

Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum* und Rolle des Flavohämoproteins Hmp

Laura Plätzen

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio-und Geowissenschaften
Biotechnologie (IBG-1)

Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum* und Rolle des Flavohämoproteins Hmp

Laura Plätzen

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 68

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-931-7

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

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
 Zentralbibliothek, Verlag
 52425 Jülich
 Tel.: +49 2461 61-5368
 Fax: +49 2461 61-6103
 E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
 www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2013

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health, Band / Volume 68

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2013)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-931-7

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter www.fz-juelich.de/zb/juwel

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Ausschnitte der vorliegenden Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Platzen, L., Koch-Körfges, A., Weil, B., Brocker, M., Bott, M. (2013)

„Role of flavohaemoprotein Hmp and nitrate reductase NarGHJl of *Corynebacterium glutamicum* for coping with nitrite and nitrosative stress”

FEMS Microbiology Letters (2013) online veröffentlicht, DOI: 10.1111/1574-6968.12318

Des Weiteren wurden Arbeiten zu folgender Publikation beigetragen, die nicht in dieser Dissertation beschrieben werden:

Koch-Körfges, A., Pfelzer, N., **Platzen, L.**, Oldiges, M., Bott, M. (2013)

„Conversion of *Corynebacterium glutamicum* from an aerobic respiring to an aerobic fermenting bacterium by inactivation of the respiratory chain”

Biochimica et Biophysica Acta 1827 (2013) 699–708

VERSICHERUNG AN EIDES STATT

Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegt.

Düsseldorf, den 13.12.2012

Laura Plätzen

INHALTSVERZEICHNIS

1	Summary	1
2	Zusammenfassung	2
3	Einleitung	3
3.1	Die aerobe Atmungskette von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	3
3.2	Die anaerobe Atmungskette von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
4	Ziele der Arbeit	9
5	Material und Methoden	13
5.1	Bakterienstämme	13
5.2	Vektoren.....	14
5.3	Oligonukleotide	15
5.4	Lösungen	17
5.5	Mikrobiologische Methoden.....	18
5.5.1	Kultivierung von Bakterien.....	18
5.6	Analytische Methoden	22
5.6.1	Bestimmung des pH-Wertes.....	22
5.6.2	Bestimmung der Nitritkonzentration.....	22
5.6.3	Bestimmung organischer Säuren und Glucosekonzentration mittels HPLC	22
5.6.4	Bestimmung von Aminosäuren mittels uHPLC	23
5.7	Molekularbiologische Methoden	23
5.7.1	Isolierung von Nukleinsäuren	23
5.7.2	Polymerasekettenreaktion	25
5.7.3	DNA-Sequenzanalyse	26
5.7.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	26
5.7.5	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	26
5.7.6	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	27
5.7.7	Klonierungen	27
5.7.8	Transformation von Bakterien	31
5.7.9	qRT-PCR	33
5.7.10	DNA-Microarray-Technologie	34
5.8	Biochemische Methoden	37
5.8.1	Zellaufschluss	37
5.8.2	Präparation von Zellmembranen aus <i>C. glutamicum</i>	38
5.8.3	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	38
5.8.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
5.8.5	Analyse von Cytochromen.....	39
5.8.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	40
5.8.7	Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten	41

6	Ergebnisse	42
6.1	Konstruktion und Charakterisierung eines <i>C. glutamicum</i> -Stammes mit verstärkter Expression des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - <i>aa</i> ₃ -Superkomplexes.....	42
6.1.1	Konstruktion des Stammes <i>C. glutamicum</i> SC ^{plus}	42
6.1.2	Wachstum des Stammes <i>C. glutamicum</i> SC ^{plus}	42
6.1.3	Untersuchungen zum Einfluss der Promotoraustausche auf das Transkriptom	45
6.1.4	Untersuchung der Atmungsrate des Stammes SC ^{plus}	50
6.1.5	Untersuchungen zum Cytochrom-Gehalt des Stammes SC ^{plus}	51
6.1.6	Der Einfluss der erhöhten Menge Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - <i>aa</i> ₃ -Superkomplex auf die Lysinproduktion des Lysin-Produktionsstammes DM1945.....	55
6.2	Einfluss einer veränderten Expressionsstärke der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Gene - der Stamm P _{ur} F ₁ F ₀	56
6.3	Versuche zur heterologen Expression der Cytochrom- <i>cbb</i> ₃ -Oxidase aus <i>B. japonicum</i> in <i>C. glutamicum</i>	61
6.4	Versuche zur Etablierung der anaeroben Nitrat-Ammonifikation in <i>C. glutamicum</i>	65
6.4.1	Das anaerobe Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	65
6.4.2	Versuche zur Expression der Gene für die dissimilatorische Nitritreduktase Nrf aus <i>W. succinogenes</i> in <i>C. glutamicum</i>	66
6.4.3	Heterologe Expression der assimilatorischen Nitritreduktase Nir aus <i>M. smegmatis</i>	68
6.5	Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum und die globale Genexpression von <i>C. glutamicum</i>	70
6.5.1	Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum	70
6.5.2	Einfluss von Nitrat und Nitrit auf die globale Genexpression.....	72
6.6	Untersuchungen zur Rolle des Flavohämoproteins Hmp.....	75
7	Diskussion	81
7.1	Der Einfluss einer erhöhten Produktion des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - <i>aa</i> ₃ -Superkomplexes auf <i>C. glutamicum</i>	81
7.2	Der native Promotor der Gene der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase scheint geeignet für biotechnologische Anwendungen.....	84
7.3	Versuch der heterologen Expression der Cytochrom- <i>cbb</i> ₃ -Oxidase aus <i>B. japonicum</i>	86
7.4	Die heterologe Expression der Nitritreduktase Nrf aus <i>Wolinella succinogenes</i> und Nir aus <i>Mycobacterium smegmatis</i>	88
7.5	Der Einfluss von Nitrat und Nitrit auf <i>C. glutamicum</i>	89
7.6	Das Flavohämoprotein Hmp in <i>C. glutamicum</i> ist in die Antwort auf nitrosativen Stress involviert.....	90
8	Literaturverzeichnis.....	93
9	Anhang	103
9.1	Ergänzende Abbildungen	103
9.2	Vektorkarten.....	104
9.3	Ergänzende Tabellen	114

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion-Sorbitol
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
DW	Trockengewicht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii, (und andere)
FAD	Flavinadenin-dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m (s ²) ⁻¹)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar (mol l ⁻¹)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
mM	Millimolar
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenin-dinukleotid, oxidiert/reduziert
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat, oxidiert/reduziert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (engl.), Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium)

SNP	Natriumnitroprussid (engl. sodium)
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TCA	Tricarbonsäurezyklus, Citratzyklus
TOF	Time of Flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (1 Unit = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$)
uHPLC	ultra High Performance Liquid Chromatography
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Weitere gängige Abkürzungen finden sich unter

<http://www.jbc.org/site/misc/abbrev.xhtml> und

<http://www.jbc.org/site/misc/itoa.xhtml>

1 SUMMARY

Corynebacterium glutamicum possesses a branched aerobic respiratory chain with two terminal oxidases, cytochrome *bd* oxidase with a high oxygen affinity but a low H⁺/O ratio, and the proton pumping cytochrome *aa*₃ oxidase with a low oxygen affinity but a high H⁺/O ratio. The latter forms a supercomplex with the cytochrome *bc*₁ complex. Under aerobic conditions these two branches build up an electrochemical proton gradient, which, in the process of oxidative phosphorylation, is used for ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase. Within this work the respiratory chain of *C. glutamicum* was modified and the influences of these modifications were studied. The cytochrome *bc*₁-*aa*₃ supercomplex is the major proton pump in *C. glutamicum*. To study the influence of increased cellular levels of the supercomplex, expression of its structural genes was enhanced two-fold by exchange of the native promoters with the P_{*tuf*} promoter of elongation factor Tu. Higher levels of cytochromes *a*, *b* and *c* were detectable in the recombinant strain and resting cells showed a 30% increased oxygen consumption rate. However, growth was comparable to the wild type. In a similar approach, the native promoter of the *atpBEFHAGDC* operon was exchanged by P_{*tuf*}. Surprisingly this resulted in a 50-60% decreased expression of the *atp* genes, indicating that the native *atp* promoter is stronger than the *tuf* promoter and might be suitable for enhancing gene expression in producer strains of *C. glutamicum*.

In order to improve energy conservation under microaerobic conditions, attempts were made to replace the *bd* oxidase by a cytochrome *cbb*₃-type oxidase from *Bradyrhizobium japonicum*, a proton-pumping heme-copper type enzyme with a very high oxygen affinity. However, as the synthesis of the accessory protein FixG proved to be toxic for *C. glutamicum*, functional expression of the heterologous *cbb*₃-type oxidase could not be achieved.

C. glutamicum possesses a limited potential for anaerobic growth by nitrate respiration via the nitrate reductase NarGHJI. However, due to the lack of a nitrite reductase, nitrite accumulates and inhibits growth. In order to allow conversion of nitrite to ammonia and thus the use of nitrate as a nitrogen source, attempts were made to express a dissimilatory nitrite reductase from *Wolinella succinogenes* and an assimilatory nitrite reductase from *Mycobacterium smegmatis* in *C. glutamicum*. Unfortunately, anaerobic nitrite reduction did not work with either of these enzymes. In another aspect of this work, the influence of nitrite on growth and global gene expression was analyzed. The gene most strongly upregulated by nitrite was found to be *hmp* encoding a flavohaemoprotein. A Δ *hmp* mutant was more sensitive towards nitrite and the NO-donating agent sodium nitroprusside under aerobic conditions. Anaerobic growth by nitrate respiration was also severely impaired. Thus flavohaemoprotein Hmp of *C. glutamicum* is important for coping with nitrite-derived stress under aerobic and anaerobic conditions.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Corynebacterium glutamicum besitzt eine verzweigte Atmungskette mit zwei terminalen Oxidasen, eine Cytochrom-*bd*-Oxidase mit einer hohen Sauerstoffaffinität, aber einem niedrigen H^+/O -Verhältnis, und eine Protonen-pumpende Cytochrom-*aa₃*-Oxidase mit einer niedrigeren Sauerstoffaffinität, aber einem hohen H^+/O -Verhältnis. Die Letztere bildet einen Superkomplex mit einem Cytochrom-*bc₁*-Komplex. Unter aeroben Bedingungen bauen diese beiden Zweige einen elektrochemischen Protonengradienten auf, welcher von der F_1F_0 -ATP-Synthase in der oxidativen Phosphorylierung dazu genutzt wird, ATP zu synthetisieren. In dieser Arbeit wurde die Atmungskette von *C. glutamicum* modifiziert und die Einflüsse dieser Modifikationen untersucht. Der Cytochrom-*bc₁*-*aa₃*-Superkomplex ist die bedeutendste Protonenpumpe in *C. glutamicum*. Um den Einfluss höherer zellulärer Mengen des Superkomplexes zu untersuchen, wurde die Expression seiner strukturellen Gene durch den Austausch der nativen Promotoren gegen den P_{tuf} -Promotor des Elongationsfaktors Tu zweifach erhöht. Im rekombinanten Stamm waren höhere Mengen der Cytochrome *a*, *b* und *c* nachweisbar und ruhende Zellen wiesen eine um 30 % erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate auf. Allerdings war das Wachstum mit dem des Wildtyps vergleichbar. In einem ähnlichen Ansatz wurde der native Promotor des *atpBEFHAGDC*-Operons gegen P_{tuf} ausgetauscht. Überraschenderweise führte dies zu einer 50-60 % reduzierten Expression der *atp*-Gene. Dies deutet darauf hin, dass der native *atp*-Promotor stärker ist als der *tuf*-Promotor und möglicherweise geeignet sein könnte, um in Produktionsstämmen von *C. glutamicum* die Genexpression zu erhöhen.

Um die Energiekonservierung unter mikroaeroben Bedingungen zu verbessern, wurden Versuche unternommen, die *bd*-Oxidase durch eine Cytochrom-*cbb₃*-Oxidase aus *Bradyrhizobium japonicum*, ein Protonen-pumpendes Häm-Kupfer-Enzym mit einer sehr hohen Sauerstoffaffinität, zu ersetzen. Allerdings, da die Synthese des akzessorischen Proteins FixG toxisch für *C. glutamicum* war, konnte keine funktionale Expression der heterologen *cbb₃*-Typ Oxidase erreicht werden.

C. glutamicum besitzt ein limitiertes Potential zu anaerobem Wachstum mittels Nitratatmung durch die Nitratreduktase NarGHJI. Allerdings akkumuliert Nitrit und inhibiert das Wachstum, da eine Nitritreduktase fehlt. Um die Umsetzung von Nitrit zu Ammonium zu ermöglichen und somit die Nutzung von Nitrat als Stickstoffquelle, wurden Versuche unternommen eine dissimilatorische Nitritreduktase aus *Wolinella succinogenes* und eine assimilatorische Nitritreduktase aus *Mycobacterium smegmatis* in *C. glutamicum* zu exprimieren. Jedoch funktionierte die anaerobe Nitritreduktion mit keinem dieser Enzyme. In einem anderen Aspekt dieser Arbeit wurde der Einfluss von Nitrit auf die globale Genexpression untersucht. Das am stärksten durch Nitrit hochregulierte Gen war *hmp*, welches für ein Flavohämoprotein kodiert. Eine Δhmp -Mutante war unter aeroben Bedingungen sowohl empfindlicher gegenüber Nitrit, als auch gegenüber dem NO-Donor Natriumnitroprussid. Das anaerobe Wachstum dieser Mutante mittels Nitratatmung war ebenfalls stark beeinträchtigt. Demzufolge spielt das Flavohämoprotein Hmp eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Nitrit-induzierten Stress in *C. glutamicum* unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

3 EINLEITUNG

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, nicht pathogenes Bodenbakterium aus der Ordnung der Corynebacteriales. Als natürlicher Glutamatproduzent wurde es 1957 in Japan erstmals isoliert (Kinoshita *et al.*, 1958). *C. glutamicum* ist von großer industrieller Bedeutung, da es seit den 1960er Jahren für die biotechnologische Produktion von L-Aminosäuren, besonders L-Glutamat und L-Lysin eingesetzt wird (Eggeling & Bott, 2005). Da *C. glutamicum* molekularbiologisch sehr gut manipulierbar ist (Vertes *et al.*, 2005), konnte es zu einem Plattformorganismus entwickelt werden. Es existieren Stämme, welche heterologe und homologe Enzyme produzieren und ausschleusen können (Meissner *et al.*, 2007), sowie Stämme, welche in der Biokraftstoffproduktion eingesetzt werden können (Blombach *et al.*, 2011; Inui *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2010). Darüber hinaus können Stammvarianten heute für die Produktion von niedermolekularen organischen Säuren, wie z.B. Succinat, verwendet werden (Litsanov *et al.*, 2012). D-Aminosäuren (Stäbler *et al.*, 2011) und Diamine (Mimitsuka *et al.*, 2007) können von *C. glutamicum* auf Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt werden. Daher ist *C. glutamicum* ein Modellorganismus der weißen Biotechnologie.

Als phylogenetisch enger Verwandter diverser humanpathogener Bakterien, beispielsweise *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, wird *C. glutamicum* als Modellorganismus für die Erforschung von deren Virulenzmechanismen, Wirkmechanismen von Medikamenten und zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen diese Pathogene eingesetzt. Hierbei ist besonders die Zellwand interessant, da diese in Corynebakterien und Mykobakterien eine charakteristische Mykolsäureschicht aufweist, welche wichtig für die Virulenz von *M. tuberculosis* ist (Barry *et al.*, 1998). Viele der gängigen Therapeutika gegen die Tuberkulose, z. B. Ethambutol, wirken an der Zellhülle von *M. tuberculosis*. Teile der Biosynthese der ungewöhnlichen Zellwand der Mycobakterien und Corynebakterien konnten in *C. glutamicum* aufgeklärt werden (Varela *et al.*, 2012).

3.1 Die aerobe Atmungskette von *Corynebacterium glutamicum*

Zur Energiegewinnung nutzen Organismen die Substratstufenphosphorylierung und die oxidative Phosphorylierung. Bei der Substratstufenphosphorylierung wird durch den Abbau der Substrate Energie in Form von ATP erzeugt, indem die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Intermediats auf ADP übertragen wird. Hierbei muss die Phosphatgruppe nicht zwangsläufig vom Substrat kommen. Dies geschieht bei der Glycolyse, im Citratzyklus (TCA) oder bei der Entstehung von Acetat aus Acetyl-CoA. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird die protonenmotorische Kraft durch die F_1F_0 -ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt. Die protonenmotorische Kraft (PMK) entsteht durch die

Reoxidation von Menachinol, die an Enzymen der Atmungskette stattfindet. Hierbei werden Protonen über die Membran transloziert.

C. glutamicum besitzt eine verzweigte Atmungskette (Bott & Niebisch, 2003). Elektronen werden von diversen Dehydrogenasen auf oxidiertes Menachinon (MK) übertragen. Die Reoxidation von Menachinol (MKH₂) erfolgt unter aeroben Bedingungen entweder durch den Cytochrom-*bc*₁-Komplex, welcher die Elektronen an die Cytochrom-*aa*₃-Oxidase weiterleitet, oder durch die Cytochrom-*bd*-Oxidase. Die Cytochrom-*aa*₃-Oxidase bildet einen Superkomplex mit dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex. Der finale Elektronenakzeptor ist in beiden Fällen molekularer Sauerstoff (Abbildung 3-1). Beide Zweige der Atmungskette sind am Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über der Membran beteiligt, der u.a. von der F₁F₀-ATP-Synthase genutzt wird, um die ATP-Synthese anzutreiben.

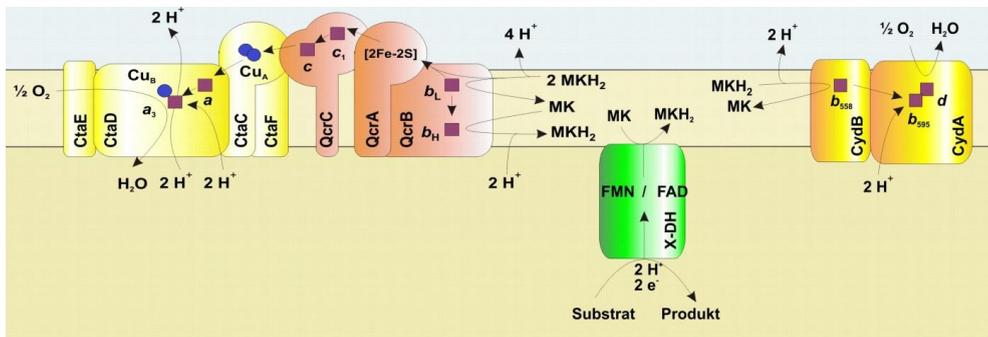


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der aeroben Atmungskette von *C. glutamicum* mit Transportwegen von Elektronen, Protonen und Substraten (Pfeile). Links ist der Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex abgebildet (in hellgelb die Untereinheiten der Cytochrom-*aa*₃-Oxidase, in orange die Untereinheiten des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes). Rechts dargestellt ist die Cytochrom-*bd*-Oxidase (dunkelgelb), mittig eine membranassoziierte Dehydrogenase (grün), welche die Reduktion von Menachinon (MK) zu Menachinol (MKH₂) an einem FMN oder FAD-Cofaktor katalysiert (modifiziert nach (Bott & Niebisch, 2003)). Violette Quadrate symbolisieren Häme, blaue Punkte Kupferionen.

Bei der Reaktion der Cytochrom-*bd*-Oxidase werden vermutlich zwei Protonen pro zwei Elektronen auf die äußere Seite der Zytoplasmamembran transloziert (Miller & Gennis, 1985). Hierbei handelt es sich um die Protonen von Menachinol, somit findet kein aktiver Transport von Protonen statt. Das Verhältnis von Protonen zu Elektronen (H⁺/e⁻) beträgt eins. Der Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex transloziert hingegen rechnerisch sechs Protonen pro zwei Elektronen, wobei zwei davon aktiv über die Membran gepumpt werden (H⁺/e⁻ = 3) (Nicholls & Ferguson, 1992). Die kürzlich bestimmten H⁺/O-Quotienten für den Wildtyp (H⁺/O = 3,94 ± 0,30), eine Δ*ctaD*-Mutante (H⁺/O = 2,76 ± 0,25) und eine Δ*cydAB*-Mutante (H⁺/O = 5,23 ± 0,36) untermauern diese theoretischen Berechnungen (Kabashima *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass der Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex den größten

Anteil am Aufbau des Protonengradienten hat (Kabus *et al.*, 2007; Koch-Körfges, 2011; Niebisch & Bott, 2001).

Die Cytochrom-*bd*-Oxidase wird durch die Gene *cydAB* kodiert, welche in einem Operon mit den Genen *cydCD* liegen. Diese kodieren in *E. coli* für einen ABC-Transporter (Pittman *et al.*, 2002; Pittman *et al.*, 2005), der für die Bildung der Cytochrom-*bd*-Oxidase essentiell ist. Eine vektorbasierte funktionale Überproduktion der *bd*-Oxidase in *C. glutamicum* gelang nur, wenn der *CydCD*-Transporter ebenfalls überexprimiert wurde (Kabus *et al.*, 2007). Eine Deletion der Gene *cydAB* führte zu einer reduzierten Biomassebildung der Mutante, während die Wachstumsrate kaum beeinträchtigt war (Kabus *et al.*, 2007). Es konnte beobachtet werden, dass die Expression in der stationären Phase gegenüber der exponentiellen Phase gesteigert war und mehr Cytochrom *d* in der stationären Phase vorhanden war (Kusumoto *et al.*, 2000; Kusumoto *et al.*, 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Cytochrom-*bd*-Oxidase in *C. glutamicum* aufgrund ihrer wahrscheinlich hohen Affinität zu Sauerstoff eine wichtige Rolle im späten exponentiellen Wachstum und in der stationären Phase spielt, wenn aufgrund einer hohen Zelldichte die Sauerstoffverfügbarkeit limitiert ist.

Der Cytochrom-*bc₁-aa₃*-Superkomplex besteht aus dem Cytochrom-*bc₁*-Komplex und der Cytochrom-*aa₃*-Oxidase. Die größte Untereinheit der Cytochrom-*aa₃*-Oxidase ist CtaD. Sie enthält die beiden Häme *a* und *a₃* und den Cu_B-Cofaktor. CtaD aus *C. glutamicum* ist ein typischer Vertreter der Untereinheit I von Häm-Kupfer-Oxidasen (Niebisch & Bott, 2001), da alle bekannten funktionalen Reste und Cofaktorbindestellen vorhanden sind. An der Untereinheit CtaD finden die Reduktion von Sauerstoff und der Protonentransport statt. Bei CtaC handelt es sich um die Untereinheit II der Cytochrom-*aa₃*-Oxidase. Diese enthält einen Cu_A-Cofaktor, über den die Aufnahme der Elektronen von Cytochrom *c* erfolgt. Die Untereinheit III ist CtaE. Es wurde außerdem eine vierte Untereinheit identifiziert, nämlich CtaF (Niebisch & Bott, 2001).

