 5, 219-236.
- Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L., Marczyński, G. T., 1998. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 120-125.
- Rahalkar, S. B., Joshi, S. R., Shivaraman, N., 1993. Photometabolims of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris*. *Curr. Microbiol*, 26, 1-9.
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M-T., Godoy, P., Ramos-González, M. I., Rojas, A., Terán, W., Segura, A., 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 743-768.
- Rappu, P., Shin, B. S., Zalkin, H., Mäntsälä, P., 1999. A Role for a Highly Conserved Protein of Unknown Function in Regulation of *Bacillus subtilis purA* by the Purine Repressor. *J. Bacteriol.*, 181, 3810-3815.
- Rehm, H., 2002. Der Experimentator: Proteinchemie/ Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Ren, Q., Sierro, N., Witholt, B., Kessler, B., 2000. FabG, an an NADHP-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 182, 2978-2981.
- Riis, V, Mai, W., 1988. Gas chromatographic determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbiol biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr.*, 445, 285- 289.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J. L., Segura, A., 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.*, 183, 3967-3973.
- Rouvière, P. E., Gross, C. A., 1996. SurA, a periplasmatic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes. Dev.*, 10, 3170-3182.
- Ruiz, J. A., Lopez, N. I, Fernandez, R. O., Mendez, B. S., 2001. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 225-230.
- Santos, V. L., Linardi, V. R., 2001. Phenol degradation by yeasts isolated from industrial effluents. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 212-221.

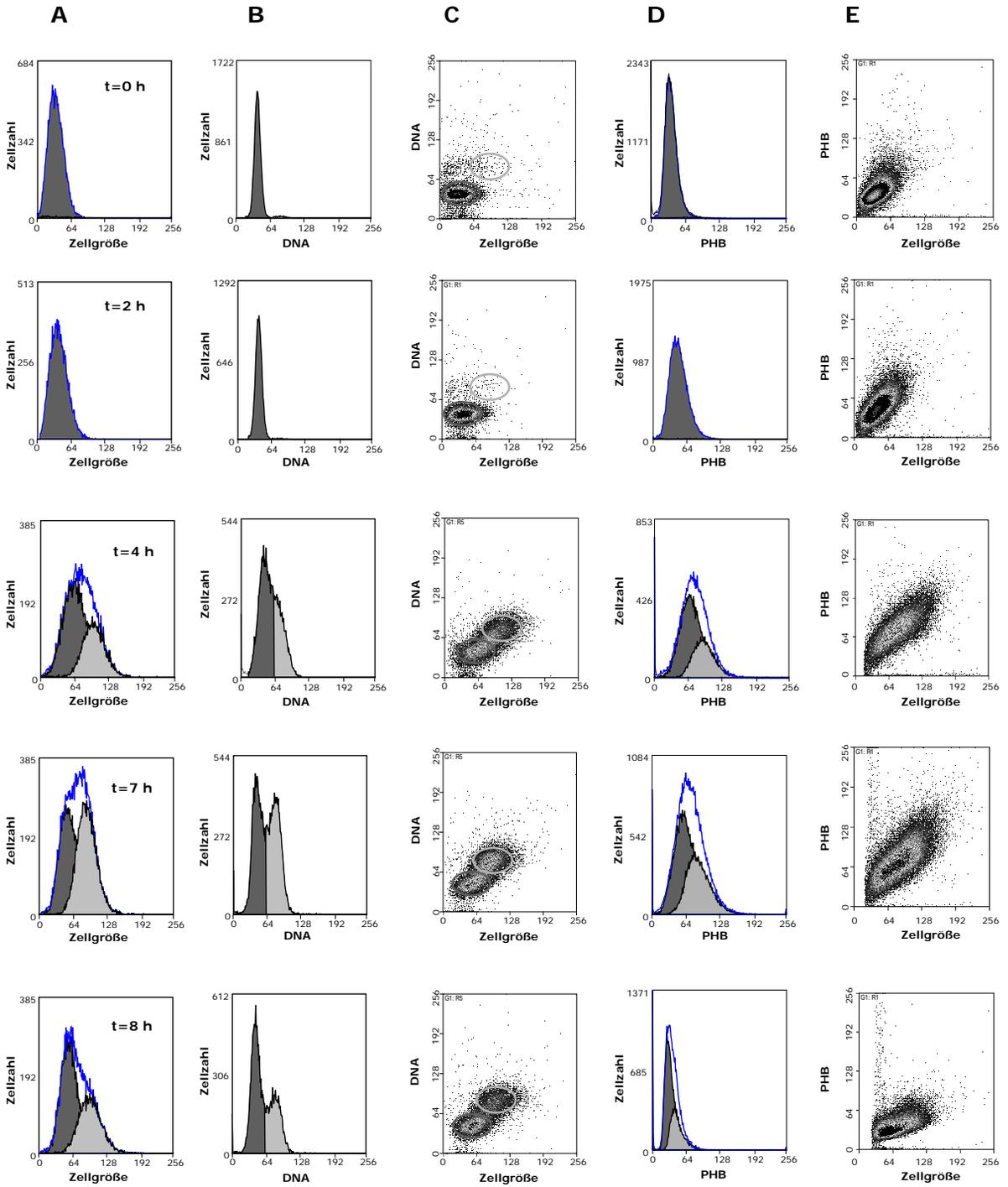
- Santos, P. M., Benndorf, D., Sá-Correia, I., 2004. Insight into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics*, 4, 1-13.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Kizhlo, Z., Stegantseva, E., 1999. Effect of phosphate supply and aeration on poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochem.*, 34, 109-113.
- Schumann, W., 1994. Funktion und Regulation der Hitzeschockproteine bei Pro-und Eukaryonten. *Bioscope*, 2, 20-24.
- Schuster, K. C., Urlaub, E., Gape, J. R., 2000. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition and on the heterogeneity in a culture. *J. Microbiol. Methods*, 42, 29-38.
- Schweder, T., Krüger, E., Xu, B., Jürgen, B., Blomsten, G., Enfors, S., Hecker, M., 1999. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocess. *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 151-159.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B., Eggen, R. I. L., 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.*, 3, 81-91.
- Senior, P. J., Dawes, E. A., 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J.*, 125, 55-66.
- Segura, A., Duque, E., Mosqueda, G., Ramos, J. L., Junker, F., 1999. Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.*, 1, 191-198.
- Segura, A., Godoy, P., van Dillewijn, P., Hurtado, A., Arroyo, N., Santacruz, S., Ramos, J. L., 2005. Proteomic Analysis Reveals the Participation of Energy- and Stress-Related Proteins in the Response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to Toluene. *J. Bacteriol.*, 187, 5937-5945.
- Semple, K. T, Cain, R. B., 1996. Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1265-1273.
- Shapiro, H., 2000. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *J. Microbiol. Methods*, 42, 3-16.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Neubauer, G., Shevchenko, A., Mortensen, P., Mann, M., 1996. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 893-896.
- Siegele, D.A., Kolter, R., 1992. Life after log. *J. Bacteriol.*, 174, 345-348.
- Sikkema, J., deBont, J. A. M., Poolman, B., 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59, 201-222.

