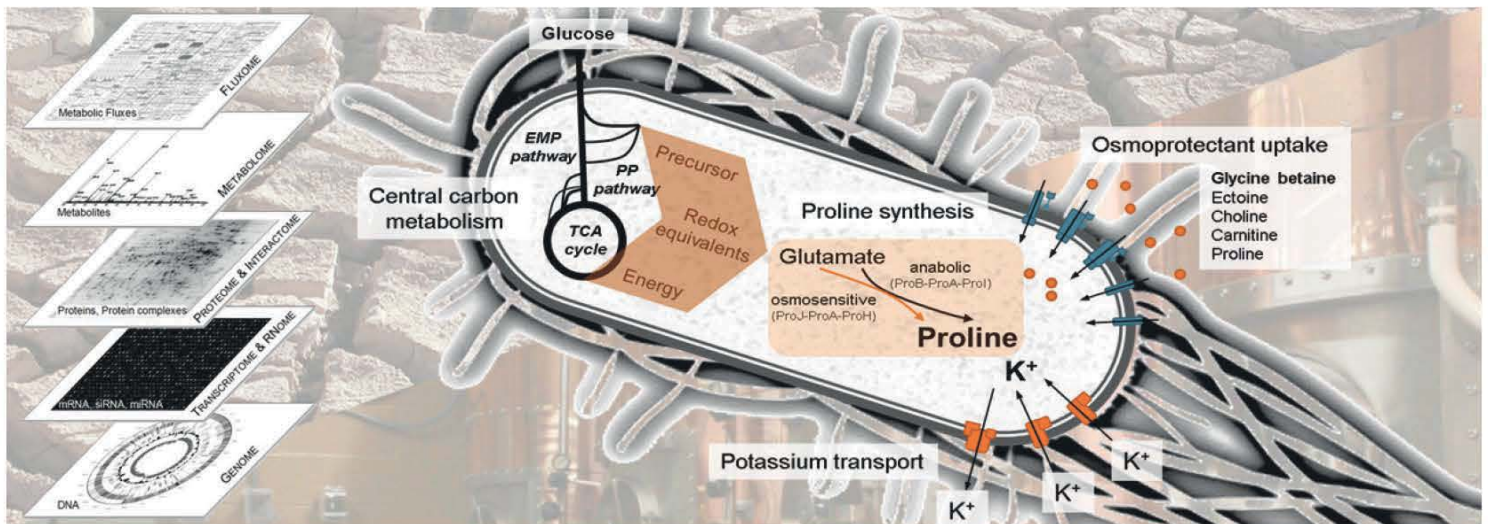




UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Band **1**



Michael Kohlstedt

A Multi-omics Perspective on Osmoadaptation and Osmoprotection in *Bacillus subtilis*

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Hochschulschriften
Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

Band 1

Cuvillier-Verlag



Herausgeber
Univ.-Prof. Dr. Christoph Wittmann
Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes
Campus A1.5, 66123 Saarbrücken
www.iSBio.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2014

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2014
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten.

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2014

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-95404-798-7
eISBN 978-3-7369-4798-6
ISSN 2199-7756



A Multi-omics Perspective on Osmoadaptation and Osmoprotection in *Bacillus subtilis*

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Ingenieurwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Michael Kohlstedt

Saarbrücken

2014



Tag des Kolloquiums: 25. Juli 2014

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Wittmann

Prof. Dr. Elmar Heinzle

Prof. Dr. Jörg Stülke

Vorsitz: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Björn Becker



Für meine Mama



Publications

Partial results of this work have been published in advance authorized by the Institute of Biochemical Engineering (Technische Universität Braunschweig) and the Institute of Systems Biotechnology (Universität des Saarlandes) represented by Prof. Dr. Christoph Wittmann.

Peer-reviewed articles

Kohlstedt, M., Becker, J., and Wittmann, C. (2010). Metabolic fluxes and beyond – systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 1065-1075. DOI: 10.1007/s00253-010-2854-2.

Becker, J., Schäfer, R., Kohlstedt, M., Harder, B.J., Borchert, N.S., Stöveken, N., Bremer, E., and Wittmann, C. (2013). Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine (2013). *Microb Cell Fact* **12**: 110. DOI: 10.1186/1475-2859-12-110.