Der Cytochrom-*bc₁*-Komplex besteht aus den drei Untereinheiten QcrC, QcrA und QcrB. QcrB trägt die Häme *b_L* und *b_H* und katalysiert die Reoxidation von Menachinol, wobei Protonen auf der Außenseite der Membran freigesetzt werden. Die Elektronen werden über das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein QcrA weitergeleitet, welches einen [2Fe-2S]-Cluster enthält. Die Übertragung der Elektronen an die Cytochrom-*aa₃*-Oxidase erfolgt über Cytochrom *c₁* (QcrC). Hierbei handelt es sich um das einzige *c*-Typ Cytochrom in *C. glutamicum* (Niebisch & Bott, 2001), es enthält zwei Häm-*c*-Moleküle. Dieses ungewöhnliche Dihäm-Cytochrom *c₁* ist vermutlich auch der Grund für die Superkomplexbildung. Die Untereinheiten des Cytochrom-*bc₁-aa₃*-Superkomplexes werden in den Genen bzw. Operons *ctaD*, *ctaCF* und *ctaEqcrCAB* kodiert (Niebisch & Bott, 2001). Es wurden zwei Deletionsmutanten hergestellt, um die Rolle des Cytochrom-*bc₁-aa₃*-Superkomplexes

genauer zu untersuchen. Zum einen wurde die Untereinheit I der Cytochrom- aa_3 -Oxidase, CtaD, deletiert ($\Delta ctaD$). Zum anderen wurden die Gene des Cytochrom- bc_1 -Komplexes deletiert ($\Delta qcrCAB$) (Niebisch & Bott, 2001). Diese beiden Mutanten besaßen keinen funktionalen Cytochrom- bc_1 - aa_3 -Superkomplex mehr, jedoch verhielten sie sich im Wachstum in Minimalmedium unterschiedlich. Neuste Analysen ergaben, dass im Stamm $\Delta ctaD$ vermutlich Lipidperoxidation stattfindet, welche das Wachstum stark inhibiert (Koch-Körfges, 2011) und den Unterschied im Wachstumsverhalten erklärt.

Die ATP-Synthese über oxidative Phosphorylierung wird in *C. glutamicum* durch eine F_1F_0 -ATP-Synthase katalysiert, deren strukturelle Gene im Operon *atpBEFHAGDC* kodiert sind (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006). Die Expression des Operons wird unter alkalischen Bedingungen induziert, vermutlich unter der Kontrolle des Sigmafaktors σ^H (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006). Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass die F_1F_0 -ATP-Synthase für das Wachstum auf Glucose von *C. glutamicum* nicht essentiell ist (Koch-Körfges *et al.*, 2012). Auf Acetat konnte die ΔF_1F_0 -Mutante jedoch nicht wachsen, da dieses Substrat keine netto ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung ermöglicht. Die Mutante zeigte sowohl eine erhöhte Glucoseaufnahme-, sowie eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate. Daher wurde geschlussfolgert, dass ein Verlust der oxidativen Phosphorylierung durch eine erhöhte Substratstufenphosphorylierungsrate kompensiert wurde. Ähnliches wurde bereits für eine Mutante beobachtet, in welcher die γ -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase eine Punktmutation trägt, sodass sie nur noch eine Restaktivität von ca. 25 % aufweist (Sekine *et al.*, 2001). In einer *C. glutamicum*-Mutante, die keine terminalen Oxidasen mehr besitzt (*C. glutamicum* DOOR (Koch-Körfges, 2011)), und unter anaeroben Bedingungen (A. Michel, unveröffentlichte Daten) katalysiert die F_1F_0 -ATP-Synthase sehr wahrscheinlich den durch ATP-Hydrolyse getriebenen Export von Protonen aus dem Zytoplasma, um den internen pH-Wert aufrechtzuerhalten. Unter beiden Bedingungen sind die wichtigsten Reaktionen, welche die Protonen aus der Zelle schleusen, nämlich die des Superkomplexes und der Cytochrom-*bd*-Oxidase, nicht funktional.

3.2 Die anaerobe Atmungskette von *Corynebacterium glutamicum*

Neben Sauerstoff gibt es noch weitere terminale Elektronenakzeptoren, z.B. Fumarat und Nitrat. *C. glutamicum* kann anaerob durch Nitratatmung wachsen. Dies wurde 2007 von Nishimura (Nishimura *et al.*, 2007) und Takeno (Takeno *et al.*, 2007) unabhängig voneinander gezeigt, jedoch schon vorher spekuliert (Bott & Niebisch, 2003). Die Fähigkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren war bereits bekannt und wurde für taxonomische Bestimmungen genutzt (Liebl, 2001). Nitrat wird von der membranständigen Nitratreduktase NarGHJI zu Nitrit reduziert (für eine Übersichtsarbeit über Nar-Typ Nitratreduktasen siehe (Blasco *et al.*, 2001); vgl. auch Abbildung 3-2). Die der Reduktion von Nitrat zu Nitrit werden Elektronen von

Menachinol auf Nitrat übertragen und zwei Protonen pro zwei Elektronen auf die Außenseite der Cytoplasmamembran entlassen, während im Cytoplasma zwei Protonen verbraucht werden, um Wasser zu bilden ($\text{NO}_3^- + \text{MKH}_2 + 2\text{H}^+_{(\text{innen})} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{MK} + 2\text{H}^+_{(\text{außen})} + \text{H}_2\text{O}$). Die Nitratatmung trägt dadurch zur Bildung des Protonengradienten über der Membran und somit zur Energiekonservierung bei. Energetisch ist die Nitratreduktase genauso effizient wie die Cytochrom-*bd*-Oxidase ($\text{H}^+/\text{e}^- = 1$). Daher sollte das anaerobe Wachstum von *C. glutamicum* durch Nitratatmung besser sein, als es beobachtet wurde.

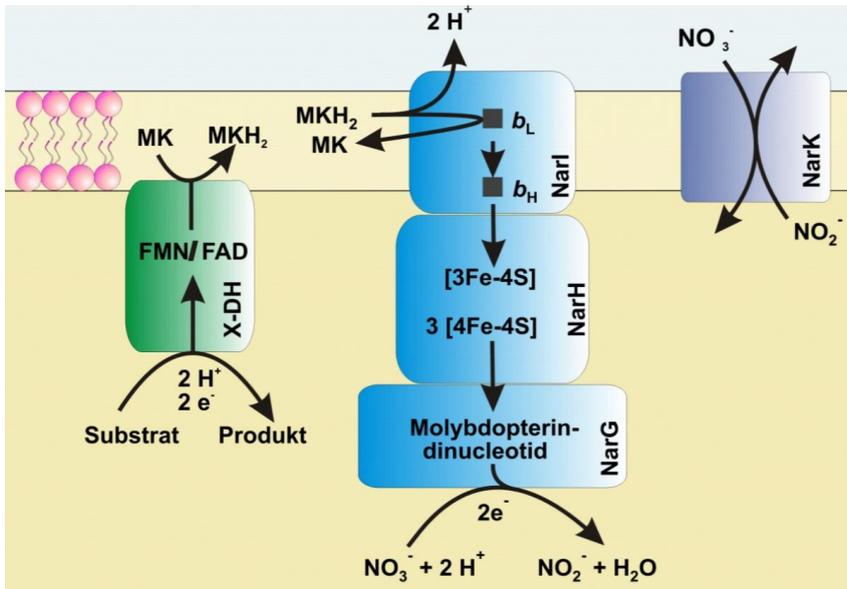


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der anaeroben Atmungskette von *C. glutamicum* mit Transportwegen von Elektronen, Protonen und Substraten (Pfeile). Dehydrogenasen (grün, mit einem FAD- oder FMN-Cofaktor) übertragen Elektronen auf Menachinon (MK). Die Nitratreduktase Nar (blau, mit den Hämen b_L und b_H , zwei Eisen-Schwefel-Clustern und einem Molybdän-Cofaktor) reduziert Nitrat zu Nitrit, wobei Menachinol (MKH_2) reoxidiert wird. Protonen werden auf der Außenseite der Cytoplasmamembran freigesetzt. Nitrit wird von NarK (lila) im Antiport gegen Nitrat aus der Zelle transportiert (modifiziert nach (Bott & Niebisch, 2003)).

Die strukturellen Gene der Nitratreduktase liegen in einem Operon *narKGHJI* zusammen mit dem *narK*-Gen für einen Nitrat/Nitrit Antiporter (Clegg *et al.*, 2002; Kalinowski *et al.*, 2003). Der Nitrat/Nitrit-Antiporter NarK schleust das toxische Nitrit aus der Zelle aus, im Antiport gegen Nitrat. Die Transkription des *nar*-Operons wird u. a. von dem sauerstoffabhängigen Transkriptionsregulator ArnR kontrolliert, welcher die Transkription unter aeroben Bedingungen reprimiert (Nishimura *et al.*, 2008). Unter Eisenlimitierung wird das Operon von RipA reprimiert (Wennerhold *et al.*, 2005). Das Operon unterliegt auch der Kontrolle des cAMP-abhängigen Regulators GlxR (Nishimura *et al.*, 2011b). RosR ist ein

Aktivator der Transkription des *nar*-Operons, welcher unter H_2O_2 -Stress inaktiviert wird, sodass die Transkription des *nar*-Operons reduziert wird (Busmann *et al.*, 2010). Zusätzlich aktiviert der Sigmafaktor σ^{H} die *nar*-Transkription (Patek & Nesvera, 2011).

Unter anaeroben Bedingungen wird die Transkription von *narKGHJI* dereprimiert und die Nitratatmung findet statt, wenn Nitrat im Medium vorhanden ist. Unter diesen Bedingungen akkumuliert Nitrit im Medium, welches von *C. glutamicum* nicht weiter reduziert wird (Nishimura *et al.*, 2007; Takeno *et al.*, 2007). Dies, wie auch Auswertungen der Genomsequenz (Bott & Niebisch, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003), zeigt, dass *C. glutamicum* keine Nitritreduktase besitzt. Somit kann das Nitrit nicht weiter reduziert werden. Nitrit ist toxisch für Zellen, daher führt wahrscheinlich die Akkumulation von Nitrit zu dem geringen Potential von *C. glutamicum*, unter anaeroben Bedingungen mittels Nitratatmung zu wachsen. Nitratatmung und die Anwesenheit von Nitrit können zur Bildung von reaktiven Stickstoffspezies (RNS, engl. *reactive nitrogen species*), wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) oder Peroxinitrit, beitragen, welche für die Zelle toxisch sind (für eine aktuelle Übersichtsarbeit, siehe (Bowman, *et al.*, 2011)). RNS sorgen für nitrosativen Stress in der Zelle, da sie sehr reaktiv sind und mit vielen Zellbestandteilen reagieren, z.B. mit DNA, Membranen und Proteinen. In anderen Bakterien gibt es Nitritreduktasen, welche das durch die Nitratatmung entstehende Nitrit zu Ammonium oder NO reduzieren, wobei letzteres durch eine NO-Reduktase weiter zu Distickstoffmonoxid (N_2O) reduziert wird. Bei der Nitritammonifikation werden respiratorische Nitritreduktasen, welche in der Membran lokalisiert sind und einen Beitrag zum Protonengradienten leisten, von assimilatorischen Nitritreduktasen, welche im Cytosol Ammonium zur Stickstoffassimilation bilden, unterschieden.

4 ZIELE DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Manipulationen der Atmungskette von *C. glutamicum* durchgeführt werden und die daraus erhaltenen Stämme genauer untersucht werden. Zum einen sollte der Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex überexprimiert werden. Ziel war eine Verbesserung der oxidativen Phosphorylierung, wenn der Elektronenfluss vermehrt über diesen Zweig der Atmungskette fließt. Hierzu sollten die Promotoren der Gene, welche für die Untereinheiten des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes kodieren, chromosomal gegen den Promotor des *tuf*-Gens, welches den Elongationsfaktor Tu kodiert, ausgetauscht werden. Der Promotor P_{tuf} wurde bereits erfolgreich zur Überproduktion von Enzymen eingesetzt (Litsanov *et al.*, 2012). Der erhaltene Stamm sollte charakterisiert werden. Die Überproduktion des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes sollte auch in einem Lysin-Produktionsstamm erfolgen. Hier sollte untersucht werden, ob eine eventuell verbesserte oxidative Phosphorylierung zu einer besseren Lysin-Ausbeute führen kann.

Des Weiteren sollte die endogene F_1F_0 -ATP-Synthase in *C. glutamicum* überexprimiert werden, um möglicherweise die Bilanz der oxidativen Phosphorylierung zu verbessern. Hierzu sollte ebenfalls der Promotor des Operons *atpBEFHAGDC* gegen P_{tuf} getauscht und der erhaltene Stamm untersucht werden.

Da *C. glutamicum* während der biotechnologischen Produktionsprozesse in den bis zu 500 m³ großen Fermentern bei hohen Zelldichten mikroaeroben Bedingungen ausgesetzt ist, könnte es sein, dass dies zu geringeren Produktausbeuten führt. Da die endogene Cytochrom-*bd*-Oxidase zwar eine hohe Sauerstoffaffinität besitzt, energetisch aber nicht sehr effizient ist, sollte sie gegen eine Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *Bradyrhizobium japonicum* getauscht werden. *B. japonicum* ist ein Gram-negatives Bakterium aus der Familie der Rhizobiales. Es lebt u. a. als Symbiont in den Wurzelknöllchen der Sojabohne (*Glycine max*) (Kirchner, 1896), wo es Stickstofffixierung betreibt. *B. japonicum* lebt auch nicht symbiontisch im Boden und kann in Reinkultur kultiviert werden. In der Symbiose lebt das Bakterium in einem speziellen Organell, dem Symbiosom, welches aus den Bacteroiden, dem peribacteroiden Raum und der peribacteroiden Membran, welche pflanzlichen Ursprungs ist, besteht (Roth *et al.*, 1988). Die Nitrogenase zur Stickstofffixierung ist sehr sauerstoffempfindlich (Kuzma *et al.*, 1993). Daher wird die Konzentration von freiem Sauerstoff in den Symbiosomen gering gehalten. Dies geschieht zum einen durch die Bindung an Leghämoglobin, zum anderen bildet die Membran des Symbiosoms eine Sauerstoffdiffusionsbarriere. Die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen machen eine hochaffine Oxidase wie die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase nötig (Preisig *et al.*, 1993; Preisig *et al.*, 1996b; Zufferey *et al.*, 1996), welche einen sehr niedrigen K_m -Wert für Sauerstoff hat (7 nM), und nur unter mikroaeroben Bedingungen exprimiert wird (Preisig *et al.*, 1993). Es wird spekuliert, dass diese Oxidase ebenfalls dazu dient, die Konzentration von freiem Sauerstoff

ZIELE DER ARBEIT

in den Bacteroiden gering zu halten, um die Nitrogenase zu schützen. Die Analysen der Genomsequenz von *B. japonicum* ergaben, dass es insgesamt acht terminale Oxidasen besitzt (Kaneko *et al.*, 2002). Außer der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase hatte bisher keine der untersuchten Oxidasen einen Einfluss auf die Energiegewinnung während der Symbiose (Arslan, 2001; Bott *et al.*, 1990; Bott *et al.*, 1992; Buhler *et al.*, 2010; Göttfert *et al.*, 2004; Surpin *et al.*, 1994; Surpin *et al.*, 1996). Die Energie für die Stickstofffixierung wird durch oxidative Phosphorylierung bereitgestellt (Bergersen, 1982). Hierfür ist eine energetisch effiziente terminale Oxidase notwendig. Die Elektronenübertragung zur Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase geschieht über einen Cytochrom-*bc*₁-Komplex (Preisig *et al.*, 1993), sodass das H⁺/e⁻-Verhältnis drei beträgt. Aktuelle Untersuchungen zur Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *Rhodobacter sphaeroides* bestätigten das H⁺/e⁻-Verhältnis von drei für die Gesamtreaktion. Zusätzlich konnte der aktive Transport von einem Proton pro Elektron über die *cbb*₃-Oxidase bestätigt werden (Rauhamaki *et al.*, 2012). Die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase besteht aus drei katalytischen Untereinheiten, FixN, FixO und FixP. Sie werden in einem Operon kodiert, in welchem auch *fixQ* liegt (Preisig *et al.*, 1996b; Zufferey *et al.*, 1996). FixQ konnte bisher nicht im Komplex mit der Oxidase nachgewiesen werden, es ist auch nicht essentiell für die Bildung der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase (Zufferey *et al.*, 1996). FixP enthält zwei Häm *c*, welche die Elektronen vom Cytochrom-*bc*₁-Komplex aufnehmen und auf das *c*-Typ-Cytochrom FixO weiterleiten. Die größte Untereinheit FixN enthält ein Niedrigpotenzial-Häm-*b* und ein Hochpotenzial-Häm-*b*, sowie ein Cu_B, an welchem die Reaktion mit Sauerstoff stattfindet. Durch FixN werden auch die Protonen aus dem Zytoplasma nach außen gepumpt (Sharma *et al.*, 2012). Für eine funktionelle Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase in *B. japonicum* sind neben den Genen für die Oxidase selbst (*fixNOQP*) auch noch akzessorische Proteine essentiell, welche an der Cofaktorbereitstellung und Assemblierung der Oxidase beteiligt sind (kodiert im Operon *fixGHIS*, vgl. Abbildung 4-1) (Preisig *et al.*, 1996a). Alle diese Proteine sind membranassoziiert. FixG ist eine membrangebundene Oxidoreduktase (bakterielles Ferredoxin), welche vermutlich Kupfer in den korrekten Oxidationszustand (Cu²⁺) bringt. FixI hat hohe Sequenzähnlichkeit mit einer Kupfer transportierenden P-Typ-ATPase (CopA aus *R. sphaeroides*). Die genauen Funktionen von FixH und FixS von *B. japonicum* sind noch unbekannt, jedoch konnte in *Rhodobacter capsulatus* gezeigt werden, dass das FixH-Homolog CcoH wahrscheinlich den Oxidasekomplex CcoNOP stabilisiert (Pawlik *et al.*, 2010). CcoS ist in *R. capsulatus* essentiell für die Bindung der Cofaktoren an die Oxidase (Koch *et al.*, 2000). Genaue Mechanismen sind jedoch unbekannt.

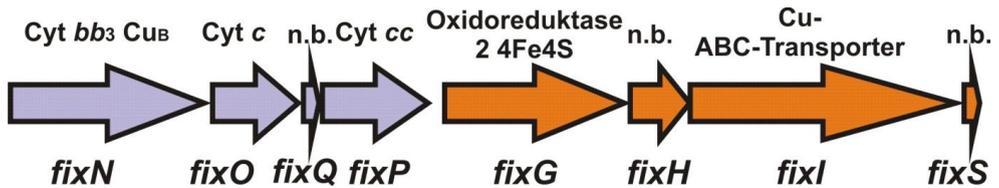


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Genlokalisierung der Operons *fixNOQP* und *fixGHIS* aus *B. japonicum*. Die Untereinheiten der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase werden vom Operon *fixNOQP* kodiert (lila) und die akzessorischen Proteine von *fixGHIS* (orange). Über den Pfeilen sind die Cofaktoren oder die putative Funktion der Proteine dargestellt (n.b. = nicht bekannt, Cyt = Cytochrom).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die anaerobe Nitratatmung von *C. glutamicum* zu verbessern. Wie bereits erwähnt besitzt *C. glutamicum* das Potential anaerob durch Nitratatmung zu wachsen. Bei diesem Prozess wird Nitrit gebildet, welches im Medium akkumuliert, da *C. glutamicum* keine Nitritreduktase besitzt. Zur Verbesserung der anaeroben Nitratatmung und zur Nutzung von Nitrat als Stickstoffquelle, sollten heterologe Nitritreduktasen in *C. glutamicum* exprimiert werden. Modelle der Nitritreduktasen sind in Abbildung 4-2 A dargestellt. Ein Beispiel für eine respiratorische Nitritreduktase ist NrfHA aus *Wolinella succinogenes*. *W. succinogenes* ist ein Gram-negatives ϵ -Proteobacterium, welches aus dem Pansen von Rindern isoliert wurde (Wolin *et al.*, 1961). In seinem natürlichen Habitat, dem Pansen, lebt *W. succinogenes* anaerob mittels Fumaratatmung (Kroger *et al.*, 2002) und es besitzt eine Nitratatmungskette. Eine Nitratreduktase vom Nap-Typ katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit (Kern *et al.*, 2007). Das entstehende Nitrit wird anschließend von der respiratorischen Cytochrom-*c*-Nitritreduktase NrfHA zu Ammonium reduziert (Simon *et al.*, 2000). Hierbei werden sechs Elektronen von Menachinol von der Membranuntereinheit NrfH aufgenommen und zur periplasmatischen Untereinheit NrfA weitergeleitet. NrfA katalysiert die sechs-Elektronen-Reduktion von Nitrit zu Ammonium unter der Bildung von Wasser (Bokranz *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 2000). Da durch die Nitritreduktase ein Protonengradient über der Membran aufgebaut wird und die Elektronen von Menachinol genutzt werden, spricht man von einer respiratorischen Nitritreduktase. Die Struktur der Nitritreduktase Nrf von *Desulfovibrio vulgaris* wurde 2008 gelöst (Rodrigues *et al.*, 2008). Es zeigte sich, dass die Nitritreduktase als NrfH₂A₄ Komplex vorliegt. Die Nitritreduktase von *W. succinogenes* wird von dem Operon *nrfHAIJ* kodiert, das neben *nrfH* und *nrfA* auch noch eine Häm-Lyase (NrfI) sowie ein Protein bisher unbekannter Funktion (NrfJ) kodiert, welches für eine funktionelle Expression der Nitritreduktase nicht essentiell ist (Simon *et al.*, 2000).

Die Nitritreduktase NirBD aus *Mycobacterium smegmatis* ist ein Beispiel für eine assimilatorische Nitritreduktase (Amon *et al.*, 2009). NirBD-Typ-Nitritreduktasen tragen einen Sirohäm-Cofaktor und sind im Cytosol lokalisiert. Dort katalysieren sie die NAD(P)H-

ZIELE DER ARBEIT

abhängige Reduktion von Nitrit zu Ammonium. Dies dient der Stickstoffassimilation (Lin & Stewart, 1998). In *M. smegmatis* ist die Nitritreduktase noch nicht gut untersucht. Die *nirBD*-Gene für die Untereinheiten der Nitritreduktase und das Gen *nark3* für einen putativen Nitritexporter wurden identifiziert (Amon *et al.*, 2009), jedoch wurden noch keine biochemischen Analysen der Enzyme durchgeführt. Die Nitritreduktase NirBD aus *M. smegmatis* kann heterolog in *C. glutamicum* exprimiert werden (Dr. N. Rehm und Prof. Dr. A. Burkovski, Universität Erlangen-Nürnberg, unveröffentlichte Daten). Dies ermöglicht *C. glutamicum* ein Wachstum mit Nitrit als einziger Stickstoffquelle unter aeroben Bedingungen. Die gleichzeitige Expression des Nitritexporters NarK3 und die Deletion des Regulators ArnR verbessert dieses Wachstum. Eine Erhöhung des pH-Werts des Mediums beschleunigt das Wachstum noch weiter. Eine zufriedenstellende Erklärung für dieses Verhalten konnte bisher nicht geliefert werden.

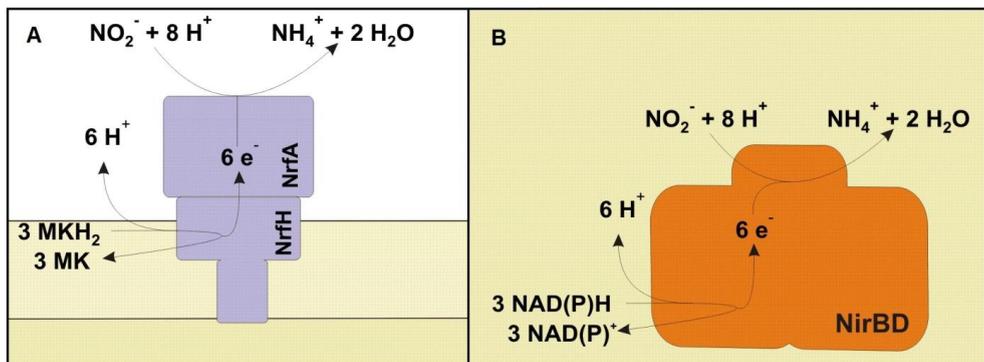


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der respiratorischen Nitritreduktase NrfHA aus *W. succinogenes* (A) und der assimilatorischen Nitritreduktase NirBD aus *M. smegmatis* (B). Pfeile repräsentieren die Transportwege von Elektronen, Protonen und Substraten. Beide Nitritreduktasen katalysieren die 6-Elektronen-Reduktion von Nitrit zu Ammonium. NrfHA nutzt als Elektronendonator Menachinol (MKH_2), NirBD nutzt NAD(P)H .