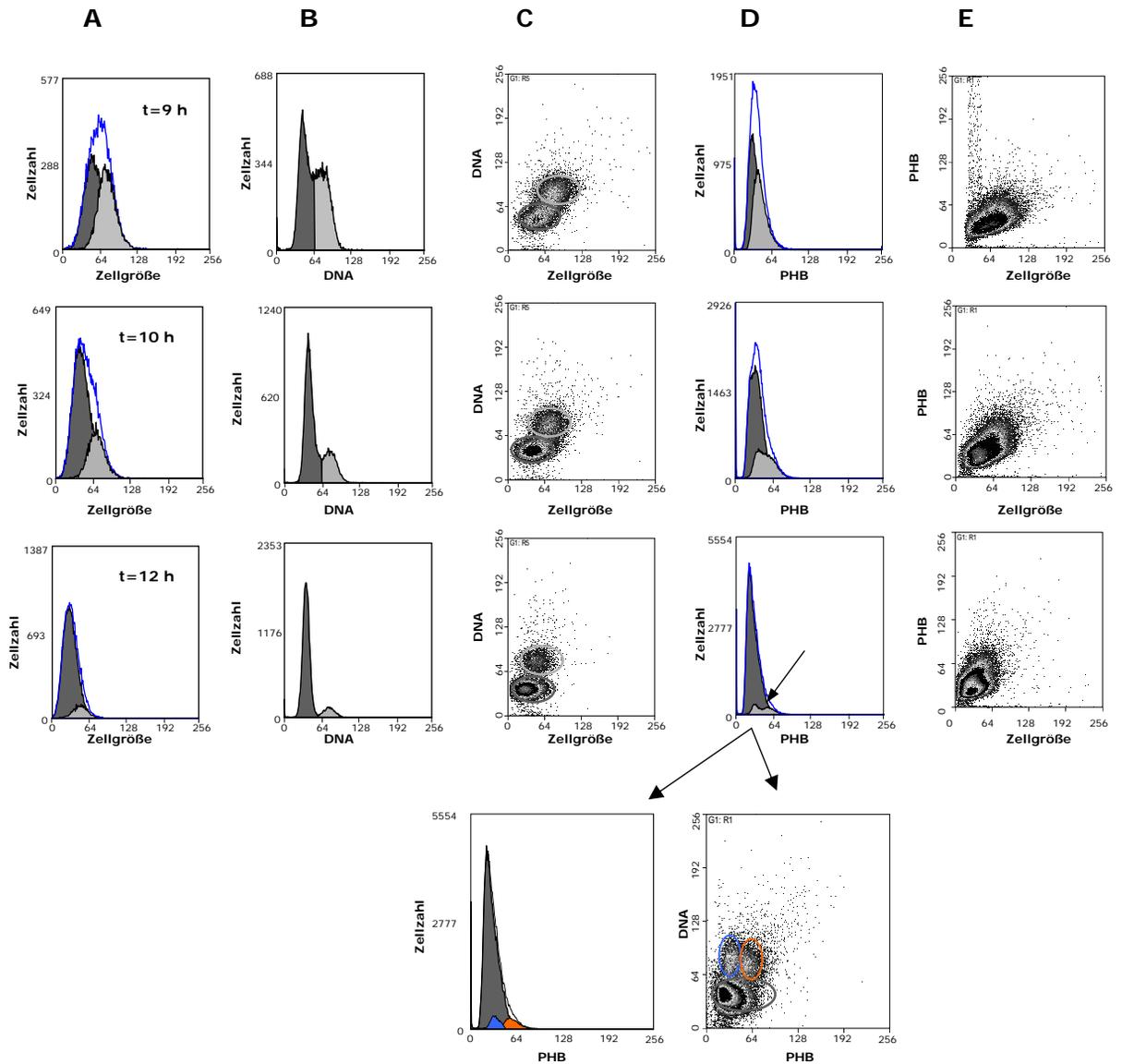
- Skarstad, K., Boye, E., Steen, H. B., 1986. Timing of initiation of Chromosome replication in individual *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 5, 1711-1717.
- Smith, M. W., Neidhardt, F. C., 1983. Proteins induced by aerobiosis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 154, 344-350.
- Son, S., Park, G. Lee, S., 1996. Growth-associated production of poly- β -hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus* sp. EL-9. *Biotechnol. Let.*, 18, 1229-1234.
- Sorensen, M. A., Fricke, J., Pedersen, S., 1998. Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* in vivo. *J. Mol. Biol.*, 280, 561-569.
- Spellmann, T. P., Sherlock, G., Zhang, Q. M., Iyer, V. R., Anders; Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., Futcher, B., 1998. Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization. *Mol. Biol. Cell*, 9, 3273-3297.
- Srere, P. A., 1969. Citrate Synthase. In: Methods in Enzymology (Lowenstein J. M., ed.) Vol. 13, 3-11, Academic press, New-York, London.
- Srienc, F., Arnold, B., Bailey, J. E., 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 982-987.
- Steels, H., James, S. A., Roberts, I. N., Stratford, M., 2000. Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast*, 16, 1173-1183.
- Steinbüchel, A., 1996. PHB and other Polyhydroxyalkanoic Acids. In: Rehm, H.-J., Reed, G., Roehr, M. (Sds.) Biotechnology. VCH Weinheim. Volume 6/ Chapter 13, 404-464.
- Stolz, G., Imlay, J. A., 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 188-194.
- Sudesh, K., Abe, H, Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 10, 1503-1505.
- Sumner, E. R., Avery, S. V., 2002. Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol*, 148, 345-351.
- Suller, M. T. E., Lloyd, D. 1999. Fluorescence monitoring of antibiotic induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry*, 35, 235-241.
- Suwanto, A., Kaplan, S., 1989. Physical and genetic mapping of *Rhodobacter spaeroides* genome: presence of two chromosomes. *J. Bacteriol.*, 184, 4351-4358.
- Swoboda-Colberg, N. G., 1995. Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of synthetic organic chemicals. In "Microbial Transformation and Degradation of