Kohlstedt, M., Sappa, P.K., Meyer, H., Maaß, S., Zaprasis, A., Hoffmann, T., Becker, J., Steil, L., Hecker, M., van Dijk, J.M., Lalk, M., Mäder, U., Stülke, J., Bremer, E., Völker, U., and Wittmann, C. (2014). Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: A multi-omics perspective. *Environ Microbiol*, in press. DOI: 10.1111/1462-2920.12438.

Conference contributions

Kohlstedt, M., Becker, J., Korneli, C., Sappa, P.K., Meyer, H., Maaß, S., Lalk, M., Mäder, U., Bremer, E., Hecker, M., Völker, U., and Wittmann, C. (2011). Osmotic stress response in *Bacillus subtilis* – integration of the fluxome with the regulatory networks. VAAM Jahrestagung, Karlsruhe, Germany.



Kohlstedt, M., Korneli, C., Becker, J., Meyer, H., Sappa, P.K., Mäder, U., Maaß, S., Hoffmann, T., Lalk, M., Völker, U., Hecker, M., Bremer, E., and Wittmann, C. (2011). Towards systems understanding of *Bacillus subtilis* – integrating metabolic fluxes and cellular components under osmotic stress. Biotransformations, Bad Herrenalb, Germany

Meyer, H., Kohlstedt, M., Maaß, S., Sappa, P.K., Hoffmann, T., Völker, U., Wittmann, C., Bremer, E., and Lalk, M. (2011). Osmotic stress response in *Bacillus subtilis* – a combined ‘omics’ study, Metabomeeting, Helsinki, Finland.

Sappa, P.K., Kohlstedt, M., Meyer, H., Burian, M., Mäder, U., Steil, L., Lalk, M., Hoffman, T., Bremer, E., Wittmann, C., and Völker, U. (2012). Absolute quantification of central carbon metabolism in growing and stressed *Bacillus subtilis*. EuPA congress, Glasgow, United Kingdom.

Sappa, P.K., Kohlstedt, M., Meyer, H., Steil, L., Mäder, U., Becker, J., Burian, M., Hoffmann, T., Lalk, M., Bremer, E., Wittmann, C., and Völker, U. (2013). Multi-omics based investigation of central carbon metabolism of glucose starved *Bacillus subtilis* under osmotic stress and osmoprotection. Proteomic Forum, Berlin, Germany.

Kohlstedt, M. (2014) Systems understanding of salt-stressed and osmoprotected *Bacillus subtilis* – an integrated multi-omics perspective on carbon core metabolism. 2nd UniGR Workshop “Systems Biology”, Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

Kohlstedt, M., Sappa, P.K., Meyer, H., Maaß, S., Hoffmann, T., Becker, J., Steil, L., Hecker, M., van Dijl, J.M., Lalk, M., Mäder, U., Stülke, J., Bremer, E., Völker, U., Wittmann, C. (2014) Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and salt stress: a multi-omics perspective. Trends in Metabolomics, Frankfurt, Germany.



Vorwort

Bei der Entstehung der vorliegenden Arbeit hat mich eine Vielzahl von Menschen begleitet und unterstützt, denen mein großer Dank gilt.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Wittmann für die stets gute Betreuung der Arbeit, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die wertvollen Ratschläge fürs Leben. Seine stets offene Tür und die lockere Atmosphäre haben in meinen Augen die Arbeit in vielerlei Hinsicht vereinfacht, sodass am Ende *alles gut wurde*.

Mein Dank gilt den Professoren Elmar Heinzle und Manfred Schmitt für den herzlichen Empfang an der Universität des Saarlandes und die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Den Professoren Jörg Stülke, Erhard Bremer und Uwe Völker sei für das stete Voranbringen des Projektes und die Zurverfügungstellung ihres umfassenden *Bacillus*-Know-hows gedankt.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die bereitwillige Unterstützung bei experimentellen und technischen Fragen. Ganz besonders seien die zahlreichen *Samplinghelfer* erwähnt, ohne die ein Erfolg des BaCell-SysMo-Projektes nicht möglich gewesen wäre. Tausend Dank gehen insbesondere an Claudia Korneli, Judith Becker und Christoph Bolten für die *süßen Momente* im Labor während der anfänglichen Nachtschichten. Zusätzlicher Dank geht an Judith für das Einweihen in die Kunst der metabolischen Flussanalyse und der Enzymassays, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit. Ein großes Dankeschön geht an Yvonne Göcke für alle *Ratschläge* in HPLC-Fragen und ihren *radspportlichen* Ehrgeiz. Vielen lieben Dank auch an meine ehemaligen Bürokollegen Jasper und Steffi für ihre offene Art, ihren Humor, ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft und ihre Freundschaft. *Office Combo for Life*.