Zum besseren Verständnis der Einflüsse von Nitrat und Nitrit auf *C. glutamicum* sollten Untersuchungen zur Nitrat- und Nitrissensitivität durchgeführt werden. Dazu sollte der Einfluss auf das aerobe Wachstum sowie die globale Genexpression untersucht werden. Hierbei sollten möglichst Nitrit-detoxifizierende Proteine identifiziert und charakterisiert werden.

5 MATERIAL UND METHODEN

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland bezogen. Mikrobiologische Mediumkomponenten wurden von Becton, Dickinson and Company, NJ, USA bezogen.

5.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 5-1 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 5-1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme, deren Genotyp bzw. relevante Charakteristika und Herkunft bzw. Referenz

Stamm	Genotyp, Charakteristika	Herkunft bzw. Referenz
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> DSM 30131	Wildtyp	(Jordan, 1982; Kirchner, 1896)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Wildtyp, Biotin-auxotroph	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> Δ <i>cydAB</i>	Δ <i>cydAB</i>	(Kabus <i>et al.</i> , 2007)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1945	Lysin-Produktionsstamm	Evonik Industries AG, Halle-Künsebeck, Deutschland diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1945 SC(I)	Lysin-Produktionsstamm $\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1945 SC(II)	Lysin-Produktionsstamm $\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaE}::P_{tuf}$	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1945 SC ^{plus}	Lysin-Produktionsstamm $\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaE}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaC}::P_{tuf}$	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DOOR	Δ <i>cydAB</i> Δ <i>qcrCAB</i>	(Koch-Körfges, 2011)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SC(I)	$\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SC(II)	$\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaE}::P_{tuf}$	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SC ^{plus}	$\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaE}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaC}::P_{tuf}$	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland Clontech Laboratories Inc., CA, USA
<i>E. coli</i> K12	<i>endA1, hsdR17</i> (r _{K12} ⁻ , m _{K12} ⁺), <i>supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac F</i> [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacIq</i> Δ M15::Tn 10(tet ^R)]	Clontech Laboratories Inc., CA, USA
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	Wildtyp	(Tanner <i>et al.</i> , 1981; Wolin <i>et al.</i> , 1961)

5.2 Vektoren

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 5-2 dargestellten Vektoren verwendet. Deren Herstellung ist in 5.7.7.5 und 5.7.7.6 beschrieben.

Tabelle 5-2: In dieser Arbeit verwendete Vektoren, deren Bezeichnung, Funktion und Quellenangabe sind dargestellt

Bezeichnung	Genotyp, Funktion	Quelle
pEKEx2	Kan ^R , Vektor zur regulierten Genexpression, P _{tac} , lac ^R , pBL1 ori _{V_{C.g.}} , pUC18 ori _{V_{E.c.}}	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pEKEx2-fixNOQP	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Expression der Cytochrom- <i>cbb</i> ₃ -Oxidase aus <i>B. japonicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2-hmp	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Expression von <i>hmp</i> (cg3141)	diese Arbeit
pEKEx2-nrfHAIJ	Kan ^R , pEKEx2-Derivat zur Expression der Nitritreduktase NrfHAIJ aus <i>W. succinogenes</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB	Kan ^R , Vektor für die Herstellung von Deletions- und Insertionsmutanten, PR4 <i>mob</i> , <i>B. subtilis sacB</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19mobsacBΔ <i>hmp</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zur Deletion des Gens <i>hmp</i> (cg3141)	diese Arbeit
pK19mobsacBΔP _{atpB} ::P _{tuf}	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum Austausch des Promotors von <i>atpB</i> gegen P _{tuf}	diese Arbeit
pK19mobsacBΔP _{ctaC} ::P _{tuf}	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum Austausch des Promotors von <i>ctaC</i> gegen P _{tuf}	diese Arbeit
pK19mobsacBΔP _{ctaD} ::P _{tuf}	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum Austausch des Promotors von <i>ctaD</i> gegen P _{tuf}	diese Arbeit
pK19mobsacBΔP _{ctaE} ::P _{tuf}	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat zum Austausch des Promotors von <i>ctaE</i> gegen P _{tuf}	diese Arbeit
pVWEx2	Tet ^R , Expressionsvektor, P _{tac} , lac ^R , Ori _{C.g.} , pHM1519	(Wendisch, 1997)
pVWEx2-fixGHIS	Tet ^R , pVWEx2-Derivat zur Expression der akzessorischen Proteine FixGHIS zum Zusammenbau der Cytochrom- <i>cbb</i> ₃ -Oxidase aus <i>B. japonicum</i>	diese Arbeit
pVWEx2-fixG(Q67STOP)fixHIS	Tet ^R , pVWEx2-fixGHIS-Derivat Suppressormutation in <i>fixG</i>	diese Arbeit
pZ8-1	Kan ^R , Expressionsvektor, P _{tac} , Ori _{C.g.} , pHM1519	(Dusch <i>et al.</i> , 1999)
pZ-nirBD-narK3	Kan ^R , pZ8-1-Derivat zur Expression der Nitritreduktase NirBD und des Nitritexporters NarK3 aus <i>M. smegmatis</i>	Dr. N. Rehm, Prof. Dr. A. Burkovski, Universität Erlangen-Nürnberg, unveröffentlicht

5.3 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Food GmbH, Hamburg, Deutschland hergestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5-3 dargestellt.

Tabelle 5-3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Dargestellt sind die Bezeichnung, die Sequenz und die Funktion. Restriktionsendonukleaseschnittstellen sind kursiv dargestellt, andere funktionale Bereiche unterstrichen oder fett.

Bezeichnung	5' → 3' Sequenz	Funktion
P_{tuf} Amplifikation		
P _{tuf_for}	CCACAGGGTAGCTGGTAGTTTG	Amplifikation P _{tuf}
P _{tuf_GTG_rev}	CACTGTATGTCCTCCTGGACTTC	Amplifikation P _{tuf} mit GTG-Start-Codon
P _{tuf_ATG_rev}	CATTGTATGTCCTCCTGGACTTCG	Amplifikation P _{tuf} mit ATG-Start-Codon
Herstellung von SC^{plus}		
ctaD_F1_for	AAATCTAGACGAGGATGATGACTGGGACT TC	Flanke 1, XbaI
ctaD_F1_rev	<u>GATTTTCAA</u> ACTACCAGCTACCCTGTGGC ATTCGCCAGGAAGCCCTAC	Flanke 1, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
ctaD_F2_for	<u>CACGAAGTCCAGGAGGACATACAATGACC</u> GCTGTGGCGCCTAGGG	Flanke 2, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
ctaD_F2_rev	TTTGAATTCCAATTGGAGTTCCGTACAGCA G	Flanke 2, EcoRI
ctaD_P _{tuf_Kol1}	TTCTTCTCCGGCTCCGGTTC	Überprüfung des Austausches
ctaD_P _{tuf_Kol2}	GAAGCAACGGAGCCAATACC	Überprüfung des Austausches
ctaE_F1_for	AAATCTAGACTATCCAACAGGGCAGACCCG	Flanke 1, XbaI
ctaE_F1_rev	<u>GATTTTCAA</u> ACTACCAGCTACCCTGTGGC AGTTCCAATCTGCCCAAATC	Flanke 1, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
ctaE_F2_for	<u>CACCACGAAGTCCAGGAGGACATACAGTG</u> ACGAGCGCAGTTGGAAATAC	Flanke 2, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
ctaE_F2_rev	TTTGAATTCAAGTCACTGAGGAAGACACC AGAA	Flanke 2, EcoRI
ctaE_P _{tuf_Kol1}	GGCTGTCCGATAGGGTTGAG	Überprüfung des Austausches
ctaE_P _{tuf_Kol2}	ACAACGAAGGCCATAACACC	Überprüfung des Austausches
ctaC_F1_for	AAATCTAGATCCTCCTGAAATAAAAGGCG CC	Flanke 1, XbaI
ctaC_F1_rev	<u>GATTTTCAA</u> ACTACCAGCTACCCTGTGGG ATTGCCCTTGAAATCCCCAC	Flanke 1, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
ctaC_F2_for	<u>CACCACGAAGTCCAGGAGGACATACAGTG</u> GAACAGCAAATAAGCGTGG	Flanke 2, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
ctaC_F2_rev	TTTGAATTCCAGGCAAAGATGGCGGTGAG	Flanke 2, EcoRI
ctaC_P _{tuf_Kol1}	CAATATGCCAAGAAGGCCGCAC	Überprüfung des Austausches
ctaC_P _{tuf_Kol2}	GGTCGTTCTCTTGGTAATCC	Überprüfung des Austausches
qRT-PCR		
dh_RT_f	CATGCCTGATTACTTCGTTGGCTAC	
dh_RT_r	ATGTATTCCACGGTGTGGTTGAAG	
ctaC_RT_f	GTGAATTCCCTAAGCAGCTCCAGTA	
ctaC_RT_r	GTCCTGAGTTTGAACGGTGAAGAAG	
ctaD_RT_f	CTGGTCTGCAGTTCCTGTCTAATGA	
ctaD_RT_r	AGTGGCAGGACGTAGTTAGCAAAAC	

Fortsetzung Tabelle 5-3		
Bezeichnung	5' → 3' Sequenz	Funktion
qRT-PCR		
<i>ctaE_RT_f</i>	GATTACGGTCATTCTGGTGTCTTCC	
<i>ctaE_RT_r</i>	GAGGATAATCGTGACCAAGAACCAC	
<i>ctaF_RT_f</i>	GCTGTCATCTACATCTTCGCAACA	
<i>ctaF_RT_r</i>	GAAGTGAAGGTAGACACCCGAGCATAA	
<i>qcrB_RT_f</i>	CACGTTCTAATCATCCCAGCTATCC	
<i>qcrB_RT_r</i>	GATACCGATCACGTTGTCTCAGTG	
<i>tuf_RT_f</i>	CACCAAGGTTCTGGCTGACACTTAC	
<i>tuf_RT_r</i>	TAGTGCGCTTTTCAGTCTGGTACT	
Herstellung von P_{tuf}F₁F₀		
<i>atpB_F1_for</i>	AAACTGCAGGCACAGTAGTCGGACATTAG	Flanke 1, PstI
<i>atpB_F1_rev</i>	<u>GATTTTCAA</u> ACTACCAGCTACCCTGTGGC TAACAGGTGAATTCGTCTTTTATCC	Flanke 1, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
<i>atpB_F2_for</i>	<u>CACGAAGTCC</u> AGGAGGACATACAATGTGC GACGGAGTCCCGTAG	Flanke 2, <u>homologer Bereich</u> mit P _{tuf}
<i>atpB_F2_rev</i>	TTTGGATCCACAACGACTGCCGTCATAAG	Flanke 2, BamHI
<i>atpB_P_{tuf}_Kol1</i>	TCATCGTCTTGCAGTCATC	Überprüfung des Austausches
<i>atpB_P_{tuf}_Kol2</i>	CTGCCATCAAGATGGTTACG	Überprüfung des Austausches
Herstellung pEKEx2-fixNOQP		
<i>fixN_IF_Ex_f</i>	<u>CTAGAGGATCCCCG</u> GATAAAGGAGATATA GATATGAGCCAGCCCTCCATCTCCAA	Insert mit <u>homologem Bereich</u> zu pEKEx2 (KpnI) für InFusion, RBS
<i>fixN_IF_r</i>	<u>TGTCGAGAACGACAT</u> TGCTTTAGCTCCT	Insert mit <u>homologem Bereich</u> zu pEKEx2 (KpnI) für InFusion
<i>pEKEx-f1</i>	CATCGGCTCGTATAATGTGTGG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixNOQP-f1</i>	CCTCGTCGGCCTCATCATCG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixNOQP-f2</i>	CTGGGACAAGCTGCGCACC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixNOQP-f3</i>	GTCGAGCGCTACGGCCACTTC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixNOQP-f4</i>	CACCATCGTCTGGGCGATCG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixNOQP-f5</i>	GGATCCCTCCACCATCAAGGC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
Herstellung von pVWEx2-fixGHIS		
<i>fixG_IF_Ex_f</i>	<u>CCAAGCTTGCATGCC</u> ATAAAGGAGATATA GATATGAACAAGACCGTGAACCCGAAAGA	Insert mit <u>homologem Bereich</u> zu pVWEx2 (PstI) für InFusion, RBS
<i>fixS_IF_Ex_r</i>	<u>CCTCTAGAGT</u> CGACCCTAGCGTTGACCG CGCCTT	Insert mit <u>homologem Bereich</u> zu pVWEx2 (PstI) für InFusion
<i>fixGHIS-f1</i>	GGATCTGGTGCGGCTATCTC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixGHIS-f2</i>	GTCGCGGTCAAGCTCAGC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixGHIS-f3</i>	CGTATTCCTGTGCGCAACC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixGHIS-f4</i>	CAGTCTGGCGACATCGTGC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>fixGHIS-f5</i>	CATCGTGGCCTTCAGCAAGGG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
Herstellung von pEKEx2-nrfHAIJ		
<i>nrfH_BamHI_f</i>	ATAGGATCCATAAAGGAGATATAGATGTG AATAAAAAGTAAATTCCTAGTGTATAGCTCG CT	BamHI und RBS
<i>nrfJ_EcoRI_r</i>	ATAGAATTATACTATTTTTGGAAGGTGGAT TCCTCTAGGA	EcoRI
<i>nrfHAIJ-f1</i>	CGAAGATGGGGCGAGAAGAG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>nrfHAIJ-f2</i>	CGAGGCCTCAGTGCAGCAG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>nrfHAIJ-f3</i>	GTGGATATGGAAGCCTTCATCGC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>nrfHAIJ-f4</i>	GAGACCCTTTGGCTAGATGATC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>nrfHAIJ-f5</i>	CCATCTCACTCCTGCCTACC	Oligonukleotid zu Sequenzierung

Fortsetzung Tabelle 5-3		
Bezeichnung	5' → 3' Sequenz	Funktion
Herstellung von pEKEx2-nrfHAIJ		
<i>nrfHAIJ-f6</i>	CGTCATCACCGCCAGTTACG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
<i>nrfHAIJ-f7</i>	CATCAAGGAGCGAGTCGATCGC	Oligonukleotid zu Sequenzierung
Herstellung von Δhmp		
Δ_hmp_1	TATACCCGGGGCTGTGTAGGTTTGTTCG GAGC	Flanke 1, XmaI
Δ_hmp_2	CCCATCCACTAAACTTAAACACTGGGTG GAAACGATCAAGGGG	Flanke 1, <u>homologer Bereich</u> zu Flanke 2
Δ_hmp_3	TGTTTAAAGTTTAGTGGATGGGTTTCGAGC TCTTCGCACCAAACGA	Flanke 2, <u>homologer Bereich</u> zu Flanke 1
Δ_hmp_4	TATACCCGGGACCGAGTGGGGAATGCC GATTC	Flanke 2, XmaI
<i>hmp_out_fw</i>	TTGCGGTGGAGTTCGGCAACTTC	Überprüfung der Deletion
<i>hmp_out_rv</i>	CCCTGATGCGCGATTATTACGAC	Überprüfung der Deletion
pK19-f	CACTTTATGCTTCCGGCTCG	Oligonukleotid zu Sequenzierung
Herstellung von pEKEx2-hmp		
PstI_RBS_ <i>hmp_f</i> w	TATACTGCAGAAGGAGATACCCCTTGAT CGTTTCCACCCA	PstI und RBS
BamHI_ <i>hmp_rv</i>	TATAGGATCCTTAGGAAATCAGCCAGTC GTTTGG	BamHI

5.4 Lösungen

Außer denen in der entsprechenden Methode angegebenen, wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 5-4 angegebenen Lösungen verwendet. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt.

Tabelle 5-4: In dieser Arbeit verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
für Medien	
Biotin	200 mg l ⁻¹ (sterilfiltriert)
Calciumchlorid	10 g l ⁻¹ (sterilfiltriert)
Glucose	550 g l ⁻¹ Glucose-Monohydrat (50 % (w/v)) (autoklaviert)
IPTG	1 M und 100 mM, sterilfiltriert
Kanamycin	50 mg ml ⁻¹ (sterilfiltriert)
Tetracyclin	10 mg ml ⁻¹ in Ethanol abs., sterilfiltriert
für biochemische und molekularbiologische Methoden	
SDS-Lösung	10 % (w/v)
6 x SDS-Ladepuffer	350 mM Tris-HCl, 10 % (w/v) SDS, 6 % (w/v) DTT, 30 % (v/v) Glycerin, 0,175 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Nicht reduzierender 6x SDS-Ladepuffer	350 mM Tris-HCl, 10 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerin, pH 6,8
10 x SDS Laufpuffer	250 mM Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
50 x TAE-Puffer	37,2 g l ⁻¹ Na ₂ EDTA, 242 g l ⁻¹ Tris-HCl, mit Eisessig auf pH 8,5 eingestellt
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
Tris-HCl	100 mM Tris-HCl pH 8,8

5.5 Mikrobiologische Methoden

5.5.1 Kultivierung von Bakterien

5.5.1.1 Nährmedien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien verwendet, welche mit bidest. Wasser (Milli-Q-Anlage, Millipore Corporation, MA, USA) angesetzt wurden.

BHI-Medium: 37 g l⁻¹ BHI (Brain-Heart-Infusion)

BHIS-Medium: 37 g l⁻¹ BHI und 91 g l⁻¹ Sorbitol (separat autoklaviert)

CGXII-Medium: 20 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 5 g l⁻¹ Harnstoff, 1 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0,25 g l⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O, 10 mg l⁻¹ CaCl₂, 42 g l⁻¹ MOPS, pH 7 (wenn nicht anders angegeben mit KOH eingestellt) (Keilhauer *et al.*, 1993)

Spurensalzlösung: 10 g l⁻¹ FeSO₄ · 7 H₂O, 10 g l⁻¹ MnSO₄ · H₂O, 1 g l⁻¹ ZnSO₄ · 7 H₂O, 0,2 g l⁻¹ CuSO₄ · 5 H₂O, 20 mg l⁻¹ NiCl₂ · 6 H₂O, zum Lösen mit HCl angesäuert (pH 1)

Nach dem Autoklavieren wurden 1 ml l⁻¹ Protokatechusäure (30 g l⁻¹ in 1 M KOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml l⁻¹ Spurensalzlösung, 0,2 mg l⁻¹ Biotin und 40 g l⁻¹ Glucose zugegeben. Gegebenenfalls wurden nach dem Autoklavieren Kaliumnitrat, Kaliumnitrit, Natriumnitroprussid oder Kaliumchlorid sterilfiltriert zugegeben. Für anaerobe Kultivierungen wurden zu 50 ml Medium 300 µl Cystein (60 g l⁻¹) zur Reduktion zugegeben.

DSMZ Medium #98: 1 g l⁻¹ Hefeextrakt, 10 g l⁻¹ Mannitol, 200 ml Erdextrakt, pH 7

Erdextrakt: 400 g l⁻¹ Gartenerde, luftgetrocknet, 1 g l⁻¹ Na₂CO₃, für eine Stunde autoklaviert, abzentrifugiert und pH-Wert vom Überstand auf 7,2 eingestellt

DSMZ Medium #157: 1 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 5 g l⁻¹ K₂HPO₄, 3 g l⁻¹ Fumarsäure, 3 g l⁻¹ Natriumfumarat, 1 g l⁻¹ Hefeextrakt, 0,2 g l⁻¹ MgCl₂ · 6 H₂O, 0,02 g l⁻¹ FeSO₄ · 7 H₂O, 1 mg l⁻¹ Resazurin, pH 7,0 bis 7,2

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 0,5 g l⁻¹ sterilem Natriumthioglycolat (unter N₂ autoklaviert).

LB-Medium: 10 g l⁻¹ Trypton, 5 g l⁻¹ Hefeextrakt, 10 g l⁻¹ NaCl (Bertani, 1958)

SOC-Medium: 20 g l⁻¹ Trypton, 5 g l⁻¹ Hefeextrakt, 0,6 g l⁻¹ NaCl, 0,2 g l⁻¹ KCl, nach dem Autoklavieren 1 g l⁻¹ MgCl₂ (sterilfiltriert) und 4 g l⁻¹ Glucose (separat autoklaviert) zugeben (Sambrook *et al.*, 1989).

Für Nährböden der entsprechenden Medien wurden 18 g l⁻¹ Agar-Agar zugesetzt. Wenn erforderlich wurde den Nährmedien Kanamycin zu einer Endkonzentration von 50 µg ml⁻¹ (*E. coli*) oder 25 µg ml⁻¹ (*C. glutamicum*) bzw. Tetracyclin (10 µg ml⁻¹ *E. coli* oder 3 µg ml⁻¹ *C. glutamicum*) zugesetzt.

5.5.1.2 Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde anhand der optischen Dichte (OD₆₀₀) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert (Medium oder Wasser, je nach Verdünnung) in einem UV-VIS Spektrophotometer UV-3101 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland). Bei einer Extinktion von 0,1 bis 0,4 gab es einen linearen Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Biomasse, lag die optische Dichte über 0,4, so wurden die Proben mit Wasser verdünnt. Die Umrechnung von OD₆₀₀ in Zelltrockenmasse (TZ) erfolgte mit folgendem Umrechnungsfaktor: OD₆₀₀ = 1 entspricht 0,25 g TZ l⁻¹ (Kabus *et al.*, 2007).

5.5.1.3 Kultivierung von *Bradyrhizobium japonicum*

Bradyrhizobium japonicum wurde von der DSMZ (Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) als gefriergetrocknete Probe erhalten und nach Herstellerangaben wiederbelebt. Hierzu wurde die Probe in 0,5 ml des DSMZ-Mediums #98 resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die Probe wurde anschließend zu 5 ml des Mediums #98 gegeben, je eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung angefertigt und bei 26 °C und 170 Upm für 5 Tage kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 g.

5.5.1.4 Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum wurde bei 30 °C kultiviert. Hierzu wurde entweder BHI-Medium, BHIS-Medium oder CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose (222 mM) verwendet. Die erste Vorkultivierung erfolgte für ca. 8 h in 5 ml BHI-Medium mit 4 % (w/v) Glucose bei 170 Upm, welche mit einer Kolonie von einer frischen BHI-Agarplatte, die nicht älter als vier Tage war, inokuliert wurde. Eine zweite Vorkultur wurde im Zielmedium der Hauptkultur durchgeführt. Es wurden 20 ml Medium in 500 ml Schikanekolben mit 1 ml der ersten Vorkultur beimpft und über Nacht (ca. 16 h) bei 130 Upm kultiviert. Die Beschreibung der verschiedenen Hauptkulturen (HK) folgt.