- Toxic Organic Chemicals", eds. Young, L. Y. Cerniglia, C. E., Wiley-Liss, Inc., U.S.A., pp 27-74.
- Tam, L. T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M., Antelmann, H., 2006. Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.*, 8, 1408-1427.
- Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J., 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 273, 3027-3032.
- Torheim, N. K., Skarstad, K., 1999. *Escherichia coli* SeqA protein affects DNA topology and inhibits open complex formation at *oriC*. *EMBO J.*, 18, 4482-4488.
- Tsirogianni, I., Aivaliotis, M., Karas, M., Tsiotis, G., 2004. Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1700, 117-123.
- Turner, N. A., Harris, J., Russell, A. D., Lloyd, D. 2000. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 751-759.
- U.S. EPA, Completed North American Innovative Remediation Technology Demonstration Projects, EPA 542-B-96-002, Washington, DC, 1996
- Valet, G., Leary, J. F., Tarnok, A., 2004. Cytomics-New Technologies: Towards a Human Cytome Project. *Cytometry Part A*, 59A, 167-171.
- VanBogelen, R. A., Kelley, P. M., Neidhardt, F. C., 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 169, 26-32.
- Vandamme, P., Coenye T., 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 2285-2289.
- Vanechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., Verschraegen, G., 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al 1990) comb. nov. *Int. J. Sys.Evol. Microbiol.*, 54, 317-327.
- Vercellone-Smith, P., Herson, D. S., 1997. Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the TOL plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1925-1932.
- Vigh, L., Maresca, B., Harwood, J. L., 1998. Does the membrane physical state control the expression of heat shock and other proteins? *TIBS*, 23, 369-374.