Ein besonderer Dank gilt *meinen* Studenten Daria Kapsan, Eugenie Sibakina, Dave Hartig und Benjamin Gola, die die bearbeitete Thematik mit den Ergebnissen ihrer experimentellen Arbeiten im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten maßgeblich bereichert haben.



Danke an das Greifswalder Analytiktrio Hanna Meyer, Sandra Maaß und Praveen Kumar Sappa für den offenen Austausch der gewonnenen Daten, das engagierte Krisenmanagement bei aufgetretenen Schwierigkeiten und die schönen Tage in Greifswald.

Ganz herzlich möchte ich meiner Frau Anne danken, die mir während dieser intensiven Zeit den Rücken frei hielt, mich wieder aufbaute, wenn einmal der Frust drohte Überhand zu nehmen und mit ihrer unbeschwerten Art meine Gedanken auf die wichtigen Dinge des Lebens lenken konnte. *Wer, wenn nicht wir. Wo, wenn nicht hier. Wann, wenn nicht jetzt. Ans Ende denken wir zuletzt.* Meiner lieben Tochter Emma danke ich für ihr papafreundliches Schlafpensum und für ihr Verständnis, dass ihr Kampf um meine Aufmerksamkeit nicht selten zugunsten der Arbeit ausging.

Ein großer Dank geht schließlich an meine Eltern, Kerstin und Elger, und meinen Bruder Martin für ihren Antrieb und ihre Unterstützung, für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihr Vertrauen, das richtige zu tun, für ihre verführerischen Ausflüge in die Welt der Musik und für ihre, mir mitgegebene Kraft.



Table of Content

Abstract	XI
Zusammenfassung	XII
1 Introduction	1
1.1 <i>Bacillus subtilis</i> – paradigm of gram-positive bacteria and versatile cell factory	1
1.2 Central metabolism of <i>Bacillus subtilis</i>	2
1.3 Osmoregulation in <i>Bacillus subtilis</i>	8
1.4 Metabolic flux analysis and its use in combination with other omics methodologies.....	11
2 Materials and Methods.....	20
2.1 Strain	20
2.2 Chemicals	20
2.3 Media	20
2.4 Cultivation	21
2.5 Analytical techniques.....	23
2.6 Determination of rates and yields.....	40
2.7 Multi-omics data integration and visualization.....	39
2.8 Experimental workflow.....	40
3 Results and Discussion.....	42
3.1 First insights into cellular metabolism of <i>B. subtilis</i> BSB1	42
3.2 Systems biology setup for multi-omics analysis	54
3.3 Adaptation of <i>Bacillus subtilis</i> carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge	61



3.4	Adaptation of <i>Bacillus subtilis</i> carbon core metabolism under nitrogen limitation, ionic and non-ionic osmotic stress	81
3.5	Biotechnological production of the high-value compatible solute ectoine	93
4	Conclusion and Outlook.....	96
5	References.....	97
6	Appendix	109
6.1	Abbreviations and Symbols.....	109
6.2	Supplementary information	111

Abstract

In its natural environment, the soil bacterium *Bacillus subtilis* permanently encounters nutrient limitations and increases in osmotic stress. The present study investigated the systems-wide response of *B. subtilis* to different simultaneously imposed stresses by combining chemostat experiments under conditions of carbon and nitrogen limitation, ionic and non-ionic osmotic stress and osmoprotection with multi-omics analyses of the transcriptome, proteome, metabolome and fluxome. Surprisingly, the flux through central carbon and energy metabolism is very robust under all conditions studied. The key to achieve this robustness is the increased production of several enzymes of central carbon metabolism to compensate for their reduced activity in the presence of high salt. A major response of the cell during osmotic stress is the production of the compatible solute proline through the concerted adjustment of multiple reactions around the 2-oxoglutarate node, which drives metabolism towards the precursor glutamate. Co-regulations between the individual cellular components under the investigated stress conditions indicate that the fine-tuning of the transcriptional and metabolic networks involves functional modules that outreach single pathways. Additionally, the work shortly describes the salinity-decoupled fed-batch production of the compatible solute ectoine in *Corynebacterium glutamicum* and the contribution of precursor amino acids of the aspartate family.