5.5.1.5 Aerobe Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* im Schüttelkolben

Die Hauptkultur bestand aus 50 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen und einem Septum für eine schnelle Probenentnahme und wurde zweifach mit 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschenen Zellen der zweiten Vorkultur auf eine Start-OD₆₀₀ von 1,0 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 130 Upm. Zur Messung des Gelöstsauerstoffs wurde der „Shake Flask Reader“ (SFR, PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) verwendet. Die Messung basiert auf einem im Schüttelkolben angebrachten Sensorspot, welcher einen Fluorophor enthält. Das durch Sauerstoff verursachte dynamische Fluoreszenzquenching wird ausgenutzt, um das Fluoreszenzsignal mit der Konzentration des Gelöstsauerstoffs zu korrelieren (Wittmann *et al.*, 2003). Hierbei ist das Fluoreszenzsignal des Fluorophors bei geringen Sauerstoffkonzentrationen am höchsten.

Für die Isolierung von Membranen von *C. glutamicum* wurde der entsprechende Stamm in 500 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen bei 30 °C und 130 Upm kultiviert. Für die Isolierung von Membranproteinen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden 2,5 l CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in einem 5 l Kolben verwendet, welcher bei 100 Upm geschwenkt wurde.

5.5.1.6 Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* im BioLector

Die Kultivierung im BioLector (m2p-labs GmbH, Braunschweig, Deutschland) (Kensy *et al.*, 2009) erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose oder 2 % (w/v) Acetat als Kohlenstoffquelle, wobei hier der pH-Wert auf 6,3 eingestellt wurde. Die Kulturen wurden zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte im 800 µl-Maßstab in speziellen 48-well Mikrotiterplatten mit sechs seitlichen Schikanen, den sogenannten „Flowerplates“. Diese waren mit Optoden für die online-Messung von pH und pO₂ mittels dynamischen Fluoreszenzquenchings ausgestattet. Die Biomasse wurde anhand der Rückstreuung (engl. *backscatter*) bei den Verstärkungsfaktoren (engl. *gain*) 12 und 20 verfolgt. Die Schüttelfrequenz war 1200 Upm bei einem Schütteldurchmesser von 3 mm.

5.5.1.7 Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* im Multifors-Bioreaktorsystem

Die Fermentation erfolgte in einem Multifors Fermentersystem der Firma Infors AG, Basel, Schweiz. Jeder Fermenter enthielt 700 ml CGXII-Minimalmedium ohne MOPS mit 4 % (w/v) Glucose. Der pH-Wert wurde konstant bei 7 eingestellt und mit 2 M KOH und 2 M HCl nachgeregelt. Die Kulturen wurden mit 0,4 – 0,9 l min⁻¹ Luft begast. Die Rührerdrehzahl

wurde zwischen 100 und 800 Upm geregelt. Eine Regelkaskade, welche zuerst den Luftstrom und anschließend die Rührerdrehzahl erhöhte, hielt den Gelöstsauerstoff bei konstant 10 % bzw. 1 % Luftsättigung. Die Probennahme erfolgte durch ein Steigrohr.

5.5.1.8 Anaerobe Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* in Serumflaschen

Anaerobe Kultivierungen wurden in 50 ml GCXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose durchgeführt. Die Serumflaschen mit dem Medium wurden vor der Inokulation mindestens 30 min mit Stickstoff über einen Sterilfilter begast. Kurz vor der Zugabe der Zellen wurde das Medium mit 300 µl einer sterilen 60 g l⁻¹ Cysteinlösung reduziert (Platzen *et al.*, 2013). Die Probennahme erfolgte unter konstanter Begasung mit sterilem Stickstoff.

5.5.1.9 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli Stämme wurden routinemäßig in 5 ml LB-Medium (Bertani, 1958) mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C und 170 Upm kultiviert. Zur Isolierung von Vektoren wurde eine Kultivierung über Nacht (ca. 16 h) durchgeführt. Für die Herstellung kompetenter Zellen und zur Regeneration nach einer Transformation wurde *E. coli* in SOC-Medium kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989).

5.5.1.10 Kultivierung von *Wolinella succinogenes*

Wolinella succinogenes wurde von der DSMZ als gefriergetrocknete Probe erhalten und nach Angaben des Herstellers wiederbelebt. Hierzu wurde die Probe unter Stickstoffbegasung mit 1 ml DSMZ Medium #157 resuspendiert und zu 5 ml des Medium gegeben. Hiervon wurden eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung hergestellt, jeweils in 2,5 ml Medium. Die Kulturen wurden mit Stickstoff begast, verschlossen und anschließend bei 37 °C und 60 Upm drei Tage lang inkubiert. Die Kulturen wurden als Inokulum für eine größere Kultur von 50 ml verwendet, welche weitere 24 h anaerob bei 37 °C und 60 Upm inkubiert wurde. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 g. Die Kultivierung auf #157-Agarplatten erfolgte im Anaerocult System der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.

5.5.1.11 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Zur Stammhaltung wurden *C. glutamicum* Stämme über Nacht in 5 ml BHI-Medium ggf. mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 30 °C und 170 Upm kultiviert. *E. coli* Stämme wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium ggf. mit dem entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C und 170 Upm kultiviert. *W. succinogenes* wurde anaerob in 50 ml DSMZ-Medium #157 bei

37 °C für 20 h kultiviert. *B. japonicum* wurde 5 Tage in 5 ml DSMZ-Medium #98 bei 26 °C und 170 Upm kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 1 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und in zwei Aliquots aufgeteilt, welche mit jeweils 0,5 ml sterilem Glycerin vermischt wurden. Bei *W. succinogenes* wurde die Probe mit sterilem Stickstoff begast. Die Lagerung erfolgte bei -78 °C.

5.6 Analytische Methoden

5.6.1 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (Mikroprozessor-pH-Meter 763 bzw. pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin) bestimmt. Dazu wurde das pH-Meter vor der Probenmessung wenn nötig mit Kalibrierlösungen pH 4 und pH 7 kalibriert.

5.6.2 Bestimmung der Nitritkonzentration

Die Nitritkonzentration aus zellfreien Kulturüberständen wurde mit einer Standard-Griess-Reaktion bestimmt (Green *et al.*, 1982; Griess, 1879). Hierzu wurden zu 1 ml mit Wasser verdünnter Probe 40 µl Griess-Reagenz gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion von Nitrit mit dem Griess-Reagenz bildet einen Azofarbstoff, welcher photometrisch bei 540 nm vermessen werden kann. Eine Kalibriergerade wurde mit 0,4 µM bis 5,2 µM Nitritlösung aufgenommen. In diesem Bereich war der Zusammenhang zwischen Nitritkonzentration und Absorption linear. Das Griess-Reagenz bestand aus einer 1:1-Mischung von 0,1 % (w/v) N-(1-naphthyl)ethylendiamin in Wasser und 1 % (w/v) Sulfanilamid in 5 % (w/v) H₃PO₄. Die Mischung wurde frisch hergestellt und die einzelnen Bestandteile im Dunkeln aufbewahrt.

5.6.3 Bestimmung organischer Säuren und Glucosekonzentration mittels HPLC

Die Identifizierung und quantitative Bestimmung von Glucose und organischen Säuren in Kulturüberständen erfolgte durch Ionen-Ausschlusschromatographie an einer „Organic Acid Resin“-Kationenaustauschersäule (300 x 8 mM; CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) durch isokratische Elution innerhalb von 40 min mit 100 mM H₂SO₄ bei einer Flussrate von 0,4 ml min⁻¹ und einer Temperatur von 40 °C mit Hilfe eines Agilent 1100 HPLC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn). Die eluierten organischen Säuren wurden mit einem Diodenarray-Detektor (DAD G1315B) bei einer Wellenlänge von 215 nm und Glucose durch einen Refraction Index (RI)-Detektor (Agilent 1200 HPLC Systems) detektiert (Koch-Körfges *et al.*, 2012). Die Quantifizierung der organischen Säuren sowie der Glucose erfolgte durch Vergleich der Peakflächen mit zuvor erstellten Kalibriergeraden.

5.6.4 Bestimmung von Aminosäuren mittels uHPLC

Die Identifizierung und quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand erfolgte unter Verwendung eines Agilent Technologies uHPLC Infinity 1290 Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einer ZORBAX Eclipse AAA 4,6 x 75 mM, 3,5 µm Säule. Die Aminosäure-Bestimmung erfolgte nach Derivatisierung der Probe mit α -Phthaldialdehyd (OPA) nach (Lindroth & Mopper, 1979). Dies erfolgte durch eine automatisierte Derivatisierung, bei der die zu analysierende Probe mit OPA/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt und eine Minute bei RT im Probenraum inkubiert wurde. Die Derivatisierung beruht auf der Reaktion der primären Aminogruppe mit OPA und 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert (Jones & Gilligan, 1983). Die Substanzen wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität innerhalb von 11,5 min mit einem Gradienten aus 10 mM Na_2HPO_4 und 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8,2 als polarer Phase und Methanol als unpolare Phase eluiert. Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Anregung bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert (Binder *et al.*, 2012). Die Identifizierung von Aminosäuren erfolgte anhand ihrer Retentionszeit. Die Aminosäurekonzentration in der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einer Kalibriergeraden bestimmt.

5.7 Molekularbiologische Methoden

5.7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

5.7.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*, *B. japonicum* und *W. succinogenes* wurden Zellen vollständig sedimentiert, in 1 ml TES-Puffer pH 8 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 800 µl TES-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 10 µl einer 10 %igen (w/v) SDS-Lösung inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und die Proben kräftig geschüttelt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 16100 g. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phenolextraktion insgesamt 5-mal durchgeführt. 700 µl der wässrigen Phase wurden mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und 20 min bei -20 °C die DNA gefällt. Die DNA wurde für 20 min bei 16100 g abzentrifugiert und das Pellet mit Ethanol gewaschen. Nach Abnehmen des Ethanols wurde das DNA-Pellet 10 min bei 60 °C getrocknet und in 100 µl EB-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) resuspendiert.

5.7.1.2 Isolierung von Vektor-DNA

Die Isolierung von Vektoren aus *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zellen einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation geerntet und resuspendiert. Zusätzlich wurde zu *C. glutamicum* Zellen eine Spatelspitze Lysozym gegeben und die Zellen bei 37 °C und 300 Upm für eine Stunde geschwenkt um die Mureinschicht abzubauen (Schwarzer & Pühler, 1991). Anschließend erfolgte die alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) der Zellen und das Ausfällen der Proteine und der chromosomalen DNA. Die Plasmid-DNA wurde auf einer Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und anschließend in einem Puffer zur Lagerung oder mit Wasser eluiert. Kurzzeitige Lagerung erfolgte bei 4 °C, längere Lagerung bei -20 °C.

5.7.1.3 Isolierung von RNA

Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Methode beruht auf einer Lyse der Bakterien in Gegenwart von Guanidinisothiocyanat und β -Mercaptoethanol bzw. DTT, die zu einer sofortigen Inaktivierung der RNasen führt und somit die Isolierung intakter RNA gewährleistet. Anschließend wird die RNA in Gegenwart von Ethanol und einer speziellen, hochkonzentrierten Salz-Puffer-Lösung (RNeasy, Qiagen) an eine Silica-Gel-Membran adsorbiert, die selektiv einzelsträngige RNA-Moleküle ab einer Größe von 200 Basen bindet.

Ca. 20 ml einer *C. glutamicum*-Kultur (OD_{600} zwischen 5 und 6) wurden in -20 °C vorgekühlte, mit 10 g Eis beladene 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und mittels Zentrifugation geerntet (5 min, 5500 g, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden sofort in 350 μ l eiskaltem RLT-Puffer (RNeasy, Qiagen) mit 4 % (w/v) DTT resuspendiert und in Gegenwart von 250 mg Zirkonium/Silica-Perlen (\varnothing 0,1 mM, ROTH) 15 s und dann nochmals 30 s in einem Amalgamator (Silamat, Vivadent) mechanisch aufgeschlossen. Ab hier fanden alle Schritte bei Raumtemperatur statt. Nach Abtrennen von Zelltrümmern und intakten Zellen durch Zentrifugation (2 min, 16100 g) wurde der Überstand mit 250 μ l Ethanol abs. (eiskalt) vermischt, auf die RNeasy-Säulchen aufgetragen und 15 s bei 11200 g zentrifugiert. Die Membran wurde mit 350 μ l RW1-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) gewaschen (15 s, 11200 g) und anschließend wurde ein Mix aus 10 μ l DNase I (RNase-free DNase-Set, Qiagen) und 70 μ l RDD-Puffer (RNase-free DNase-Set, Qiagen) auf die Membran gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 350 μ l RW1-Puffer wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und mit 500 μ l RPE Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) gewaschen. Die Säulchen wurden 15 s bei 11200 g zentrifugiert und erneut mit 500 μ l RPE-Puffer gewaschen (2 min, 16100 g). Nach einer weiteren

Zentrifugation (30 s, 16100 g) zur Entfernung von Ethanol-Resten wurde die RNA zwei Mal mit 40 µl Nuklease-freiem H₂O von der Membran eluiert (1 min, 11200 g). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -20 °C.

5.7.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR, (Mullis & Faloona, 1987)) wurde sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanten, Deletionsmutanten und Promotoraustauschmutanten) als auch präparative Zwecke (*in-vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) genutzt. Für die Kontrolle mittels Kolonie-PCR wurde das Top-Taq-DNA-Polymerase-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Für Kolonie-PCRs, welche als Matrize ganze Zellen verwendet, wurde ein zusätzlicher erster Denaturierungsschritt von 10 min bei 96 °C vor dem vom Hersteller empfohlenen Standardprogramm eingeführt, in welchem die Zellen durch Aufkochen geöffnet werden.

Für präparative Zwecke wurden verschiedene Systeme eingesetzt, die im Folgenden näher erläutert werden. Für die Amplifikation von kleineren Fragmenten (bis 1 kb) wurde das Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics) verwendet, welches neben *Taq*-DNA-Polymerase auch *Tgo*-DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität beinhaltet. Durch Kombination der beiden Polymerasen und die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der *Tgo*-DNA-Polymerase wird die Fehlerrate der DNA-Synthese um den Faktor 3 reduziert. Für längere Amplifikate wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt.

Die *KOD*-HotStart-DNA-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* (Novagen, Merck Chemicals) ist eine DNA-Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität, welche eine geringe Fehlerrate ausweist, nach Angaben des Herstellers um den Faktor 3,7 besser als *Taq*-Polymerase. Durch die Zugabe von zwei monoklonalen Antikörpern ist sie eine Heiß-Start-Polymerase, d.h. sie wird erst durch die Hitzeinaktivierung der Antikörper im ersten Schmelz-Schritt aktiviert.

Die *PfuUltra* II Fusion HS DNA-Polymerase (Stratagene, Agilent) weist ebenfalls eine sehr geringe Fehlerrate auf (laut Hersteller 20-fach besser als *Taq*-Polymerase), ist eine Heiß-Start-Polymerase und wurde daher für lange Amplifikate eingesetzt. Sie weist außerdem eine sehr hohe Amplifikationsgeschwindigkeit aus, wodurch laut Hersteller 1 kb in 15 s amplifiziert werden können. Daher ist sie für lange Amplifikate besonders geeignet.

Die Reaktionen wurden in einem FlexCycler Thermocycler der Firma Analytic Jena AG, Jena, Deutschland durchgeführt. Die Programme und Ansätze wurden je nach Polymerase gemäß der Herstellerangaben gewählt. Grundsätzlich erfolgte die Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrize bei 5 °C unter der niedrigsten Oligonukleotid-

schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur T_m der DNA kann mit der Formel $T_m [^\circ\text{C}] = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2]$ abgeschätzt werden.

Um PCR-Produkte von Nukleotiden und Oligonukleotiden zu reinigen, wurde das PCR-Purification-Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA wurde mit EB-Puffer (Qiagen, Hilden) oder bidest. Wasser eluiert.

5.7.3 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierungen wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder AGOWA (Berlin) durchgeführt. Vergleiche der in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen mit DNA-Sequenzen aus Datenbanken wurden mit Hilfe des Programmes „Blast 2 Sequences“ (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Clone Manager 7“ für Windows XP (Version 7.03, Scientific & Educational Software, Cary NC, USA).

5.7.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Für die Gele wurde 1-2 %ige (w/v) Agarose (GibcoBRL Ultra Pure Agarose) in 1xTAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von 100 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch mindestens 20-minütige Inkubation des Gels in wässriger GelRed-Lösung (Biotinum, Inc., Hayward, USA). Durch Belichtung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences). Zur Größenbestimmung der DNA wurde je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente der DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb bzw. 100 bp DNA Ladder von Fermentas verwendet. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit oder dem QIAEX II Gel Extraction Kit (beide Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers.

5.7.5 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität isolierter RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Sambrook & Russell, 2001). Hierbei wurde 1 x MOPS-Puffer (10 x MOPS-Puffer, Eppendorf, Hamburg) als Elektrophoresepuffer und zur Herstellung des Gels (0,25 g Agarose, 2,5 ml 10 x MOPS, 18,25 ml H₂O bidest., 4,25 ml Formaldehyd) verwendet. Die RNA-Proben (0,5 µg) wurden vor der Elektrophorese in RNA Gel Loading Buffer (Eppendorf; mit 0,7 % (v/v) 10 mg ml⁻¹ Ethidiumbromid-Lösung) für 10 min bei 65 °C und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit dem Image Master VDSSystem (Amersham Pharmacia, Freiburg) unter UV-Licht fotografiert.

5.7.6 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm am Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000 PeQLab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Dabei wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook *et al.*, 1989):

$OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ doppelsträngiger DNA

$OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von $40 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ einzelsträngiger DNA/RNA

Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen liegt der Wert unter 1,8.

5.7.7 Klonierungen

Sämtliche Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden, wenn nicht anders erwähnt, durch Transformation von *E. coli* DH5 α mit dem jeweiligen Ligationsansatz erhalten und zur Kontrolle sequenziert.

5.7.7.1 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder Roche Diagnostics bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte standardmäßig in 20 μl -Ansätzen unter Verwendung des geeigneten Puffers und 5 U Enzym nach Angaben des Herstellers. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert.

5.7.7.2 5'-Dephosphorylierung gespaltener Vektor-DNA

Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde durch Behandlung linearer Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektoranteils bei der Ligationsreaktion vermieden. Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Die Dephosphorylierung wurde immer durchgeführt, wenn das Plasmid mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde. Zur Dephosphorylierung der 5'-Stränge wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase („Shrimp alkaline phosphatase“, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 15 min bei 65 °C.

5.7.7.3 Ligation

Für Ligationen wurde in der Regel der „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics) verwendet. Die Ansätze wurden dabei 30 min bei RT inkubiert, oder über Nacht (16 h) bei 10 °C inkubiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen mit 2 μ l des Ligationsansatzes transformiert.

5.7.7.4 „InFusion“ Klonierung

Klonierung mit dem InFusion System der Firma Clontech Laboratories Inc. (Mountain View, CA, USA) (Sleight *et al.*, 2010) wurden durchgeführt, wenn es keine geeigneten Restriktionsschnittstellen zur „klassischen“ Klonierung gab, z.B. wenn aufgrund der Insertgröße alle Restriktionsschnittstellen der MCS (engl. *multiple cloning site*) im Insert vorhanden waren. Durch PCR-Oligonukleotide wurden homologe Überhänge von 15 bp Länge generiert (Fragment zu Fragment und Fragment zu Vektor), die vom InFusion Enzym einzelsträngig abgebaut wurden, sodass 15 bp lange *sticky ends* entstanden. Diese Überhänge am linearisierten Vektor und dem Insert rekombinierten zum gewünschten Zielvektor. Anschließend wurde *E. coli* DH5 α oder *E. coli* K12 mit dem Ansatz transformiert.

5.7.7.5 Konstruktion von Expressionsvektoren

5.7.7.5.1 Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase

Zur Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* wurde das Operon *fixNOQP* mit den Oligonukleotiden *fixN_IF_Ex_f* und *fixN_IF_r* mit der *Pfu*-Ultra II HS-DNA-Polymerase (Stratagene) mit genomischer DNA von *B. japonicum* als Matrize amplifiziert. Das 3,5 kb große PCR-Produkt wurde mit dem InFusion Kit (Clontech) in den mit KpnI linearisierten Vektor pEKEx2 kloniert und *E. coli* K12 mit dem Ansatz transformiert.

Zur Expression der akzessorischen Proteine, welche zum Aufbau der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* essentiell sind, wurde das Operon *fixGHIS* mit den Oligonukleotiden *fixG_IF_Ex_f* und *fixS_IF_Ex_r* mit der *Pfu*-Ultra II HS-DNA-Polymerase (Stratagene) mit genomischer DNA von *B. japonicum* als Matrize amplifiziert. Das 4,5 kb große PCR-Produkt wurde mit dem InFusion Kit (Clontech) in den mit PstI linearisierten Vektor pVWEx2 kloniert.

5.7.7.5.2 Expression der Nitritreduktase Nrf

Zur Expression der Nitritreduktase aus *W. succinogenes* wurde das Operon *nrfHAIJ* mit den Oligonukleotiden *nrfH_BamHI_f* und *nrfJ_EcoRI_r* mit der *Pfu*-Ultra II HS-DNA-Polymerase (Stratagene) mit genomischer DNA von *W. succinogenes* als Matrize amplifiziert. Das 5,5 kb große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen

BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem gleichermaßen geschnittenen Vektor pEKEx2 mit dem Rapid DNA-Ligation Kit (Roche) ligiert.

5.7.7.5.3 Expression des Flavohämoproteins Hmp

Zur Expression des Flavohämoproteins Hmp aus *C. glutamicum* wurde das Gen *hmp* mit den Oligonukleotiden PstI_RBS_ *hmp_fw* und BamHI_ *hmp_rv* mit dem Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) mit genomischer DNA von *C. glutamicum* als Matrize amplifiziert. Das 1,1 kb große PCR-Produkt wurde mit PstI und BamHI geschnitten und mit dem mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pEKEx2 mit dem Rapid DNA-Ligation Kit (Roche) ligiert.

5.7.7.6 Konstruktion von pK19*mobsacB*-Derivaten

5.7.7.6.1 Vektoren für die Promotoraustausche der Gene des Cytochrom-*bc₁-aa₃*-Superkomplexes

Zur Herstellung der Promotoraustauschvektoren pK19*mobsacB*ΔP_{*ctaD*}::P_{*tuf*}, pK19*mobsacB*ΔP_{*ctaE*}::P_{*tuf*} und pK19*mobsacB*ΔP_{*ctaC*}::P_{*tuf*} wurde der Promotor P_{*tuf*} mit den Oligonukleotiden P_{*tuf*}_for und P_{*tuf*}_ATG_rev bzw. P_{*tuf*}_GTG_rev mit dem Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) mit genomischer DNA von *C. glutamicum* als Matrize amplifiziert. Für den Austausch durch homologe Rekombination werden zwei Flanken benötigt, die jeweils vor und hinter dem zu tauschenden Bereich bzw. dem zu deletierenden Gen liegen. An diesen Flanken findet die homologe Rekombination statt. Die beiden Flanken vor und hinter den Promotoren P_{*ctaD*}, P_{*ctaC*} und P_{*ctaE*} wurden mit dem Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) und den Oligonukleotiden *ctaX_F1_for*, *ctaX_F1_rev*, *ctaX_F2_for* und *ctaX_F2_rev* mit genomischer DNA von *C. glutamicum* als Matrize amplifiziert. Eine erste Overlap-Extension-PCR zwischen der Flanke 1 und P_{*tuf*} wurde mit den Oligonukleotiden *ctaX_F1_for* und P_{*tuf*}_ATG_rev bzw. P_{*tuf*}_GTG_rev durchgeführt. Eine zweite Overlap-Extension-PCR mit dem Fusionsprodukt und der Flanke 2 mit den Oligonukleotiden *ctaX_F1_for* und *ctaX_F2_rev* lieferte das Fusionsprodukt, welches nach der Aufreinigung und der Restriktion mit EcoRI und XbaI mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* ligiert wurde.