- Villarino, A., Bouvet, O. M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., Grimont, P. A. D., 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Res. Microbiol.*, 151, 755-768.
- Vogt, C., Lösche, A., Kleinstaubler, S., Müller, S., 2005. Population Profiles of a Stable, Commensalistic Bacterial Culture Grown With Toluene Under Sulphate-Reducing Conditions. *Cytometry Part A*, 66A, 91-102.
- Wallar, B. J., Lipscomb, J. D., 2001. Methane monooxygenase component b mutants alter the kinetics of steps throughout the catalytic cycle. *Biochem.*, 40, 2220-2233.
- Waller, P. R. H., Sauer, R. T., 1996. Characterization of degQ and degS, *Escherichia coli* Genes Encoding Homologs of the DegP Protease. *J. Bacteriol.*, 178, 1146-1153.
- Wang, Z.-X., Brämer, C. O., Steinbüchel, A., 2003. The glyoxylate bypass of *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 288, 63-71.
- Warhurst, A. M., Clarke, K. F., Hill, R., A., Holt, R. A., 1994. Metabolism of Styren by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1137-1145.
- Wower, I. K., Zwieb, C. W., Guven, S. A., Wower, J., 2000. Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome. *EMBO J.*, 19, 6612-6621.
- Yambuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.; proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, 39, 897-904.
- Yap, L. F., Lee, Y. K., Poh, C. L., 1999. Mechanism for phenol tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 833-840.
- Zangrossi, S., Briani, F., Ghisotti, D., Regonesi, M. E., Tortora, P., Deho, G., 2000. Transcriptional and post-transcriptional control of polynucleotide phosphorylase during cold acclimation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 36, 1470-1480.
- Zalkin, H., Nygaard, P. 1996. Biosynthesis of purine nucleotides, p. 561-579. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Zalkin, H. 1993. De novo purine nucleotide synthesis, p. 335-341. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D., Storz, G., 1999. OxyR and SoxRS Regulation of *fur*. *J. Bacteriol.*, 181, 4639-4643.

Anhang 1

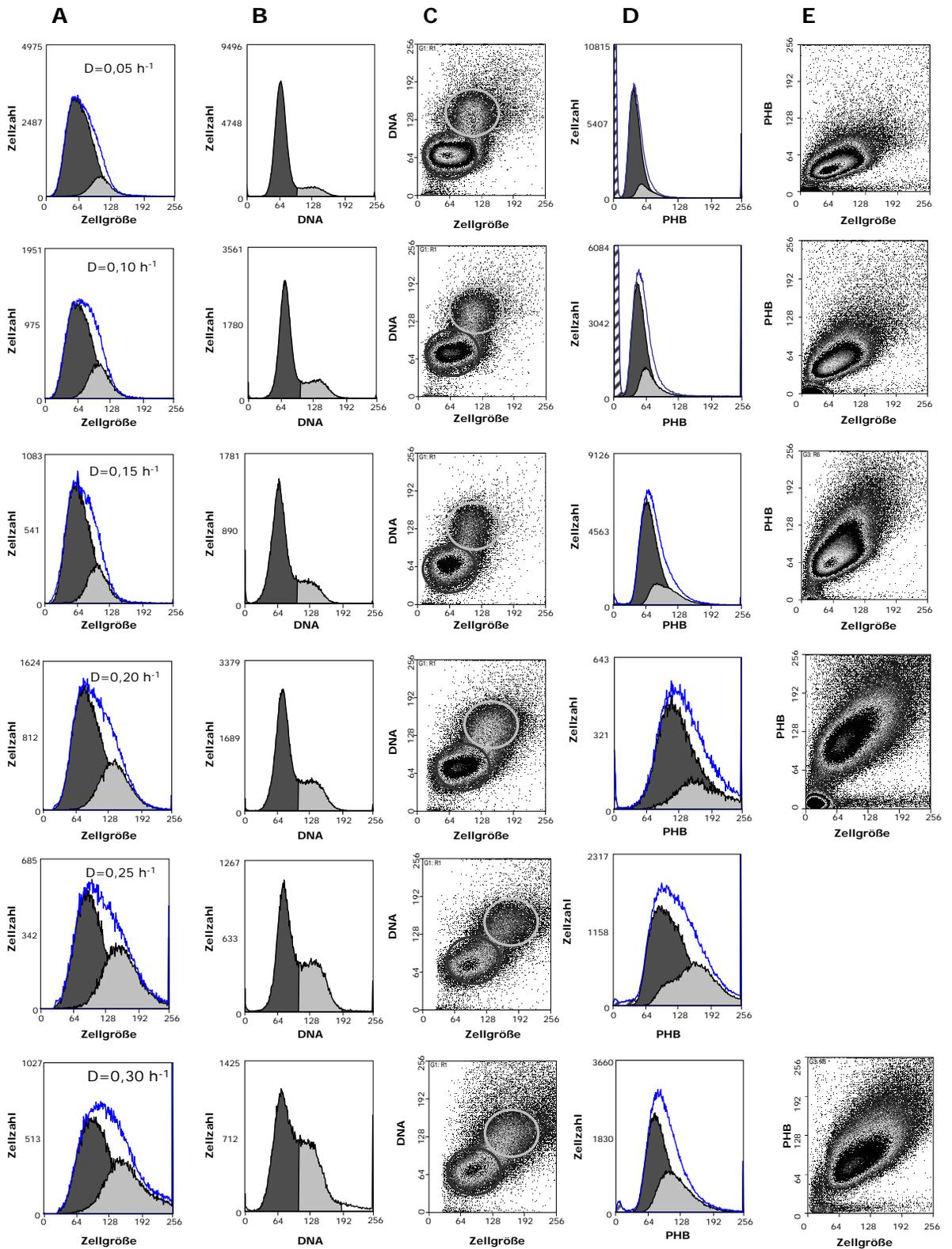




Anhang 1: Darstellung der DNA-Verteilung, Zellgröße, PHB-Gehalt der Zellen während der *Batch*-Kultivierung auf 2,5 mM Phenol