5.7.7.6.2 Vektor für den Promotoraustausch des Operons der F₁F₀-ATP-Synthase

Zur Herstellung des Promotoraustauschvektors pK19*mobsacB*ΔP_{*atpB*}::P_{*tuf*} wurde der Promotor P_{*tuf*} mit den Oligonukleotiden P_{*tuf*}_for und P_{*tuf*}_GTG_rev mit dem Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) mit genomischer DNA von *C. glutamicum* als Matrize amplifiziert. Die beiden Flanken vor und hinter dem Promotor P_{*atpB*} wurden mit dem Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) mit genomischer DNA von *C. glutamicum* als Matrize und den Oligonukleotiden *atpB_F1_for*, *atpB_F1_rev*, *atpB_F2_for* und *atpB_F2_rev* amplifiziert. Eine

erste Overlap-Extension-PCR zwischen der Flanke 1 und P_{tuf} wurde mit den Oligonukleotiden *atpB_F1_for* und $P_{tuf_GTG_rev}$ durchgeführt. Eine zweite Overlap-Extension-PCR mit dem Fusionsprodukt und der Flanke 2 mit den Oligonukleotiden *atpB_F1_for* und *atpB_F2_rev* lieferte das Fusionsprodukt, welches nach der Aufreinigung und der Restriktion mit BamHI und PstI mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* ligiert wurde.

5.7.7.6.3 Vektor zur Deletion des Gens *hmp*

Zur Herstellung des Deletionsvektors pK19*mobsacB* Δ *hmp* wurden die beiden flankierenden Bereiche des Gens *hmp* mit den Codons für die ersten sechs und die letzten zwölf Aminosäuren von Hmp mit den Oligonukleotiden Δ_hmp_1 , Δ_hmp_2 , Δ_hmp_3 und Δ_hmp_4 mit dem Expand High Fidelity PCR Kit (Roche) mit genomischer DNA von *C. glutamicum* als Matrize amplifiziert. Anschließend wurden sie mit einer Overlap-Extension-PCR mit den Oligonukleotiden Δ_hmp_1 und Δ_hmp_4 fusioniert. Das Fusionsprodukt wurde mit XmaI geschnitten und in das ebenfalls mit XmaI linearisierte Plasmid pK19*mobsacB* ligiert (Rapid DNA Ligation Kit, Roche).

5.7.7.7 Konstruktion von Deletionsmutanten und Promotoraustauschen mit Hilfe des pK19*mobsacB*-Systems

C. glutamicum-Deletionsmutanten und Promotoraustausche wurden nach Niebisch und Bott (Niebisch & Bott, 2001) in Anlehnung an die von (Link *et al.*, 1997) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) konstruiert. Die fehlerfreien Plasmide (aus 5.7.7.6) wurden mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert und auf BHIS-Nährböden mit 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* wird in *C. glutamicum* nicht repliziert. Daher sollte bei kanamycinresistenten Klonen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert worden sein. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden kanamycinresistente Klone zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % (w/v) Glucose und 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin kultiviert und danach mind. 6 h in 5 ml CGXII-Medium ohne N- und P-Quelle inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 μl einer 1:10- und 1:100-Verdünnung der Kulturen auf BHIS-Nährböden mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in ihre Monosaccharide Fructose und Glucose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan umsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose letal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.*, 1992). Daher sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein. Bei diesem zweiten Rekombinationsereignis kann entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder

die gewünschte Deletion bzw. der Promotoraustausch erzeugt werden. Klone, die sowohl saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR analysiert. Eine Darstellung der verwendeten Oligonukleotide und der erwarteten PCR-Produktgrößen ist in Tabelle 5-5 dargestellt. Klone, die aufgrund der Kolonie-PCR-Analyse die gewünschte Deletion bzw. den Promotoraustausch enthielten, wurden in der Stammsammlung hinterlegt.

Tabelle 5-5: Oligonukleotide und erwartete Fragmentgrößen der Kolonie-PCRs zur Überprüfung der Promotoraustausche und der Deletion von *hmp*.

Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2	erwartete Fragmentgröße (bp)	
		Wildtyp	Mutante
Überprüfung von $\Delta P_{catD}::P_{tuf}$			
<i>ctaD</i> _P _{tuf} _Kol1	<i>ctaD</i> _P _{tuf} _Kol2	1152	1086
<i>ctaD</i> _P _{tuf} _Kol1	P _{tuf} _ATG_rev	kein Produkt	532
P _{tuf} _for	<i>ctaD</i> _P _{tuf} _Kol2	kein Produkt	736
Überprüfung von $\Delta P_{ctaE}::P_{tuf}$			
<i>ctaE</i> _P _{tuf} _Kol1	<i>ctaE</i> _P _{tuf} _Kol2	1037	1033
<i>ctaE</i> _P _{tuf} _Kol1	P _{tuf} _GTG_rev	kein Produkt	551
P _{tuf} _for	<i>ctaE</i> _P _{tuf} _Kol2	kein Produkt	664
Überprüfung von $\Delta P_{ctaC}::P_{tuf}$			
<i>ctaC</i> _P _{tuf} _Kol1	<i>ctaC</i> _P _{tuf} _Kol2	1074	1015
<i>ctaC</i> _P _{tuf} _Kol1	P _{tuf} _GTG_rev	kein Produkt	468
P _{tuf} _for	<i>ctaC</i> _P _{tuf} _Kol2	kein Produkt	711
Überprüfung von $\Delta P_{atpB}::P_{tuf}$			
<i>atpB</i> _P _{tuf} _Kol1	<i>atpB</i> _P _{tuf} _Kol2	1484	1569
<i>atpB</i> _P _{tuf} _Kol1	P _{tuf} _ATG_rev	kein Produkt	743
P _{tuf} _for	<i>atpB</i> _P _{tuf} _Kol2	kein Produkt	1008
Überprüfung von Δhmp			
<i>hmp_out_fw</i>	<i>hmp_out_rv</i>	2211	1107

5.7.8 Transformation von Bakterien

5.7.8.1 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von Kirchner und Tauch (Kirchner & Tauch, 2003). Aus einer Übernachtskultivierung in 10 ml BHIS-Medium wurde die Hauptkultur in 100 ml BHIS-Medium mit 2 ml Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,75 bis 2. Die Kulturen wurden 20 min auf Eis inkubiert, die Zellen anschließend durch 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 4000 g geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris-HCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurden die

Zellen in 2 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und Aliquots a 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -75 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen mit etwa 1 µg Vektor in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Der Ansatz wurde mit 800 µL eiskaltem 10 %igem Glycerin überschichtet. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 4 ml BHIS-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46 °C) und abschließend 1 h bei 30 °C geschüttelt (170 Upm). 100 µl des Ansatzes sowie der Rest wurden auf BHIS-Platten mit dem korrekten Antibiotikum ausplattiert.

5.7.8.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine RbCl₂-Behandlung erhielten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985). Einige 2 - 3 mm große Kolonien wurden von einer frischen LB-Platte in 1 ml SOC-Medium resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 16000 g und 4 °C geerntet, in 1/3 Kulturvolumen eiskalter RF1-Lösung (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1/12,5 Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung (10 mM Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6 mit 6 M NaOH eingestellt) resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in 50 bzw. 100 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 µl der Zellen mit bis zu 10 µl Ligationsansatz für 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 440 µl SOC-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz für weitere 45 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Vektors wurden 20 µl und 100 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit dem korrekten Antibiotikum ausplattiert.

5.7.9 qRT-PCR

Die quantitative reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) bestand aus zwei Schritten, die in getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt wurden. Die RNA wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe einer reversen-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. 10 µg RNA wurde mit 0,5 µl einer 500 ng µl⁻¹ Zufallshexanukleotid-Primer-Lösung (in bidest. H₂O gelöst, Amersham Biosciences) mit H₂O bidest. auf 11,5 µl aufgefüllt, 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x RT-Puffer (Invitrogen), 2 µl DTT (100 mM, Invitrogen), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Roche), 0,5 µl RNase-Inhibitor (Eppendorf Prime RNase Inhibitor) und 1 µl reverser Transkriptase (SuperScript™ III reverse-Transkriptase, Invitrogen) erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend eine 120 minütige Inkubation bei 50 °C. Die reverse-Transkriptase wurde durch die Inkubation bei 70 °C für 10 min inaktiviert. Für jede Reaktion wurde eine Kontrolle ohne reverse-Transkriptase durchgeführt. Die Reaktionsansätze und negativ-Kontrollen wurden umgehend für qPCR-Reaktionen eingesetzt.

Die zu untersuchenden Gene wurden anschließend mit spezifischen Primern in einer quantitativen PCR amplifiziert. Die experimentellen Prozeduren wurden von Bartels *et al.* 2011 beschrieben (Bartels *et al.*, 2011). Je 0,8 µl des qRT-Ansatzes (das entsprach 200 ng RNA) wurden zu 19,2 µl qPCR Mastermix gegeben. Dieser bestand aus 10 µl 2xSYBR-Green-Mastermix (Applied Biosystems, mit SYBR-Green, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs und Pufferkomponenten) und je 10 pmol Primer mit bidest. Wasser auf 19,2 µl aufgefüllt. Die qPCR wurde in einem Light-Cycler (ABI 7900HT Applied Biosystems) durchgeführt. Als *housekeeping*-Gen wurden *ddh*, welches für die meso-Diaminopimelatdehydrogenase kodiert, gewählt. Dieses Gen weist auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ein konstantes Transkriptlevel auf (Diesvelt, 2005).

Die Auswertung erfolgte nach der 2^{-ΔΔC_t}-Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Bei dieser Methode wird die Menge Transkript jeweils auf ein Gen normiert, welches einen konstanten mRNA-Spiegel aufweisen sollte (engl. *housekeeping* Gen). Somit werden pro zu analysierender Probe (z.B. pro Stamm oder pro Kultivierungsbedingung) die Transkriptmengen von zwei Genen untersucht. Es handelt sich um eine relative Quantifizierungsmethode. Da unter optimalen Bedingungen pro Zyklus der PCR eine Verdopplung der Menge DNA stattfindet, kann aus der Anzahl der Zyklen, bei der das Signal erstmals das Hintergrundrauschen übersteigt (C_t, engl. *cycle threshold*, Schwellenwertzyklus), auf die Menge an eingesetzter cDNA geschlossen werden. Subtrahiert man nun den C_t des Gens, auf welches normiert wird, von dem C_t des zu untersuchenden Gens, so erhält man den ΔC_t-Wert. Subtrahiert man nun die beiden ΔC_t-Werte der beiden verschiedenen Proben (zwei Stämme, zwei Kultivierungsbedingungen,

zwei Gewebe etc.) voneinander, so erhält man den $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Um nun zu quantifizieren, um wie viel sich die Transkriptmenge in den zwei Proben unterscheidet, muss man den $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Wert bestimmen, denn die Amplifikation hängt exponentiell mit der Templatemenge zusammen.

5.7.10 DNA-Microarray-Technologie

5.7.10.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen (20 bis 25 μg) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 570 nm, grün, Amersham Biosciences) und Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 670 nm, rot, Amersham Biosciences) verwendet. Die RNA (20 bis 25 μg Gesamt-RNA in 14 μl H_2O gelöst) wurde mit 1 μl einer 500 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ Zufallshexanukleotid-Primer-Lösung (in bidest. H_2O gelöst, Amersham Biosciences) inkubiert (65 $^\circ\text{C}$, 10 min) und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Die reverse Transkription wurde in einem Puffer durchgeführt, der 0,1 mM Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM mgCl_2 , 10 mM DTT, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,2 mM dTTP und 400 U Superscript-III Reverse Transkriptase (Invitrogen) enthielt (Wendisch *et al.*, 2001). Der 30 μl Ansatz wurde 10 min bei RT und anschließend 110 min bei 42 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde die RNA durch Zusatz von 10 μl NaOH (0,1 N) 10 min bei 65 $^\circ\text{C}$ hydrolysiert. Die Lösung wurde mit 10 μl HCl (0,1 N) neutralisiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Ultrazentrifugationseinheiten (Microcon YM-30, Millipore). Der 50 μl Ansatz wurde mit Wasser auf 500 μl aufgefüllt und durch Zentrifugation (7 min, 13000 g) auf etwa 20 μl eingengt. Danach wurden die für eine Hybridisierung vorgesehenen Cy3- bzw. Cy5-markierten Sonden vereinigt und es erfolgten, wie oben beschrieben, zwei weitere Ultrafiltrationszentrifugationen (8 min, 13000 g). Die so erhaltene cDNA-Sonde wurde sofort für die DNA-Chip-Hybridisierungen eingesetzt.

5.7.10.2 Hybridisierung von Operon-Arrays

Für die Vergleiche der mRNA-Mengen in *C. glutamicum* mit und ohne Nitrit bzw. Nitrat wurden Chips der Firma Operon (Köln, Deutschland) verwendet. Deren Benutzung wurde von Frunzke *et al.* 2008 detailliert beschreiben (Frunzke *et al.*, 2008b). Die Arrays enthielten 70mer Oligonukleotide, welche auf der Genomsequenz von *C. glutamicum* (Eintrag NC_006958 (Kalinowski *et al.*, 2003)) basiert waren. Die Arrays enthielten 3075 Oligonukleotide für Protein-kodierende Gene, 1294 Oligonukleotide für intergenische

Regionen, 60 für tRNAs, 15 für rRNA-Gene und 140 Oligonukleotide für positiv- und negativ-Kontrollen, Plasmide und Resistenzgene.

Die aufgereinigten und vereinigten fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden (5 µl) wurden mit 50 µl Hybridisierungspuffer (20 µg PolyA, 3 µl 20xSSC, 0,48 µl 1 M HEPES (pH 7,0) und 0,45 µl 10 % (w/v) SDS hinzugefügt, und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt) versetzt und bei 95 °C 2 min denaturiert. Anschließend wurde nach dem Abkühlen auf 42 °C wurden die Proben auf den Chip aufgetragen, auf welchem ein Mixerdeckglas angebracht war. In einer Maui-Station (BioMicroSystems Inc., UT, USA) wurden die Chips 16 h lang bei 42 °C unter konstantem Schwenken inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Chips mehrfach gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte mit einer Lösung aus 2 % (w/v) Natriumcitrat, 1 % (w/v) NaCl und 0,25 % (w/v) SDS bei 42 °C. Der zweite Waschschrift wurde mit einer Lösung aus 2 % (w/v) Natriumcitrat und 1 % (w/v) NaCl bei 37 °C durchgeführt. Im letzten Waschschrift wurde eine Lösung aus 0,4 % (w/v) Natriumcitrat und 0,2 % (w/v) NaCl bei Raumtemperatur eingesetzt. Die Arrays wurden durch Zentrifugation (Raumtemperatur, 5 min 1000 g) getrocknet und sofort gescannt.

5.7.10.3 Hybridisierung von Agilent 4-plex-Arrays

Untersuchungen zu den Promotoraustauschstämmen wurden mit Agilent 4-plex Arrays durchgeführt. Die Arrays enthielten 60mer Oligonukleotide, welche auf der Genomsequenz von *C. glutamicum* basierten (Eintrag NC_006958 (Kalinowski *et al.*, 2003)). Die Arrays enthielten 3075 Oligonukleotide für Protein-kodierende Gene, 80 Oligonukleotide für tRNAs und rRNA-Gene und 1417 Oligonukleotide für positiv- und negativ-Kontrollen. Positiv-Kontrollen waren 319 Oligonukleotide mit „spike in“-Sonden für die Hybridisierung mit der Agilent „Spike-Mixture“, 35 Sonden für eine zukünftige Nutzung zur Assay-Stringenz, 603 „Dark Corners“ zur Absetzung der Ecken der Arrays, 13 „Bright Corners“ mit unspezifischen Oligonukleotiden und 129 „biologisch negative“ Spots mit degenerierten Sequenzen. Negativ-Kontrollen waren 39 Spots mit Oligonukleotiden für Xenogene und 152 Spots für „triple hairpin negatives“.

Die aufgereinigten und vereinigten fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden (maximal 44 µl) wurden mit 11 µl Blocking-Agent (Agilent) und 55 µl 2x GEx Hybridisierungspuffer HI-RPM gemischt und nach kurzem Abzentrifugieren direkt auf den Array geladen. Der Array befand sich in einer Hybridisierungskammer (Agilent). Die Probe wurde in die Mitte der jeweiligen Kammer gefüllt und anschließend ein Deckglas aufgelegt und eingespannt. Die Hybridisierungskammer wurde verschlossen und anschließend für ca. 16 h bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen geschwenkt. Die Arrays wurden nach der Hybridisierung nach den Angaben des Herstellers gewaschen und sofort gescannt.

5.7.10.4 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen

Um die relativen mRNA-Spiegel der zu vergleichenden Proben zu bestimmen, wurde die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz der Spots in einem GenePix 4000 B Laser Scanner (Axon Inc.) bestimmt. Da das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots unter geeigneten Bedingungen direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben korreliert, ist es ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon *et al.*, 1996). Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenePix 4000 B Laser Scanner (Axon Inc.) verwendet. Die DNA-Chip-Oberfläche wurde zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppen mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen bestrahlt, eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und die andere für Cy5-dUTP (635 nm), und die daraufhin emittierte Fluoreszenz wurde mit lichtempfindlichen Kathoden bei 570 nm (Cy3-Fluoreszenz) und bei 670 nm (Cy5-Fluoreszenz) registriert. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird. Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im TIFF-Format elektronisch gespeichert (GenePix Pro 6.0 Software). Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die „GenePix Array List“ (erstellt von Dr. T. Polen) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen bzw. zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen (genomische *C. glutamicum*-DNA, λ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *E. coli*).

5.7.10.5 Normierung und statistische Analyse von DNA-Microarray-Daten

Die Berechnung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{Spotintergrund}}$. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis sowohl für die Cy3- als auch für die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um die durch die Cy3-/Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen *et al.*, 1998). Die Normalisierung erfolgte für jeden DNA-Chip anhand des Cy3-/Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisses von chromosomaler *C. glutamicum*-DNA. Dazu wurde aus den Cy3-/Cy5-Fluoreszenz-Verhältnissen aller auswertbaren Spots mit genomischer DNA der Mittelwert bestimmt. Der Kehrwert dieses Mittelwerts diente als Korrekturfaktor zur

Normalisierung. Bei Multiplikation des Korrekturfaktors mit dem experimentellen bestimmten Mittelwert für das Fluoreszenz-Verhältnis von chromosomaler DNA ergibt sich das theoretisch erwartete Verhältnis von eins (Eisen *et al.*, 1998). Die Verhältnisse aller genspezifischen Spots wurden dann mit diesem Korrekturfaktor multipliziert (Khodursky *et al.*, 2000). Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze, erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die Berechnung von p -Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, EXCEL 2010, Microsoft). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky *et al.*, 2000). Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit p -Werten $> 0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant verändert betrachtet.

5.7.10.6 Archivierung von DNA-Microarray-Daten

Zur Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten wurde die für das Computer-Betriebssystem Linux frei erhältliche relationale Datenbank MySQL verwendet (MySQL AB Company, Uppsala, Schweden, <http://www.mysql.com>). Die DNA-Chip-Daten, Fluorogramme sowie die relevanten Informationen zur Kultivierung der Zellen, RNA-Isolierung etc. wurden mit Hilfe einer von T. Polen entwickelten Software (Polen, 2002; Polen & Wendisch, 2004) erfasst und auf dem Linux- Zentralrechner des Instituts in einer MySQL-Datenbank hinterlegt, so dass sie über das institutsinterne Netzwerk für weitere Analysen zur Verfügung standen.

5.8 Biochemische Methoden

5.8.1 Zellaufschluss

5.8.1.1 Amalgamator

Zuvor sedimentierte Zellen wurden in 1 ml TE Puffer resuspendiert und mit etwa 0,25 g Glasperlen ($\varnothing = 0,1$ mm, Roth) versetzt. Zur direkten Untersuchung der Proteine des Rohextraktes mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein $OD_{600} = 20$ -Aliquot in 100 μ L SDS-Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x 30 s im Amalgamator (Silamat S5, Vivadent) aufgeschlossen. Nach jedem Durchgang wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Zelltrümmer wurden durch 20-minütige Zentrifugation (Sigma Zentrifuge 2K15) bei 15000 Upm und 4 °C sedimentiert.

5.8.1.2 French-Press-Zelle

Für den Aufschluss von 10 g *C. glutamicum*-Zellen (Feuchtmasse) wurden diese in 15 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit 5 mM MgSO₄ und 10 mg ml⁻¹ Lysozym resuspendiert und 100 µl Proteaseinhibitor-Mix (Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Diisopropylfluorophosphat (DFP) in Ethanol) hinzugefügt. Nach 45 min Schwenken bei 37°C erfolgte der Zellaufschluss durch fünfmalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments, Rochester) bei einem Druck von 207 MPa. Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 27000 g, 4 °C) abgetrennt.

5.8.2 Präparation von Zellmembranen aus *C. glutamicum*

Der Überstand von 10 g *C. glutamicum*-Zellen, welche mittels French-Press aufgeschlossen wurden, wurde für 1,5 bis 2 h bei 150000 g und 4 °C ultrazentrifugiert. Das Membranpellet wurde einmal mit Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5) gewaschen, die Suspension erneut 1,5 h bei 150000 g und 4 °C zentrifugiert, die Membran in 3 ml Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5) mit 10 % Glycerin suspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.8.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Protein-Konzentrationen wurden mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. Hierbei wurden 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 562 nm in einem UV-VIS Spektrophotometer UV-3101 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) bestimmt. Für die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) wurden 30 µl Probe mit 1,5 ml Bradford-Reagenz (CooAssay Standard Protein Assay Kit, Uptima, Frankreich) versetzt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard für die Kalibrierung wurde Rinderserumalbumin verwendet.

5.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung löslicher und membrangebundener Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad) durchgeführt. Es wurden 12 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele bzw. 15 %ige Trenngele und 6 %ige Sammelgele genutzt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen sechsfach konzentriertem Ladepuffer (für TMBZ-Färbung ohne DTT und Bromphenolblau) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert (für TMBZ-Färbung 10 min bei Raumtemperatur). Als

Größenstandard wurde der Protein Marker Biorad Range (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V (für TMBZ-Färbung bei maximal 100 V und 4 °C). Routinegemäß wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele dreimal 10 min mit bidest. H₂O gewaschen, min. 1 h in ca. 20 ml GelCode®Blue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. H₂O (mindestens 1 h) entfernt.

5.8.5 Analyse von Cytochromen

5.8.5.1 Differenzspektroskopie

Zur Analyse von Cytochromen wurden reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektren von Membransuspensionen bzw. reduziert-Spektren intakter *C. glutamicum*-Zellen zwischen 500 und 650 nm bei Raumtemperatur mit einem Jasco V560 Spektrophotometer aufgenommen. Da es sich in beiden Fällen um trübe Proben handelte, wurde ein spezieller Siliziumphotodiodendetektor (Castiglioni *et al.*, 1997) eingesetzt sowie Küvetten mit 5 mm Schichtdicke. Die Geräteeinstellungen waren 40 nm min⁻¹ Scangeschwindigkeit, 1 nm Bandbreite und *slow response*. Für Differenzspektren von Membranen wurde eine Probe in zwei Aliquots aufgeteilt und zunächst das reduziert-Spektrum nach Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit aufgenommen. Von einer weiteren Probe wurde das oxidiert-Spektrum nach Zugabe von festem Kaliumhexacyanoferrat(III) aufgenommen. Es wurde jeweils gewartet, bis die Bläschenbildung zurückgegangen war. Die Aufnahme von reduziert-Spektren intakter Zellen erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 100 nach Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit mit denselben Geräteeinstellungen.

5.8.5.2 Färbung von Häm-Proteinen mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ)

Proteine, die über kovalent gebundene Häm-Gruppen verfügen, wurden über nicht reduzierende SDS-PAGE und anschließende 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Färbung (TMBZ) nachgewiesen. Die Färbung beruht auf der Detektion der intrinsischen Peroxidaseaktivität von kovalent gebundenen Häm-Gruppen (Francis & Becker, 1984; Thomas *et al.*, 1976). Die SDS-Gele wurden gründlich mit Wasser gewaschen. Eine frische Lösung von 6,3 mM TMBZ in Methanol wurde mit 0,25 M Natriumacetat (pH 5) im Verhältnis 3:7 gemischt. Die Gele wurden in dieser Lösung 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Wasserstoffperoxid in einer Endkonzentration von 30 mM löste schließlich die Farbreaktion aus. Nach 30 min, wenn sich die Intensität der Färbung nicht weiter erhöhte, wurden die Gele mit 30 % (v/v) Isopropanol in 0,25 mM Natriumacetat (pH 5) gespült, wodurch präzipitiertes TMBZ entfernt und die Intensität der Färbung erhöht wurde.

5.8.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analysen wurden Proteinbanden aus TMBZ- oder coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden zweimal 10 min mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril gewaschen, 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 6 bis 10 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng µl⁻¹ Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 6 bis 10 µl 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 10 µl Wasser und 15 min Inkubation bei RT, sowie Zugabe von 10 µl 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und 10 min Inkubation bei RT eluiert. Gegebenenfalls wurden die Peptide mittels „ZipTip C₁₈ standard bed“ (Millipore, USA) nach Angaben des Herstellers entsalzt und konzentriert. Anschließend wurden die Proben auf eine „Prespotted AnchorChip“-Platte (Bruker Daltonics, Bremen), die bereits eine α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)-Matrix und einen Kalibrierungsstandard enthält, aufgetragen. Die MALDI-TOF-MS/MS-Messungen wurden mit einem Utraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III (Bruker Daltonics) im positiven Reflektormodus und einem Beschleunigungspotential von 26,3 kV durchgeführt. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mithilfe des Programms BioTools 3.1, des MASCOT-Servers (Matrix Science, London, UK) und der MASCOT-Software (Perkins *et al.*, 1999) mit der NCBI-*C. glutamicum*-Protein-Datenbank verglichen. Beim Peptidmassenvergleich mittels MASCOT-Software sowie mittels MS-Fit-Programm wurden ein „missed cleavage“ beim Trypsinverdau, eine Carbamidomethylsubstitution am Cystein als feste Modifikation, eine Oxidation von Methionin sowie Phosphorylierungen von Serin- und Threoninresten als variable Modifikationen und eine Abweichung von 200 ppm zugelassen. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn ein MOWSE-Score (Molecular Weight Search, Molmassensuche) ≥ 50 erhalten wurde (Pappin *et al.*, 1993). Weiterhin konnten mit dem Utraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III mittels MS/MS-Methode einzelne tryptische Peptide selektiert und weiter fragmentiert werden, um die Aminosäuresequenz des ausgewählten Peptids (*parent ion*) abzuleiten. Dazu wurde die entsprechende Probe mit hoher Laserenergie verdampft und ionisiert. Nach Beschleunigung der ionisierten tryptischen Peptide wurden diese über eine kurze Strecke aufgetrennt und im Anschluss konnte mithilfe eines kurzzeitig aussetzenden Gegenfeldes das *parent ion* selektiert werden. Aufgrund der hohen Laserenergie, die zum Verdampfen der Probe verwendet wurde, zerfallen die tryptischen Peptide während des Fluges (Laser-Induced-Dissociation, LID). Um diese entstandenen Ionen voneinander zu trennen, folgte anschließend deren Beschleunigung in der LIFT-Einheit (Lift-Technik = Post-Akzeleration von fragmentierten Ionen) (Suckau *et al.*, 2003). Die Ionisierungsspannung betrug in diesen Fällen 8,0 kV, die Lift-Spannung 19 kV und die Reflektorspannung 29,5 kV. Bei der Zuordnung und Bewertung der erhaltenen

Spektren wurde eine MS/MS-Toleranz von 0,5 Da vorausgesetzt. Ein Protein galt als identifiziert, wenn die MASCOT-Datenbanksuche einen Kandidaten als signifikant ($p < 0,05$) betrachtete.

5.8.7 Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten

Die Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten erfolgte mit *C. glutamicum*-Zellsuspensionen (1 ml Volumen) in einer magnetisch gerührten Messkammer mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ (Oxygraph, Hansatech Instruments). Die Elektrode wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Eine Kalibrierung erfolgte mit luftgesättigtem Wasser (100 %), danach erfolgte die Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit, was eine Reduktion zu Folge hatte (0 %-Wert). Als Messpuffer diente 250 mM MOPS, 50 mM KCl, $1 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, pH 7. Zellen wurden geerntet und zweimal mit dem angegebenen Puffer gewaschen, um Substrate aus dem Medium zu entfernen. Die Zellen wurden in 10 ml des Messpuffers zu einer OD_{600} von 100 aufgenommen und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. In die Messkammer wurden 940 μl luftgesättigter Puffer gefüllt und 20 μl einer luftgesättigten 500 mM Glucoselösung zugegeben. Die Messung wurde durch Zugabe der Zellen (40 μl , finale OD_{600} 0,5 bis 2,5) gestartet.

6 ERGEBNISSE

6.1 Konstruktion und Charakterisierung eines *C. glutamicum*-Stammes mit verstärkter Expression des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes

6.1.1 Konstruktion des Stammes *C. glutamicum* SC^{plus}

Zur verstärkten Synthese des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes in *C. glutamicum* wurden die Promotoren der Gene bzw. Operons *ctaD*, *ctaCF* und *ctaEqcrCAB* mittels homologer Rekombination gegen den Promotor P_{tuf} des Gens des Elongationsfaktors Tu (EF-Tu) ausgetauscht. Der Promotor P_{tuf} wurde ausgewählt, weil EF-Tu eines der häufigsten Proteine im Cytoplasma von *C. glutamicum* ist und somit in großer Menge gebildet wird (Schaffer *et al.*, 2001) und weil der P_{tuf} -Promotor bereits erfolgreich zur strarken chromosomalen Expression eines heterologen Gens in *C. glutamicum* eingesetzt worden war (Litsanov *et al.*, 2012). Die Promotoraustausche von *ctaD*, *ctaCF* und *ctaEqcrCAB* wurden im Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 durchgeführt und durch PCR überprüft (Tabelle 5-5). Eine schematische Darstellung der Genorganisation mit den Promotor-Austauschen zeigt Abbildung 6-1. Durch die Promotor-Austausche ($\Delta P_{ctaD}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaE}::P_{tuf}$ $\Delta P_{ctaC}::P_{tuf}$) wurden die Stämme *C. glutamicum* SC^{plus} und *C. glutamicum* DM1945 SC^{plus} erhalten und im Hinblick auf Wachstum, Sauerstoffverbrauch, Transkriptom, Cytochromgehalt und Lysinproduktion untersucht.

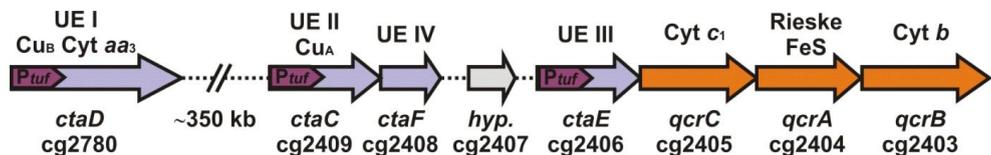


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der Gene/Operons des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes mit den drei Promotoraustauschen. Die fliederfarbenen Pfeile symbolisieren die Gene der Cytochrom-*aa*₃-Oxidase (*ctaD*, *ctaCF* und *ctaE*), die orangenen Pfeile die Gene des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes (*qcrCAB*). In dunkel lila sind die ausgetauschten Promotoren der Gene *ctaD*, *ctaC* und *ctaE* dargestellt. *ctaC* und *ctaF* bilden ein Operon, *ctaE* und *qcrCAB* ebenfalls. Zwischen *ctaCF* und *ctaE* liegt möglicherweise das Gen *cg2407*, welches bisher jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

6.1.2 Wachstum des Stammes *C. glutamicum* SC^{plus}

Der Wildtyp ATCC13032 und der Stamm SC^{plus} wurden aerob im Schüttelkolben in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert und die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium mittels des SFR-Systems verfolgt (Abbildung 6-2). Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt. Es zeigte sich, dass der Stamm SC^{plus} geringfügig langsamer wuchs, als der Ausgangsstamm. Die

Wachstumsrate μ betrug für den Wildtyp $0,37 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und für den SC^{plus} -Stamm $0,35 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Die maximale OD_{600} der beiden Stämme war vergleichbar (Wildtyp $55,7 \pm 1,7$, SC^{plus} $53,9 \pm 3,2$). Trotz der leicht geringeren Wachstumsrate von SC^{plus} näherte sich die Gelöstsauerstoffkonzentration in beiden Stämmen etwa gleichzeitig nach ca. 7 h dem Nullpunkt. Dies ließ auf eine leicht erhöhte spezifische Atmungsrate des SC^{plus} -Stammes schließen.

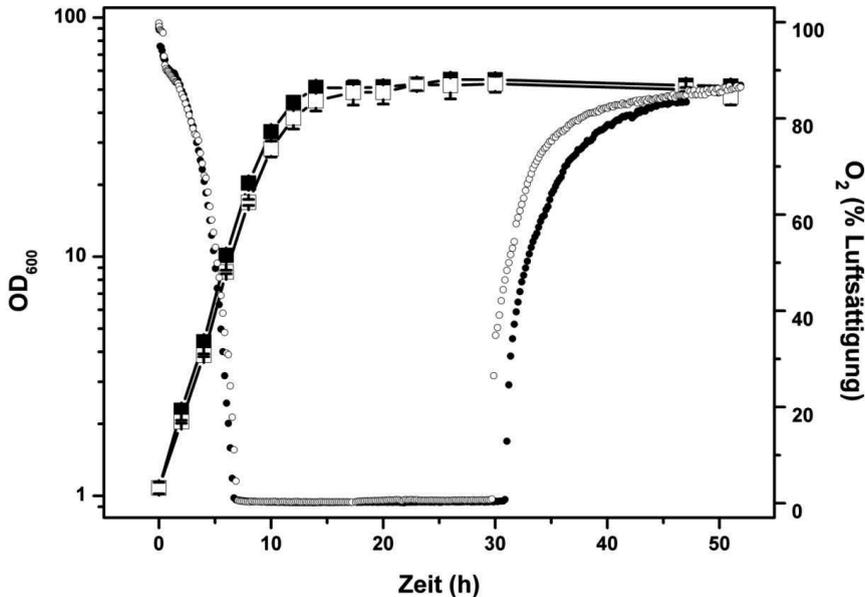


Abbildung 6-2: Wachstum (Quadrate) und Gelöstsauerstoffkonzentration (Punkte) von *C. glutamicum* Wildtyp (gefüllte Symbole) und SC^{plus} (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Für das Wachstum wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und aufgetragen, beim Gelöstsauerstoff wurde ein repräsentatives Ergebnis aus einer der drei unabhängigen Kultivierungen ausgewählt.

Beide Stämme wurden auch im Mikrotitermaßstab (800 μl Kulturvolumen) im BioLector kultiviert, wobei neben der Biomassebildung auch der pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration vollautomatisch mit Hilfe von Fluoreszenzsensoren gemessen wurde. Hierbei wurden 2 % (w/v) Glucose oder 2 % (w/v) Acetat als Kohlenstoffquelle in CGXII-Minimalmedium eingesetzt. Die Biomassebildung wurde anhand der Rückstreuung gemessen. Bei einem Rückstreuungswert von ca. 800 befindet sich das Signal in der Sättigung und quantitative Aussagen sind nicht mehr möglich. Auch Werte unter 100 sind nicht quantitativ verlässlich (F. Käß, Dr. S. Klaffl, persönliche Mitteilung). Um das Signal im auswertbaren Messbereich zu untersuchen, werden verschiedene Verstärkungsfaktoren eingesetzt. Bei einem Verstärkungsfaktor von 20 kann der Beginn des Wachstums am

besten verfolgt werden, bei einem Verstärkungsfaktor von 12 die maximale Biomassebildung.

Mit Glucose als Kohlenstoffquelle wuchsen beide Stämme in den ersten acht Stunden vergleichbar, danach zeigte der SC^{plus}-Stamm jedoch ein vorübergehend verringertes Wachstum (Abbildung 6-3 A und B). Diese Wachstumsverzögerung des Stammes SC^{plus} spiegelte sich auch in einem Plateau in der Gelöstsauerstoff-Kurve zwischen etwa acht und zehn Stunden wieder (Abbildung 6-3 D), in der keine Abnahme des Gelöstsauerstoffs stattfand. Der pH-Wert stieg beim Stamm SC^{plus} in dieser Phase stärker an als beim Wildtyp (Abbildung 6-3 C). Bei der BioLector-Kultivierung schien also eine Umstellung der Atmung und des Stoffwechsels im Stammes SC^{plus} stattzufinden, die bei der Kultivierung im Schüttelkolben nicht beobachtet werden konnte.

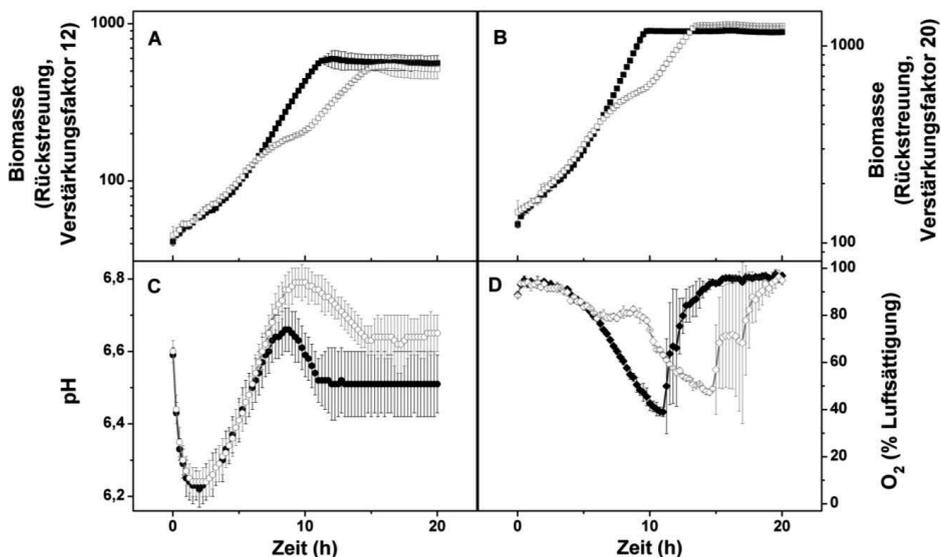


Abbildung 6-3: Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp (gefüllte Symbole) und SC^{plus} (offene Symbole) im 800 μ l-Maßstab im BioLector in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle. (A) und (B) zeigen das Wachstum (Rückstreuung) bei den Verstärkungsfaktoren 12 (A) und 20 (B), (C) zeigt den pH-Wert und (D) den Gelöstsauerstoff. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei unabhängigen Experimenten.

Um den Einfluss der Promotoraustausche auf den gluconeogenetischen Metabolismus und die oxidative Phosphorylierung zu untersuchen, wurden der Wildtyp und der SC^{plus}-Stamm mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. Dabei zeigten sich geringe Unterschiede zwischen den beiden Stämmen (Abbildung 6-4). Der Stamm SC^{plus} begann ca. zwei Stunden später mit dem Wachstum als der Wildtyp (WT nach ca. 5 h, SC^{plus} nach ca. 7 h, Abbildung 6-4 B). Daher war auch ein etwas späterer Anstieg des pH-Werts

(Abbildung 6-4 C) und eine um ca. 2 h verschobene Gelöstsauerstoff-Kurve (Abbildung 6-4 D) zu beobachten. Beide Stämme erreichten in etwa die gleiche Biomasse. Die Promotoraustausche vor den Superkomplexgenen hatten also einen geringen Einfluss auf das Wachstum auf Acetat als Kohlenstoffquelle.

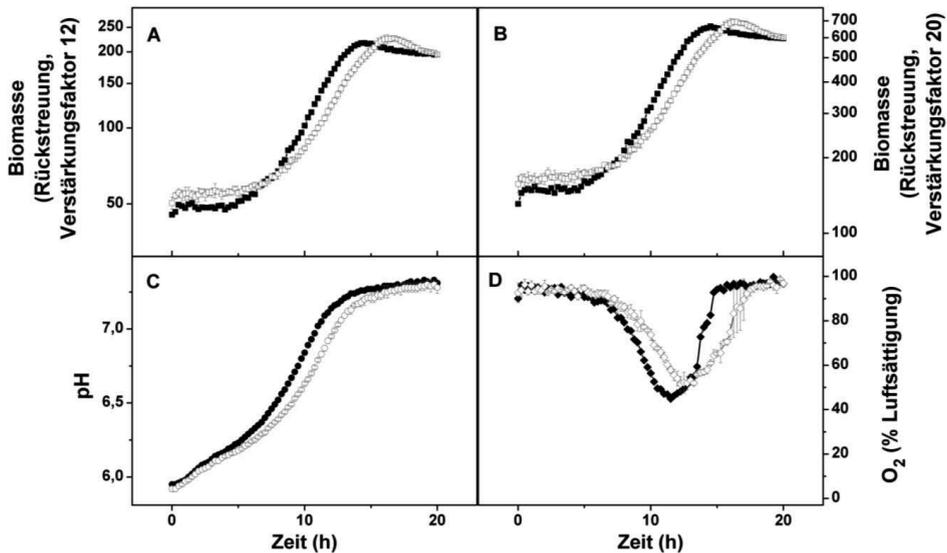


Abbildung 6-4: Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp (gefüllte Symbole) und SC^{plus} (offene Symbole) im 800 µl-Maßstab im BioLector in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Acetat als Kohlenstoffquelle. (A) und (B) zeigen das Wachstum (Rückstreuung) bei den Verstärkungsfaktoren 12 (A) und 20 (B), (C) zeigt den pH-Wert und (D) den Gelöstsauerstoff. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei unabhängigen Experimenten für den Stamm SC^{plus}. Für den Wildtyp ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten aufgetragen.

6.1.3 Untersuchungen zum Einfluss der Promotoraustausche auf das Transkriptom

Um zu untersuchen, ob die Gene des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes im SC^{plus}-Stamm einen erhöhten mRNA-Spiegel aufwiesen und welche Einflüsse die Promotoraustausche auf die globale Genexpression hatten, wurden während einer Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose bei einer OD₆₀₀ von 5 Zellen des Wildtyps und des SC^{plus}-Stammes geerntet und die Gesamt-RNA aus beiden Stämmen isoliert. Mit dieser wurden vergleichende Transkriptomanalysen mittels DNA-Microarrays durchgeführt. Zu dieser Zeit befanden sich die Zellen noch nicht in der Sauerstofflimitierung (vgl. Abbildung 6-2). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

Tabelle 6-1: Ergebnisse der globalen Transkriptomanalysen des Stammes *C. glutamicum* SC^{plus} im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp bei einer OD₆₀₀ von fünf. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert. Dargestellt sind alle Gene, deren mRNA-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp mindestens 1,5-fach verändert vorlagen. Als statistisch signifikant verändert wurden die Gene angesehen, deren *p*-Wert ≤ 0,05 war. Ergänzt wurden Gene, welche zu einem Operon gehören. War der *p*-Wert der ergänzten Gene ≥ 0,05, so wurde der Wert unterstrichen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

cg-Nummer	Genname, Annotation	mRNA-Verhältnis SC ^{plus} /WT
Cytochrom-<i>bc</i>₁-<i>aa</i>₃-Superkomplex		
cg2403	<i>qcrB</i> , Cytochrom <i>b</i>	2,69
cg2404	<i>qcrA</i> , Rieske-Eisen-Schwefel- Protein	2,70
cg2405	<i>qcrC</i> , Cytochrom <i>c</i> ₁	2,85
cg2406	<i>ctaE</i> , Cytochrom- <i>aa</i> ₃ -Oxidase UE 3	2,77
cg2407	hypothetisches Protein	2,22
cg2408	<i>ctaF</i> , Cytochrom- <i>aa</i> ₃ -Oxidase UE 4	1,85
cg2409	<i>ctaC</i> , Cytochrom- <i>aa</i> ₃ -Oxidase UE 2	2,09
cg2780	<i>ctaD</i> , Cytochrom- <i>aa</i> ₃ -Oxidase UE 1	4,46
Cytochrom-<i>bd</i>-Oxidase		
cg1298	<i>cydC</i> , UE eines ABC-Transportsystems	3,34
cg1299	<i>cydD</i> , UE eines ABC-Transportsystems	6,00
cg1300	<i>cydB</i> , Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase UE 2	6,29
cg1301	<i>cydA</i> , Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase UE 1	6,44
Aufbau des Superkomplexes		
cg1767	ABC-Typ-Transportsystem, ATPase Komponente	1,65
cg1768	ABC-Typ-Transportsystem, ATPase Komponente	1,52
cg1769	<i>ctaA</i> , Häm- <i>o</i> -Monooxygenase	1,52
cg1773	<i>ctaB</i> , Protohäm-IX-Farnesyltransferase	5,30
Häm-Stoffwechsel		
cg0497	<i>hemA</i> , Glutamyl-tRNA-Reduktase	1,67
cg0510	<i>hemD</i> , Uroporphyrinogen-III-synthase/Methyltransferase	1,57
cg0516	<i>hemE</i> , Uroporphyrinogendecarboxylase	1,95
cg0517	<i>hemY</i> , Protoporphyrinogenoxidase	1,76
cg0518	<i>hemI</i> , Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase	1,56
cg0519	putative Phosphoglyceratmutase	1,52
cg0520	sekretierte Thiol-disulfidisomerase oder Thioredoxin	1,52
cg1734	<i>hemH</i> , Ferrochelatase Vorläufer	2,43
cg2445	<i>hmuO</i> , Hämoxygenase	0,54
Eisen-Stoffwechsel		
cg0776	sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	2,20
cg0777	Siderophor-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	1,88
cg0922	sekretiertes Siderophor-bindendes Lipoprotein	1,73
cg2555	hypothetisches Protein Cg2555	1,83
cg2556	uncharakterisiertes Eisen-reguliertes Membranprotein	8,40
Kupfer-Stoffwechsel		
cg1080	putative Multikupferoxidase	1,62
cg1081	ABC-Typ-Transportsystem, ATPase Komponente	1,53
cg1881	vorhergesagte Eisen-abhängige Peroxidase, sekretiertes Protein	10,26
cg1883	putatives sekretiertes Protein	9,02

cg1884	<i>copC</i> , Kupferresistenzprotein	9,07
Fortsetzung von Tabelle 6-1		
cg-Nummer	Genname, Annotation	mRNA-Verhältnis SC ^{plus} /WT
Sulfat-Stoffwechsel		
cg0992	Sulfatpermease oder verwandter Transporter (MFS Superfamilie)	2,81
cg0993	bakterielles regulatorisches Protein, ArsR Familie	2,69
Kohlenstoffstoffwechsel		
cg0445	<i>sdhC</i> , Succinatdehydrogenase UE C	<u>0,63</u>
cg0446	<i>sdhA</i> , Succinatdehydrogenase UE A	0,55
cg0447	<i>sdhB</i> , Succinatdehydrogenase UE B	0,55
cg0448	hypothetisches Protein Cg0448	0,62
cg2425	<i>sucE</i> , Succinatexporter	0,58
cg2732	<i>gntV</i> , putative Gluconokinase	0,52
cg3022	Acetyl-CoA-Acetyltransferase	2,22
cg3131	Acetylnithindeacetylase oder verwandte Deacylase	0,59
cg3219	<i>ldhA</i> , NAD-anhängige L-Laktatdehydrogenase	0,40
cg3323	Myo-Inositol-1-phosphatsynthase	1,59
Stressantwort/Antwort auf Wachstumsdefekt		
cg0001	<i>dnaA</i> , chromosomale-Replikation-Initiationsprotein	1,65
cg0756	<i>cstA</i> , putatives Kohlenstoff-Mangelprotein A	1,73
cg0936	<i>rpf1</i> , Wiederbelebungsfaktor	2,15
cg2157	<i>terC</i> , Telluriumresistenz-Membranprotein	1,63
cg3255	<i>uspA3</i> , Protein der USP-Familie (USP= engl. <i>universal stress protein</i>)	0,63
cg3431	<i>mpA</i> , Ribonuclease P	1,80
cg3432	<i>rpmH</i> , ribosomales Protein L34	1,63
Transporter		
cg1077	Permease der " <i>major facilitator</i> " Superfamilie	1,70
cg1169	Na ⁺ -abhängiger Transporter der SNF-Familie	1,55
cg2202	<i>hrtB</i> , ABC-Typ-Transportsystem, Permease-Komponente	0,60
cg2810	Na ⁺ /H ⁺ -Dicarboxylat-Symporter-Familie	0,63
cg2846	<i>pstS</i> , ABC-Typ-Phosphattransportsystem, sekretierte Komponente	0,53
cg3399	Permease der " <i>major facilitator</i> "-Superfamilie	0,57
Regulatoren		
cg2888	<i>phoR</i> , Zweikomponentensystem-Antwortregulator	1,75
cg3303	Transkriptionsregulator aus der PadR-Familie	0,58
hypothetische und uncharakterisierte Proteine		
cg0018	hypothetisches Membranprotein	0,33
cg0105	hypothetisches Protein	1,67
cg0753	sekretiertes Protein	1,58
cg0793	sekretiertes Protein	0,41
cg0905	<i>psp2</i> , putatives sekretiertes Protein	0,28
cg0906	hypothetisches Protein	0,27
cg0907	hypothetisches Protein	0,28
cg1091	hypothetisches Protein	1,69
cg1279	putatives sekretiertes Protein	0,52
cg1514	sekretiertes Protein	1,53
cg1516	hypothetisches Protein	0,24

cg1517	putatives sekretiertes Protein	0,23
Fortsetzung von Tabelle 6-1		
cg-Nummer	Gename, Annotation	mRNA-Verhältnis SC ^{plus} /WT
hypothetische und uncharakterisierte Proteine		
cg1523	hypothetisches Protein	0,54
cg2073	hypothetisches Protein	0,61
cg2079	hypothetisches Protein	1,83
cg2564	hypothetisches Protein	1,50
cg2699	hypothetisches Protein	1,76
cg2750	hypothetisches Protein	3,43
cg3430	hypothetisches Protein	1,54
cg4007	hypothetisches Protein	0,32
CGP3-Gene*		
cg1890 bis cg2071	Gene des Prophagen CGP3	≤ 0,32