- A) Zellgröße der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (dunkelgrau=C₂, hellgrau=C₄)
- B) DNA-Gehalte der Population als Subpopulations-Verteilungs-Muster (dunkelgrau=C₂, hellgrau=C₄)
- C) zweiparametrische Darstellung des DNA-Gehaltes gegen die Zellgröße (dunkelgrau umrandete Population=C₂, hellgrau umrandete Population=C₂)
- D) PHB-Gehalte der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (dunkelgrau=C₂, hellgrau=C₄)
- E) zweiparametrische Darstellung des PHB-Gehaltes der Zellen gegen die Zellgröße

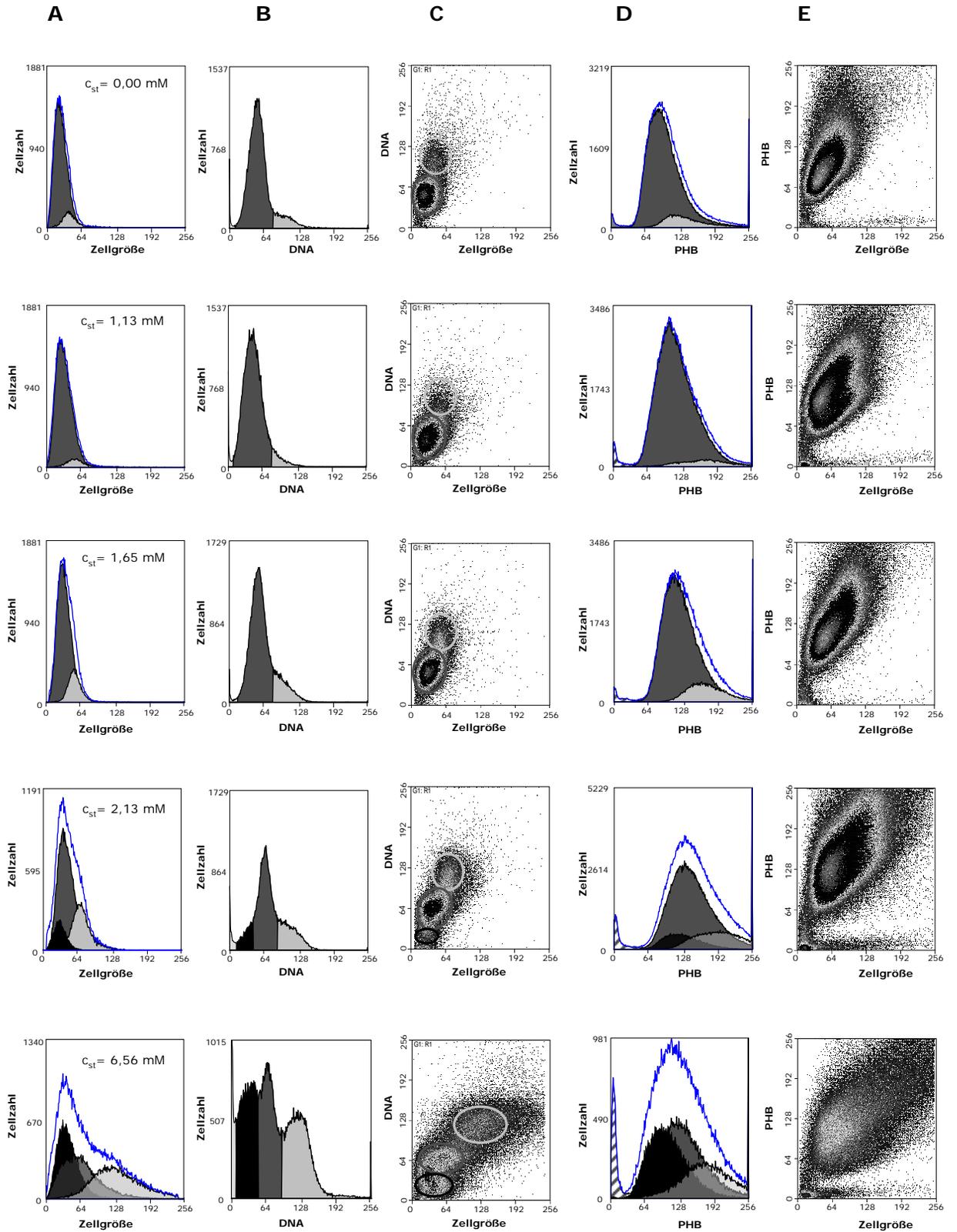
Anhang 2

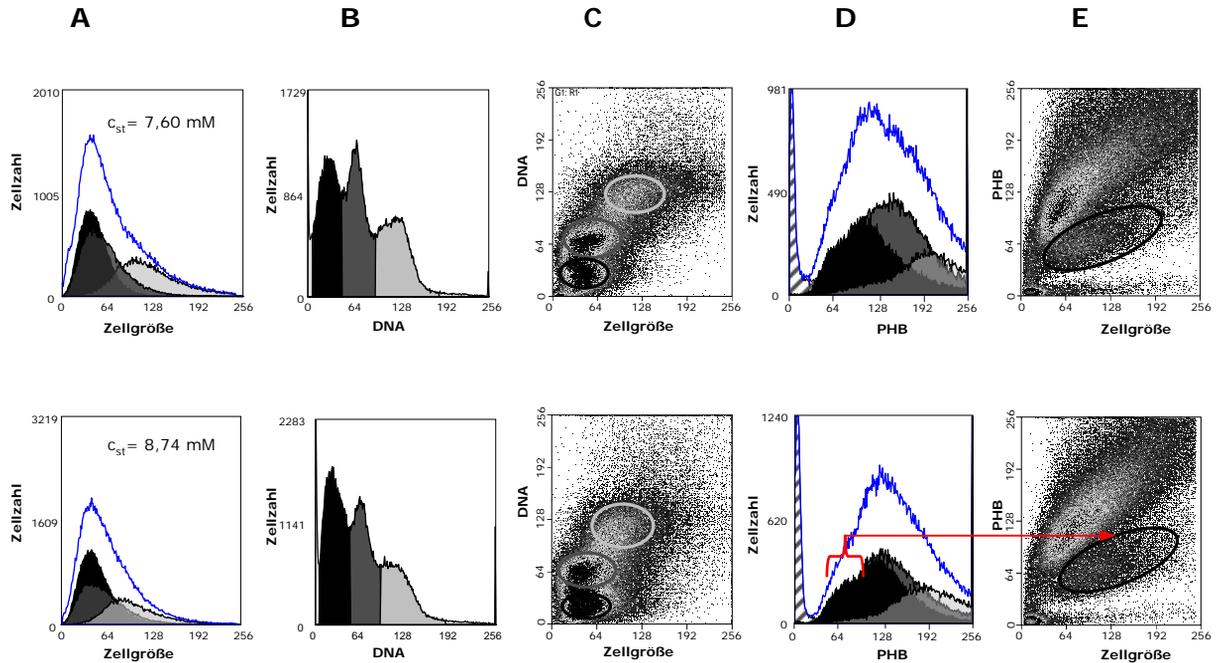


Anhang 2: Darstellung der DNA-Verteilung, Zellgröße, und des PHB-Gehaltes der Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung im Chemostat auf Phenol

- A) Zellgröße der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (dunkelgrau= C_2 , hellgrau= C_4)
- B) DNA-Gehalt der Population als Subpopulations-Verteilungs-Muster (dunkelgrau= C_2 , hellgrau= C_4)
- C) zweiparametrische Darstellung des DNA-Gehaltes gegen die Zellgröße (dunkelgrau umrandete Population= C_2 , hellgrau umrandete Population= C_4)
- D) PHB-Gehalt der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (dunkel-grau= C_2 , hellgrau= C_4)
- E) zweiparametrische Darstellung des PHB-Gehaltes der Zellen gegen die Zellgröße