* Die Gene cg1891 bis cg2071 liegen im Bereich des Prophagen CGP3 (Frunzke *et al.*, 2008a). Alle diese Gene zeigten einen mindestens 3-fach reduzierten mRNA-Spiegel im SC^{plus}-Stamm, wobei zwei Gene einen p-Wert von > 0,06 aufwiesen. Eine Tabelle mit den Werten dieser Gene befindet sich im Anhang (Tabelle 9-2).

Die Auswertung der Transkriptomanalysen zeigte, dass im Stamm SC^{plus}, abgesehen von den Genen des Prophagen CGP3, auf den später eingegangen wird, 9 Gene signifikant mehr als zweifach weniger mRNA aufwiesen als im Wildtyp. Hierbei handelte es sich um die Laktatdehydrogenase LdhA und um hypothetische Proteine. 23 Gene wiesen im Stamm SC^{plus} einen mehr als 2-fach signifikant erhöhten Transkriptspegel auf. Um ein vollständigeres Bild der transkriptionellen Veränderungen im Stamm SC^{plus} zu erhalten, wurden auch alle Gene betrachtet, deren Transkriptspegel mehr als 1,5-fach signifikant verändert vorlag. Diese Gene werden im Folgenden erläutert.

Wie erhofft wurden die Gene des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes im Stamm SC^{plus} stärker exprimiert, als im Wildtyp, und zwar zwischen 4,5-fach (*ctaD*) und 1,9-fach (*ctaF*). Die weiteren Gene des Superkomplexes zeigten 2,1- bis 2,9-fach erhöhte mRNA-Spiegel. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Austausch der nativen Promotoren von *ctaD*, *ctaC* und *ctaE* gegen P_{tuf} zu einer verstärkten Transkription der entsprechenden Gene bzw. Operons führte.

Vermutlich als Folge einer verstärkten Synthese der Untereinheiten des Superkomplexes wurden auch solche Gene verstärkt exprimiert, die an der Bereitstellung von Cofaktoren bzw. prosthetischen Gruppen des Komplexes bzw. deren Einbau beteiligt sind. Dazu zählen die Gene *ctaB* und *ctaA*, die für die Biosynthese von Häm A aus Häm B verantwortlich sind (Brown *et al.*, 2002; Saiki *et al.*, 1993), die zu *ctaA* benachbarten Gene für einen ABC-Transporter unbekannter Funktion, sowie eine Reihe von Häm-Biosynthesegenen (*hemA*, *hemD*, *hemEYL*, cg0519, cg0520, *hemH*). Das *hmuO*-Gen für die Häm-Oxygenase, die für den Häm-Abbau verantwortlich ist (Frunzke *et al.*, 2011), wurde

dagegen verringert exprimiert. Auch Gene für putative Eisenaufnahmeproteine wurden verstärkt exprimiert. Einen besonders stark erhöhten mRNA-Spiegel zeigten drei Gene (cg1881, cg1883, cg1884), die am Kupferstoffwechsel beteiligt sind (Schelder *et al.*, 2011).

Unerwartet war das Ergebnis, dass auch die *cydABDC*-Gene für die Cytochrom-*bd*-Oxidase und der für deren funktionelle Synthese essentiellen ABC-Transporter im Stamm SC^{plus} sechsfach stärker transkribiert wurden. Als weitere Besonderheit zeigten im Stamm SC^{plus} alle Gene des Prophagen CGP3 deutlich geringere mRNA-Spiegel als im Wildtyp. *C. glutamicum* ATCC13032 besitzt drei Prophagen, von denen CGP1 und CGP2 aber stark degeneriert sind. Dagegen kann der Prophage CGP3 noch aus dem Genom ausgeschnitten werden und in zirkulärer Form in der Zelle vorliegen (Frunzke *et al.*, 2008a). Aufgrund des reduzierten mRNA-Spiegels der CGP3-Gene wurde eine Kolonie-PCR zum Nachweis des Gens cg2040 durchgeführt. Das Gen konnte nur im Wildtyp, nicht jedoch im Stamm SC^{plus} nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass dieser Stamm den Prophagen CGP3 möglicherweise verloren hat. Zur Überprüfung dieser These sind weitere Experimente erforderlich.

Zur Bestätigung der DNA-Microarray-Ergebnisse wurden quantitative reverse Transkriptase-PCRs für ausgewählte Gene durchgeführt. Als „housekeeping“-Gen wurde *ddh*, welches für die meso-Diaminopimelatdehydrogenase kodiert, gewählt. Dieses Gen weist auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen einen konstanten Transkriptspiegel auf (Diesvelt, 2005). Untersucht wurden die Gene *ctaD*, *ctaC*, *ctaF*, *ctaE* und *qcrB*. Außerdem wurde die Expression des *tuf*-Gens analysiert. RNA wurde aus Zellen isoliert, welche in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose bis zu einer OD₆₀₀ von 5 kultiviert worden waren. Die Transkriptmengen wurden nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Normierung auf den Transkriptspiegel des *ddh*-Gens verglichen (Abbildung 6-5). Es wurden jeweils drei biologische und drei technische Replikate durchgeführt. Aufgrund des exponentiellen Zusammenhangs zwischen Transkriptmenge und Schwellenwertzyklus ergibt sich eine asymmetrische Standardabweichung.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass das *ddh*-Gen in den beiden zu vergleichenden Stämmen gleich stark transkribiert wurde und somit als Kontrollgen geeignet war (SC^{plus}/WT = 1,0 ± 0,1). Im Rahmen des experimentellen Fehlers wurde auch das Gen *tuf* in beiden Stämmen gleich stark transkribiert (0,9 ± 0,1). Die Gene des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes zeigten im Stamm SC^{plus} erhöhte mRNA-Spiegel. Wie in den DNA-Microarray-Analysen war *ctaD* (8,8 (6,9 bis 11,2)) das am stärksten und *ctaF* (1,3 ± 0,2) das am schwächsten transkribierte Gen des Superkomplexes. Das Gen *ctaC* wurde in SC^{plus} 2,6-fach (± 0,3) vermehrt transkribiert, *ctaE* 2,7-fach (1,5 bis 4,9) und *qcrB* 2,3-fach (± 0,1). Die

mittels qRT-PCR gemessenen Transkriptspiegel bestätigten die Resultate aus den DNA-Microarrays.

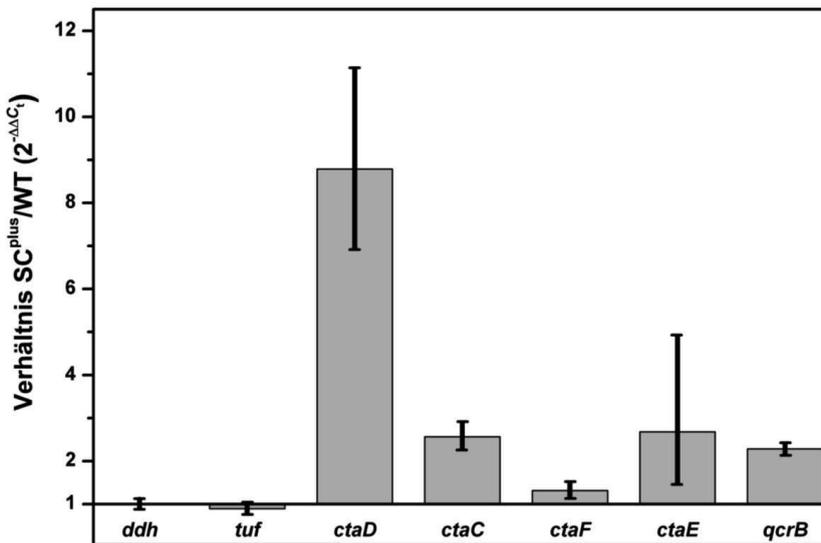


Abbildung 6-5: Ergebnisse der qRT-PCR zur Überprüfung der DNA-Microarray-Ergebnisse. Dargestellt sind die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte ($\Delta\Delta C_t = SC^{plus}(C_{tGen} - C_{tddh}) - WT(C_{tGen} - C_{tddh})$) ermittelt aus je drei biologischen und drei technischen Replikaten, sowie die Standardabweichung. Die RNA wurde aus Zellen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 5$) isoliert und mit der Superscript III reversen-Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Die qRT-PCR erfolgte mit dem SYBR-Green System der Firma Applied Biosystems in einem Lightcycler (ABI 7900HT) unter Verwendung von genspezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 5-3), welche jeweils ein ca. 100 bp-Fragment amplifizierten. Als *housekeeping*-Gen wurde *ddh* gewählt.

6.1.4 Untersuchung der Atmungsrate des Stammes SC^{plus}

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Transkription der Gene des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes auch zu einer erhöhten Proteinmenge führte, wurden Sauerstoffverbrauchsraten und der Cytochrom-Gehalt des *C. glutamicum* Wildtyps und des SC^{plus}-Stammes untersucht. Die Sauerstoffverbrauchsraten nicht-wachsender Zellen wurden mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ ermittelt. In der Messzelle befand sich mit Luft gesättigter Puffer mit 10 mM Glucose als Substrat. Die Messung wurde durch die Zugabe von Zellen gestartet. Die Abnahme des Sauerstoffs wurde über die Zeit ermittelt und die Rate in Bezug auf die Gesamt-Proteinmenge berechnet (Tabelle 6-2).

Exponentiell wachsende Zellen des Stammes SC^{plus} wiesen eine um ca. 30 % höhere Sauerstoffverbrauchsrate auf als der Wildtyp, besaßen also eine erhöhte Atmungskapazität. Allerdings bleibt unklar, ob diese erhöhte Rate auf erhöhten Mengen an Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex, an Cytochrom-*bd*-Oxidase, oder beider Komplexe beruht. In der stationären

Phase konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden. Dies deutete darauf hin, dass im Stamm SC^{plus} in dieser Phase nicht mehr Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex oder Cytochrom-*bd*-Oxidase als im Wildtyp vorhanden war.

Tabelle 6-2: Sauerstoffverbrauchsrate von Zellen des *C. glutamicum* Wildtyps und des Stammes SC^{plus} in der exponentiellen und der stationären Phase gemessen in einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ. MOPS-Kaliumphosphat-Puffer und 10 mM Glucose wurden vorgelegt und die Messung nach der Zugabe der Zellen gestartet. Es wurden auch Messungen ohne Glucose durchgeführt, mit frischen Zellen und Zellen, welche für mehrere Stunden ohne Kohlenstoffquelle inkubiert wurden (ausgehungerte Zellen). Die Berechnung der Raten erfolgte nach der Annahme, dass 1 g Zellen 0,5 g Protein enthalten.

Stamm	nmol O ₂ konsumiert mg _{Protein} ⁻¹ min ⁻¹					
	exponentielle Phase					
	+ Glucose	n	- Glucose	n	ausgehungerte Zellen	n
WT	138 ± 8	4	60 ± 8	6	27 ± 4	3
SC ^{plus}	183 ± 25	4	84 ± 18	4	22 ± 1	2
	nmol O ₂ konsumiert mg _{Protein} ⁻¹ min ⁻¹					
	stationäre Phase					
	+ Glucose	n	- Glucose	n	ausgehungerte Zellen	n
WT	120 ± 24	3	52 ± 9	5	40 ± 3	3
SC ^{plus}	135 ± 10	3	40	1	n/a	n/a

Auch Zellen, welche ohne Glucose im Puffer vermessen wurden, zeigten eine Sauerstoffverbrauchsrate, welche sich zwischen den Stämmen innerhalb des experimentellen Fehlers aber nicht unterschied. Diese endogene Atmung machte etwa 40 % der Sauerstoffverbrauchsrate in Anwesenheit von Glucose aus und ist wahrscheinlich auf den Abbau von Speicherstoffen zurückzuführen. Diese hohe endogene Atmung wurde bereits früher beschrieben (Nantapong *et al.*, 2004). Bei dem Speicherstoff handelt es sich höchstwahrscheinlich um Glykogen (Seibold *et al.*, 2007). Die Abbaurate des Speicherstoffs war hierbei möglicherweise der ratenlimitierende Schritt, sodass die endogene Atmungsrate sich zwischen den beiden Stämmen nicht unterschied. Die Sauerstoffverbrauchsrate wurde auch von Zellen vermessen, welche für mehrere Stunden ohne Kohlenstoffquelle bei 30 °C inkubiert worden waren, um zu überprüfen, ob der Speicherstoff abgebaut wurde. Sie zeigten eine deutlich reduzierte Sauerstoffverbrauchsrate.

6.1.5 Untersuchungen zum Cytochrom-Gehalt des Stammes SC^{plus}

Zum Vergleich des Cytochrom-Gehalts von *C. glutamicum* Wildtyp und Stamm SC^{plus} wurden Spektren intakter Zellen beider Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase und

in der stationären Phase aufgenommen und miteinander verglichen (Abbildung 6-6). Die entsprechenden Zellsuspensionen wurden mit Dithionit reduziert.

Wie erwartet konnten in beiden Stämmen Absorptionsmaxima bei den erwarteten Wellenlängen festgestellt werden. In der exponentiellen Wachstumsphase war deutlich mehr Cytochrom *c* und *a* im Stamm SC^{plus} festzustellen, während der Unterschied bei Cytochrom *b* nicht sehr deutlich war. In der stationären Phase waren die Unterschiede zwischen beiden Stämmen nicht sehr deutlich. Der Wildtyp zeigte in dieser Phase mehr Cytochrom *b*, SC^{plus} mehr Cytochrom *c* und *a*.

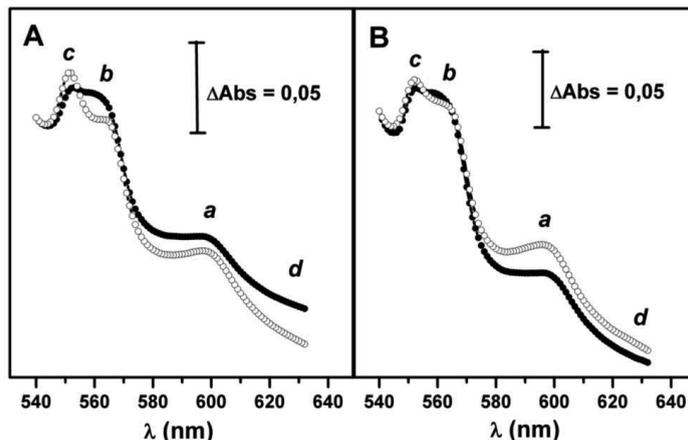


Abbildung 6-6: Spektren Dithionit-reduzierter Zellen ($OD_{600} = 100$) des *C. glutamicum* Wildtyps (geschlossene Punkte) und des Stammes SC^{plus} (offene Punkte) aus der exponentiellen Phase bei $OD_{600} = 5$ (A) und aus der stationären Phase nach 24 h (B). Die Zellen wurden aerob in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert, geerntet und in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung zu einer OD_{600} von 100 resuspendiert. Die Absorptionsmaxima der *a*-, *b*-, *c*- und *d*-Typ-Cytochrome liegen bei 600, 562, 552 und 630 nm.

Nach der Isolierung der Membranen von beiden Stämmen wurden reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektren aufgenommen, wobei die Reduktion mit Dithionit erfolgte und die Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (Abbildung 6-7). Für eine quantitative Abschätzung der Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem SC^{plus}-Stamm wurde folgende Absorptionsdifferenzen berechnet: für Cytochrom *c* 552 – 540 nm, für Cytochrom *b* 562 – 580 nm und für Cytochrom *a* 600 – 580 nm. Im Fall von Cytochrom *d* konnte aufgrund der Kurvenverläufe kein geeignetes Absorptionsminimum definiert werden, weshalb in diesem Fall keine quantitative Auswertung erfolgte.

In der exponentiellen Phase enthielten die Membranen des SC^{plus}-Stammes 34 % mehr Cytochrom *b*, 87 % mehr Cytochrom *c* und 112 % mehr Cytochrom *a*, als die des Wildtyps. In der stationären Phase befanden sich in Membranen des Stammes SC^{plus} 31 % mehr Cytochrom *c* und 18 % weniger Cytochrom *b*. Aufgrund des Kurvenverlaufs ließ sich

die Menge an Cytochrom *a* nicht vergleichend berechnen. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der Stamm SC^{plus} in der exponentiellen Phase mehr Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex in der Membran vorliegt als der Wildtyp.

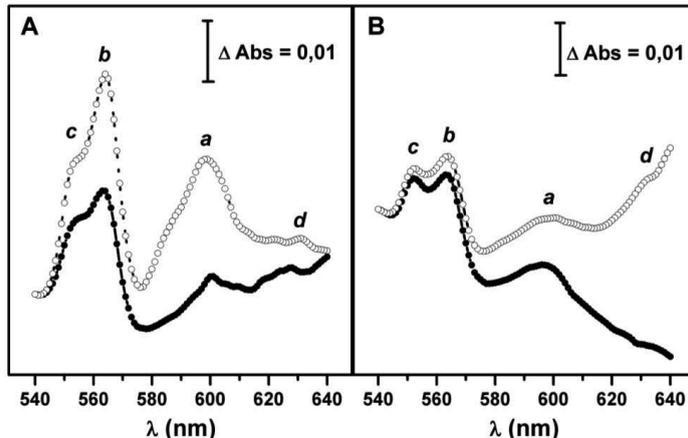


Abbildung 6-7: Differenzspektren Dithionit-reduzierter-minus-Ferricyanid-oxidierter Membranen (je 5 mg ml⁻¹ Membranprotein) des *C. glutamicum* Wildtyps (geschlossene Punkte) und des Stammes SC^{plus} (offene Punkte) aus der exponentiellen Phase bei OD₆₀₀ = 5 (A) und aus der stationären Phase nach 24 h (B). Die Membranen wurden aus Zellen isoliert, die aerob in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert wurden. Die Absorptionsmaxima der *a*-, *b*-, *c*- und *d*-Typ-Cytochrome liegen bei 600, 562, 552 und 630 nm.

Als weitere Methode zum qualitativen Nachweis eines erhöhten Cytochrom-*c*-Gehalts im Stamm SC^{plus} wurde eine Häm-färbung durchgeführt. Dazu wurden Proben der isolierten Membranen aus *C. glutamicum* Wildtyp, dem Stamm SC^{plus} und dem DOOR-Stamm, der Deletionen der Gene *cydAB* und *qcrCAB* enthält (Koch-Körffges, 2011; Koch-Körffges *et al.*, 2013), auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch bei 4 °C aufgetrennt. Es wurden jeweils gleiche Mengen an Membranprotein (100 µg) pro Gelspur eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine wurde eine Färbung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durchgeführt. Die Häm-färbung basiert auf der intrinsischen Peroxidase-Aktivität von Häm-Gruppen (Francis & Becker, 1984; Thomas *et al.*, 1976). Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sollten nur *c*-Typ-Cytochrome angefärbt werden, da nur bei ihnen die Hämgruppe kovalent an das Protein gebunden ist. Demgegenüber sollten *a*-, *b*- und *d*-Typ-Cytochrome nicht angefärbt werden, da die Hämgruppe aufgrund der Denaturierung nicht mehr am Protein gebunden sein sollte.

Überraschenderweise wurden mehrere Banden mit der gewählten Methode angefärbt (Abbildung 6-8). In *C. glutamicum* gibt es nur ein *c*-Typ Cytochrom, nämlich QcrC (Niebisch & Bott, 2001). Dieses hat eine Größe von 30 kDa und es wurde erwartet nur eine Bande dieser Größe anzufärben. Bei der Bande bei ca. 25 kDa handelt es sich aller

ERGEBNISSE

Wahrscheinlichkeit nach um QcrC, da sie im DOOR-Stamm mit deletiertem *qcrC*-Gen fehlt. Es wurde bereits beschrieben, dass QcrC in SDS-Polyacrylamidgelen eine geringere apparente Masse zeigt als die berechnete (Sone *et al.*, 2001). Eine Identifizierung des Proteins war mittels MALDI-TOF-MS nicht möglich, vermutlich da die Bande nicht sehr distinkt war. Es ließ sich erkennen, dass die 25 kDa-Bande in der exponentiellen Phase im SC^{plus}-Stamm deutlich stärker ausgeprägt war als im Wildtyp. Dies unterstützt die vorherigen Befunde aus den Differenzspektren. Auch in der stationären Phase schien die QcrC-Bande etwas stärker zu sein als im Wildtyp, jedoch waren die Unterschiede nicht sehr deutlich.