Anhang 3

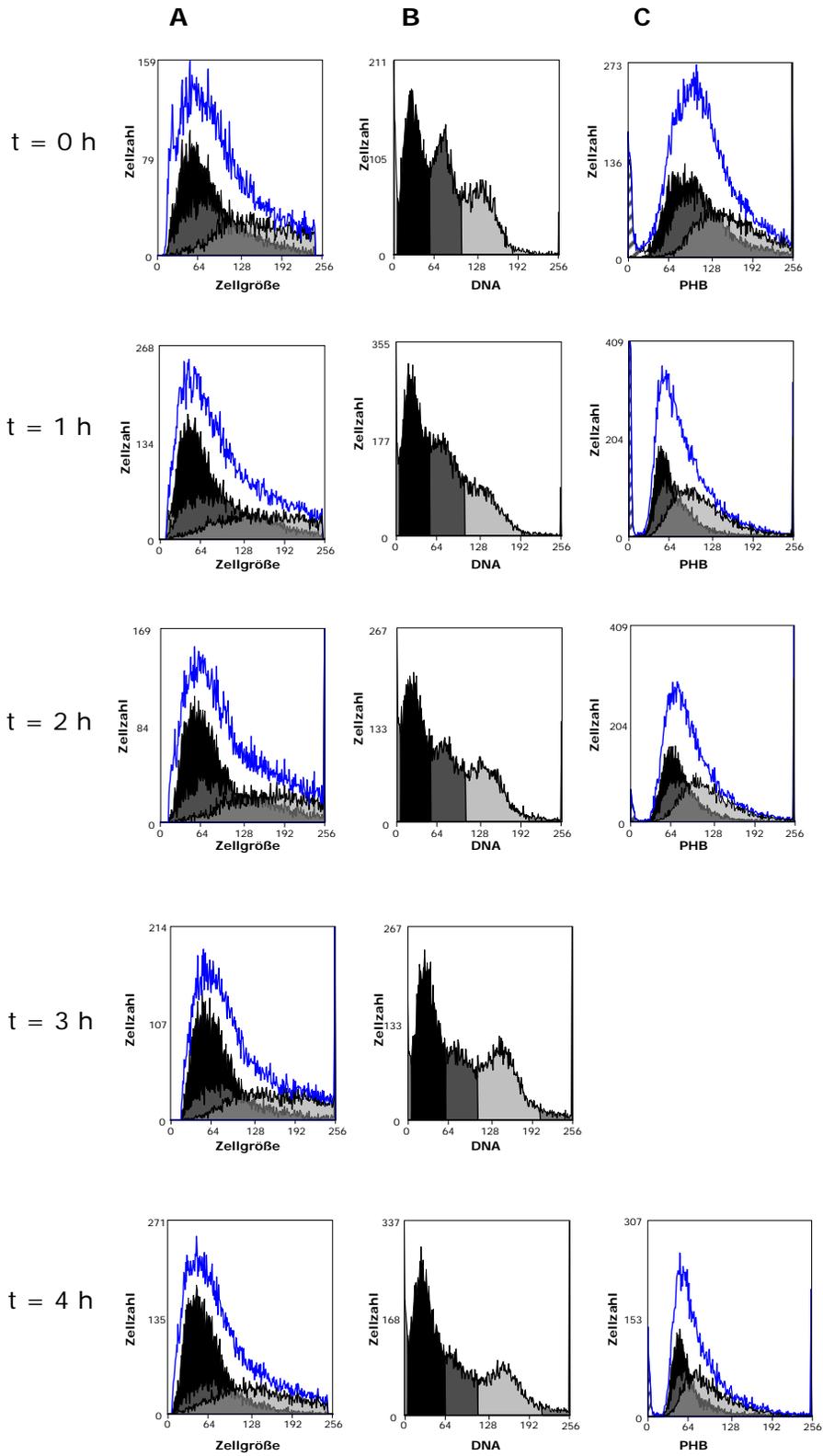


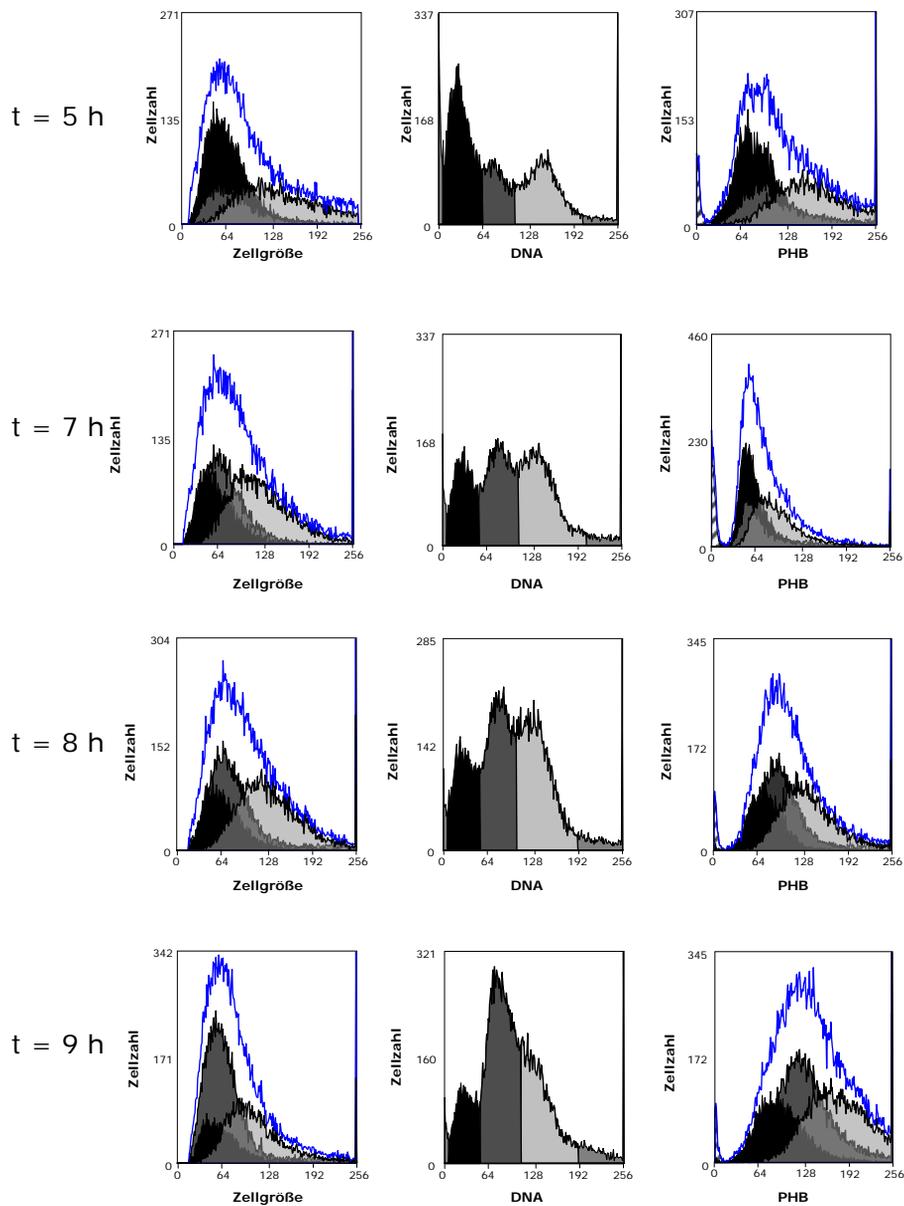


Anhang 3: Darstellung der DNA-Verteilung, Zellgröße, und des PHB-Gehaltes der Zellen während der pH-Auxostat-Kultivierung

- A) Zellgröße der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (schwarz= C_1 , dunkelgrau= C_2 , hellgrau= C_4)
- B) DNA-Gehalte der Population als Subpopulations-Verteilungs-Muster (schwarz= C_1 , dunkel-grau= C_2 , hellgrau = C_4)
- C) zweiparametrische Darstellung des DNA-Gehaltes gegen die Zellgröße (schwarz umrandete Population (schwarz= C_1 , dunkelgrau umrandete Population= C_2 , hellgrau umrandete Population= C_4))
- D) PHB-Gehalte der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (schwarz= C_1 , dunkelgrau= C_2 , hellgrau= C_4)
- E) zweiparametrische Darstellung des PHB-Gehaltes der Zellen gegen die Zellgröße

Anhang 4





Anhang 4: Darstellung von DNA Verteilung, Zellgröße, und PHB Gehalt der Zellen während der *Batch*-Rekultivierung auf 3,18 mM Phenol

- A) Zellgröße der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (schwarz = C_1 , dunkelgrau = C_2 , hellgrau = C_4)
- B) DNA-Gehalte der Population als Subpopulations-Verteilungs-Muster (schwarz = C_1 , dunkel-grau = C_2 , hellgrau = C_4)
- C) PHB-Gehalte der Population (blaue Linie) und der Subpopulationen (schwarz = C_1 , dunkelgrau = C_2 , hellgrau = C_4)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. W. Babel für die Überlassung des Themas, sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit und die anregenden und lehrreichen Diskussionen bedanken.

Prof. Dr. J. R. Andreesen gilt mein Dank für sein unermüdliches Engagement mich bei meinen Bemühungen an der Naturwissenschaftlich-Mathematisch-Technischen Fakultät der Universität Halle zu promovieren zu unterstützen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. habil. S. Müller für ihre exzellente, allumfassende Betreuung, und Dr. D. Benndorf, der mich von seiner Kompetenz im Bereich der Proteomanalytik profitieren lies, und mit dessen fachlichen und technischen Know-how so manche Klippe umschiffen werden konnte. Durch zahlreiche Diskussionen und Ermutigungen habe sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein spezielles Dankeschön an Herrn Dr. A. Lösche für seine tatkräftige Unterstützung und sein Durchhaltevermögen beim flowzytometrischen Messen und Sortieren der Zellen.

Ein großer Dank an B. Würz, die immer Platz für Proben zur PHB-Bestimmung hatte.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Flowzytometrie, Fr. H. Engewald und Fr. C. Süring einen herzliche Dank für das freundschaftliche, familiäre Arbeitsklima, und die Sorge für Leib und Wohl.

Fr. Ch. Schumann vom Department Proteomics vielen Dank für das gute Arbeitsklima, die praktischen Ratschläge und tatkräftige Unterstützung im Labor.

Einen großen Dank an J. Achilles, K. Puder und K. Schleinitz für die vielen fachlichen und nicht fachlichen, aufbauenden Gespräche, und das Verständnis wie es einen nur „Leidensgenossen“ entgegenbringen können.

Bei den Mitarbeitern des Departments Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle möchte ich mich für die Kollegialität bei fachlichen Problemen und die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mich immer unterstützt, und in meinen Bestrebungen bestärkt haben, und auch nach dem letzten Jahr noch mit mir verwandt oder befreundet sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Wiacek
Wohnort: Leipzig
geb. am, in: 13.08.1976, Wolfen
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983-1992 Polytechnische Oberschule Martha Brautzsch, Stumsdorf
1992-1995 Sportgymnasium Halle

Studium

10/95-04/2000 Studium der Biotechnologie an der Hochschule Anhalt, Vertiefungsrichtung: Biotechnologische Verfahren und Pharmatechnik, Abschluss als Diplom-Ingenieur der Biotechnologie
05/99-04/2000 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema „Abscheidung von Partikeln im Schrägkanalsystem“ bei der BAYER AG, Wuppertal

Promotion

06/2002-06/2005 Doktorandin im Department Umweltmikrobiologie, UFZ Leipzig-Halle GmbH, Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit zum Thema „Cytomics: Strategien von *Cupriavidus necator* JMP134 beim Umgang mit dem toxischen Substrat Phenol“ unter der Anleitung von Prof. W. Babel

Berufstätigkeit

05/2000-05/2002 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Geomikrobiologie im Department Umweltmikrobiologie, UFZ Leipzig-Halle GmbH
01/2006-09/2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Sächsischen Institut für angewandte Biotechnologie (SIAB), Leipzig

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich anderen Werken entnommen wurden sind, als solche kenntlich gemacht habe.

Leipzig, 07.11.2006

Claudia Wiacek