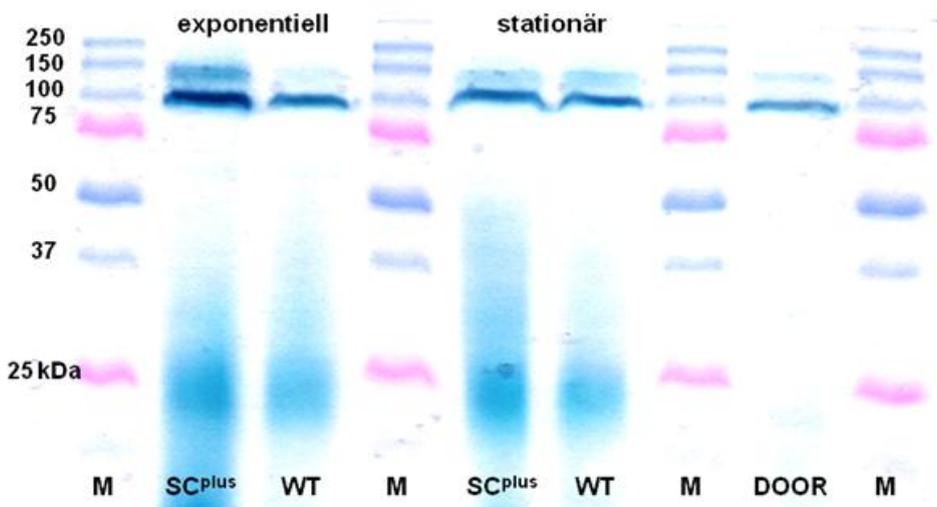


Abbildung 6-8: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-gefärbtes 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit je 100 µg Membranprotein des *C. glutamicum* Wildtyps (WT) und der Mutanten SC^{plus} und DOOR. Als Größenmarker wurde der Precision Plus Dual Color Protein Standard (BioRad) verwendet. Die Membranen wurden aus Zellen isoliert, welche in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert worden waren. Zellen aus der exponentiellen Phase wurden bei einer OD₆₀₀ von 5 geerntet, Zellen aus der stationären Phase nach 24 h.

Zwei weitere Banden bei ca. 100 kDa und 125 kDa wurden in allen Stämmen angefärbt. Diese Banden waren in der exponentiellen Phase ebenfalls deutlich stärker im Stamm SC^{plus} ausgeprägt, als im Wildtyp. Beide Banden traten auch beim DOOR-Stamm auf. Mittels MALDI-TOF-MS konnte die Bande bei ca. 100 kDa als CtaC identifiziert werden. Die theoretische Masse von CtaC ist 40 kDa. Die Untereinheit des Superkomplexes CtaC enthält Kupfer als Cofaktor. Komplexierte Kupferionen sind bekannt dafür, eine Peroxidaseaktivität zu besitzen (Pugia *et al.*, 2000), was ursächlich für die Anfärbung sein könnte. Möglicherweise enthält die Bande jedoch noch mehr Untereinheiten der Cytochrom-*aa*₃-Oxidase, welche nicht mittels MALDI-TOF-MS identifiziert wurden. Dies könnte erklären, warum die apparente Masse der Bande deutlich höher ist, als die Masse von CtaC. Es

könnte sein, dass die Cytochrom-*aa*₃-Oxidase durch die experimentellen Bedingungen nicht denaturiert wurde, sodass möglicherweise auch Häm *a* nicht durch die Denaturierung vom Protein getrennt wurde. Sollte dies der Fall sein, so könnte auch die Peroxidaseaktivität von Häm *a* für die Färbung der Bande verantwortlich sein. Die schwächere Bande knapp bei ca. 125 kDa konnte nicht mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden.

Da β -Mercaptoethanol bzw. DTT die Häm-Färbung negativ beeinflussen (Francis & Becker, 1984), wurde ein Probenpuffer ohne diese Substanzen verwendet. Außerdem wurden die Membranproteine nur 10 min bei Raumtemperatur mit dem Probenpuffer inkubiert und nicht bei hohen Temperaturen denaturiert, denn dies beeinflusst die Färbung ebenfalls negativ (Daten nicht gezeigt). Wegen dieser Bedingungen ist es möglich, dass die Proteine nicht korrekt nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten, bzw. große Proteinkomplexe nicht vollständig in ihre Einzelproteine aufgetrennt wurden.

6.1.6 Der Einfluss der erhöhten Menge Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex auf die Lysinproduktion des Lysin-Produktionsstammes DM1945

In früheren Arbeiten war gezeigt worden, dass eine Deletion der Cytochrom-*bd*-Oxidase in dem Lysinproduzenten MH20-22B zu einer erhöhten Lysinbildung führte, vermutlich da der Elektronenfluss ausschließlich über den effizienteren Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex geleitet wurde. Hierdurch wurde weniger Glucose für die Energiestoffwechsel benötigt und somit stand mehr Glucose für die Lysin-Bildung zur Verfügung (Kabus *et al.*, 2007). Daher sollte untersucht werden, ob eine verstärkte Synthese des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Lysin-Bildung hatte. Dazu wurden die bereits für den Wildtyp beschriebenen Promotoraustausche von *ctaD*, *ctaC* und *ctaE* auch in den Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* DM1945 eingeführt und dadurch der Stamm DM1945 SC^{plus} erhalten.

In einem Laborfermentersystem der Firma Infors (Basel, Schweiz) wurden der Ausgangsstamm DM1945 und der Stamm DM1945 SC^{plus} in CGXII-Minimalmedium ohne MOPS mit 4 % (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle bei einem konstantem pH-Wert von 7 und einer konstanten Gelöstsauerstoff-Konzentration von 10 % Luftsättigung kultiviert (Abbildung 6-9).

Der Stamm DM1945 SC^{plus} erreichte eine etwas geringere finale Biomasse, als der Ausgangsstamm (SC^{plus} 36,6 ± 2,8; DM1945 38,9 ± 2,0), wobei die Wachstumsrate der beiden Stämme vergleichbar war (SC^{plus} 0,25 ± 0,01 h⁻¹; DM1945 0,24 ± 0,02 h⁻¹). Beide Stämme produzierten jedoch die gleiche Menge Lysin (DM1945 17,3 ± 0,9 mM (n = 3); SC^{plus} 17,4 mM (n = 2)). Es wurden auch Kultivierungen bei einer Gelöstsauerstoff-Konzentration von 1 % Luftsättigung durchgeführt. Die Wachstumsrate (SC^{plus} 0,22 ± 0,02 h⁻¹; DM1945 0,22 ± 0,01 h⁻¹) und die Biomassebildung beider Stämme war vergleichbar (SC^{plus} 37,3 ± 2,5;

DM1945 $36,9 \pm 1,6$). Bei diesem Experiment gab es ebenfalls keine Verbesserung der Lysinproduktion im Stamm DM1945 SC^{plus} (SC^{plus} $19,7 \pm 3,2$ mM; DM1945 $23,4 \pm 2,0$ mM). Die Überproduktion des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes konnte somit die Lysinbildung unter diesen Bedingungen nicht verbessern.

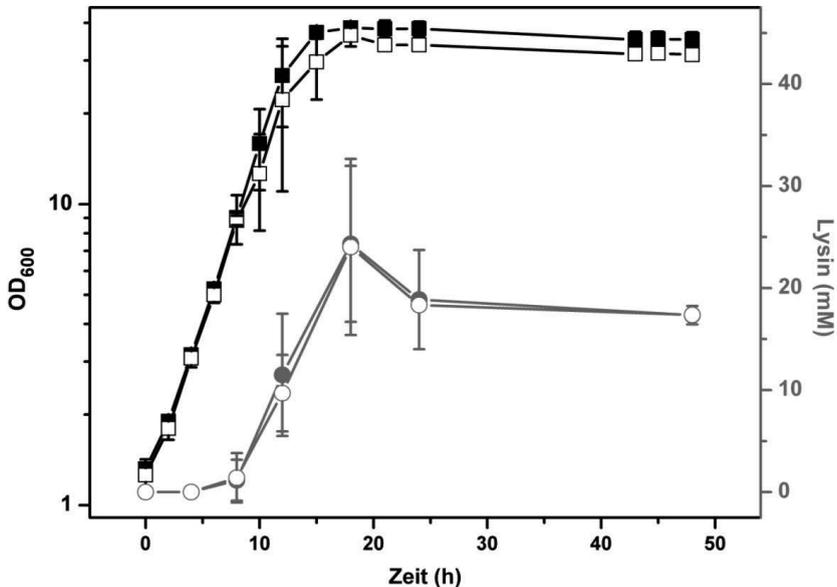


Abbildung 6-9: Wachstum (Quadrate) und Lysinproduktion (Punkte) bei einer Fermentation von *C. glutamicum* DM1945 (gefüllte Symbole) und DM1945 SC^{plus} (offene Symbole) in 700 ml CGXII-Minimalmedium ohne MOPS mit 4 % (w/v) Glucose bei konstanten 10 % Gelöstsauerstoff. Es wurden je drei unabhängige Experimente durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Beim Stamm SC^{plus} sind die Daten ab 21 h der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

6.2 Einfluss einer veränderten Expressionsstärke der F₁F₀-ATP-Synthase-Gene - der Stamm P_{t_{ur}}F₁F₀

Die F₁F₀-ATP-Synthase aus *C. glutamicum* wird in einem Operon kodiert. Um sie überzuexprimieren, wurde der native Promotor des Operons gegen den Promotor P_{t_{ur}} chromosomal ausgetauscht und dadurch der Stamm *C. glutamicum* ΔP_{atpB}::P_{t_{ur}} erhalten, im Folgenden P_{t_{ur}}F₁F₀ genannt. Das Wachstumsverhalten und der Sauerstoffverbrauch von P_{t_{ur}}F₁F₀ wurde während einer Kultivierung im Schüttelkolben in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose untersucht und mit dem Wildtyp verglichen (Abbildung 6-10). Der Stamm P_{t_{ur}}F₁F₀ wies einen Wachstumsdefekt gegenüber dem Wildtyp auf. Die Wachstumsrate μ entsprach mit $0,37 \pm 0,03$ h⁻¹ der des Wildtyps (Wachstumsrate μ Wildtyp $0,37 \pm 0,01$ h⁻¹), jedoch zeigte P_{t_{ur}}F₁F₀ eine lag-Phase von ca. 2 h, die beim Wildtyp nicht vorhanden war. P_{t_{ur}}F₁F₀ erreichte eine maximale OD₆₀₀ von $52,1 \pm 5,6$, der Wildtyp von $55,7 \pm 1,7$. Das

Wachstum von $P_{tur}F_1F_0$ verlangsamte sich gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase deutlich im Vergleich zum Wildtyp. Der Gelöstsauerstoff erreichte beim Wildtyp und bei $P_{tur}F_1F_0$ gleichzeitig den Nullwert, was auf eine erhöhte Atmungsrate von $P_{tur}F_1F_0$ hindeutete.

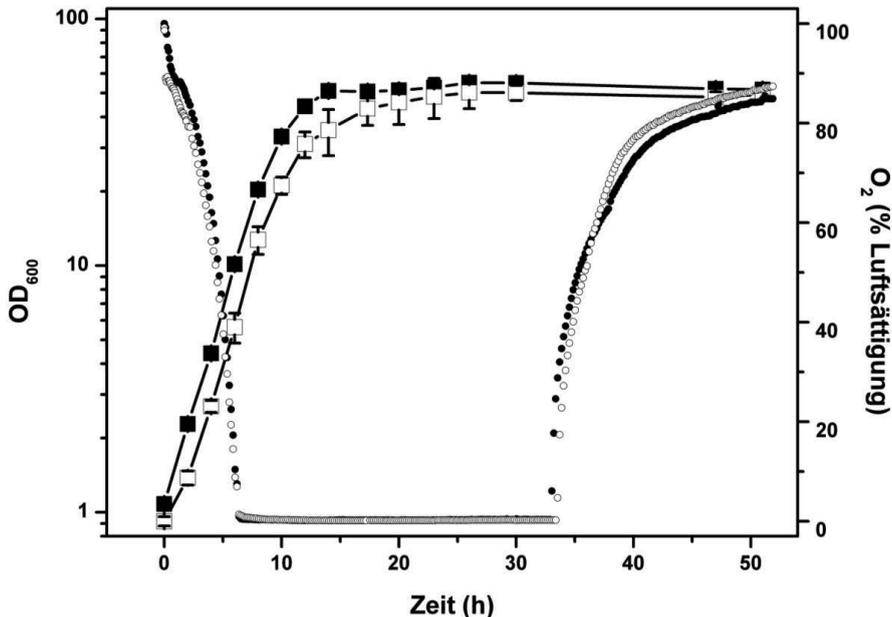


Abbildung 6-10: Wachstum (Quadrats) und Gelöstsauerstoff (Punkte) von *C. glutamicum* Wildtyp (gefüllte Symbole) und dem Stamm $P_{tur}F_1F_0$ (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Für das Wachstum wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und aufgetragen, beim Gelöstsauerstoff wurde ein repräsentatives Resultat aus drei unabhängigen Kultivierungen ausgewählt.

Beide Stämme wurden auch im Mikrotitermaßstab (800 μ l Kulturvolumen) im BioLector kultiviert, wobei neben der Biomassebildung auch der pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration automatisch gemessen wurden. Hierbei wurden 2 % (w/v) Glucose oder 2 % (w/v) Acetat als Kohlenstoffquelle in CGXII-Minimalmedium eingesetzt.

Im Gegensatz zum Schüttelkolben zeigte sich im Mikrotitermaßstab beim Wachstum des Stammes $P_{tur}F_1F_0$ auf Glucose keine lag-Phase (Abbildung 6-11 A und B). Der Stamm wuchs jedoch deutlich langsamer als der Wildtyp und erreichte auch nicht die gleiche Biomasse (Abbildung 6-11 A). $P_{tur}F_1F_0$ säuerte das Medium geringfügig stärker an, als der Wildtyp, wobei der pH-Wert gegen Ende des Wachstums einen höheren Wert erreichte als der Wildtyp und dieser vergleichsweise langsam wieder fiel. Aufgrund des verlangsamten Wachstums wurde der Gelöstsauerstoff auch langsamer verbraucht. Da nur 2 % (w/v) Glucose eingesetzt wurden und somit die Biomassebildung geringer war als im Schüttelkolben, erreichten die Stämme keine Sauerstofflimitierung. Der Promotoraustausch des F_1F_0 -ATP-Synthase-Operons verschlechterte das Wachstum auf Glucose.

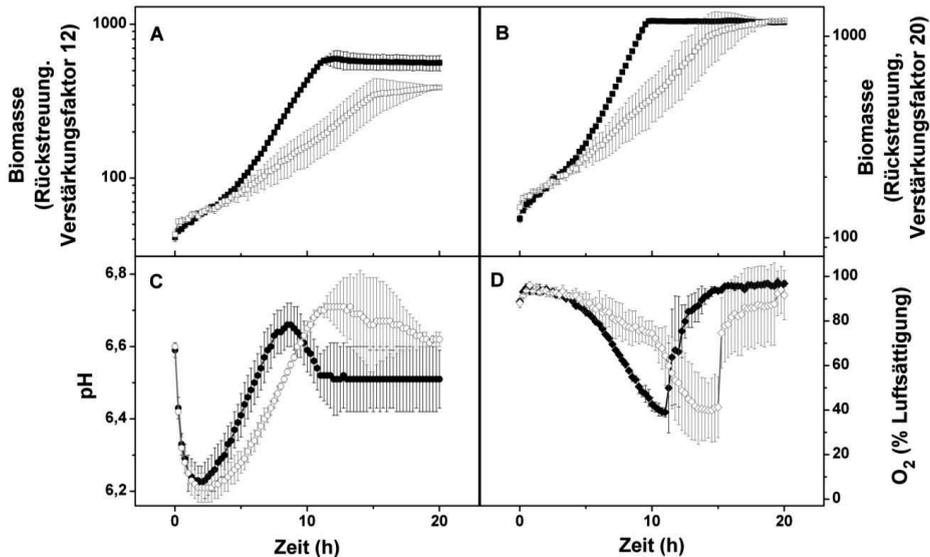


Abbildung 6-11: Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp (geschlossene Symbole) und $P_{turF_1F_O}$ (offene Symbole) im 800 μ l-Maßstab im BioLector in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle, (A) Biomasse (Rückstreuung, Verstärkungsfaktor 12) (B) Biomasse (Rückstreuung, Verstärkungsfaktor 20) (C) pH-Wert, (D) Gelöstsauerstoffkonzentration. Für das Wachstum, den pH-Wert und den Gelöstsauerstoffverlauf wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und abgebildet.

Das Wachstum der Stämme auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle wurde untersucht, da die F_1F_O -ATP-Synthase essentiell für das Wachstum auf Acetat ist (Koch-Körfges *et al.*, 2012). Eine veränderte Expression der F_1F_O -ATP-Synthase hat möglicherweise einen Einfluss auf die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung.

Im Gegensatz zum *C. glutamicum* Wildtyp zeigte der Stamm $P_{turF_1F_O}$ nur ein sehr geringes Wachstum auf Acetat als Kohlenstoffquelle (Abbildung 6-12 A und B). Der pH-Wert stieg jedoch langsam an, was auf eine Verstoffwechslung des Acetats schließen ließ (Abbildung 6-12 C). Der Verbrauch des Sauerstoffs durch den Stamm $P_{turF_1F_O}$ lag unter dem Eintrag von Sauerstoff in das Medium, sodass der Wert des Gelöstsauerstoffs bei $P_{turF_1F_O}$ nicht sank (Abbildung 6-12 D). Dass der Stamm $P_{turF_1F_O}$ deutliche Schwierigkeiten beim Wachstum auf Acetat hatte, deutete darauf hin, dass die oxidative Phosphorylierung schlechter betrieben werden konnte, als beim Wildtyp. Das Wachstum auf Acetat sollte nochmals im Schüttelkolben untersucht werden.

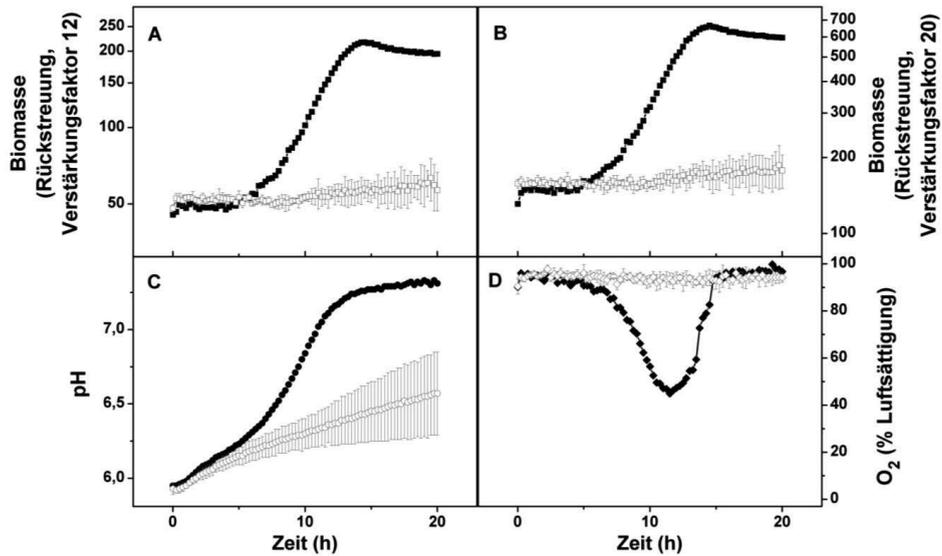


Abbildung 6-12: Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp (geschlossene Symbole) und $P_{turF_1F_0}$ (offene Symbole) im Mikrotiter-Maßstab im BioLector in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Acetat als Kohlenstoffquelle, (A) Biomasse (Rückstreuung, Verstärkungsfaktor 12) (B) Biomasse (Rückstreuung, Verstärkungsfaktor 20) (C) pH-Wert, (D) Gelöstsauerstoffkonzentration. Für das Wachstum, den pH-Wert und den Gelöstsauerstoffverlauf des Stammes $P_{turF_1F_0}$ wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und abgebildet. Für den Wildtyp ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten abgebildet.

Um festzustellen, ob im Stamm $P_{turF_1F_0}$ eine veränderte Transkription der F_1F_0 -ATP-Synthase-Gene stattfand, wurden während einer Kultivierung im Schüttelkolben in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose bei einer OD_{600} von 5 Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und mittels DNA-Microarrays das Transkriptom mit dem des Wildtyps vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-3 zusammengefasst. Es wurden 7 Gene im Stamm $P_{turF_1F_0}$ mehr als zweifach vermehrt transkribiert. Hierbei handelte es sich um die Gene für eine menachinonabhängige Laktatdehydrogenase LldD, das Transposasefragment cg1513, einen putativen membrangebundenen Proteasemodulator cg3138, die mögliche DNA-3-Methyladenin-Glycosylase I und die Gene der hypothetischen Proteine cg3139 und cg4005. Alle diese Gene wiesen einen 2,0 bis 2,8-fach erhöhten mRNA-Spiegel im Stamm $P_{turF_1F_0}$ auf. 20 Gene wiesen im Stamm $P_{turF_1F_0}$ einen mehr als zweifach signifikant erniedrigten Transkriptspegel auf. Überraschenderweise wurde die Transkription der Gene des *atp*-Operons durch den Austausch des nativen Promotors gegen den Promotor P_{tur} um etwa 50 % reduziert und nicht, wie ursprünglich geplant, verstärkt. Dies weist darauf hin, dass der P_{tur} -Promotor unter den untersuchten Bedingungen schwächer ist als der native Promotor P_{atpB} . Die erniedrigte Transkription der F_1F_0 -ATP-Synthase-Gene im Stamm

$P_{tur}F_1F_0$ liefert eine mögliche Erklärung für das extrem schlechte Wachstum auf Acetat. Allerdings ist ein so drastischer Effekt durch die Reduktion der Transkription des *atp*-Operons um den Faktor zwei dennoch erstaunlich.

Tabelle 6-3: Ergebnisse der globalen Transkriptomanalyse des Stammes $P_{tur}F_1F_0$ im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp bei einer OD_{600} von 5. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert. Dargestellt sind alle Gene, deren mRNA-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp mindestens 2-fach verändert vorlagen. Als statistisch signifikant verändert wurden die Gene angesehen, deren *p*-Wert $\leq 0,05$ war. Ergänzt wurden *atpD* und *atpC*, deren *p*-Wert $> 0,05$ betrug, daher wurde der Wert unterstrichen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

cg-Nummer	Gename, Annotation	mRNA-Verhältnis $P_{tur}F_1F_0$ / WT
F_1F_0-ATP-Synthase		
cg1362	<i>atpB</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE a	0,37
cg1363	<i>atpE</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE c	0,49
cg1364	<i>atpF</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE b	0,51
cg1365	<i>atpH</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE δ	0,44
cg1366	<i>atpA</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE α	0,45
cg1367	<i>atpG</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE γ	0,44
cg1368	<i>atpD</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE β	<u>0,54</u>
cg1369	<i>atpC</i> , F_1F_0 -ATP-Synthase UE ϵ	<u>0,51</u>
Kohlenstoffstoffwechsel		
cg0828	putative Dihydrofolatereduktase	0,33
cg0829	Lactoylglutathion-Lyase oder verwandte Lyase	0,30
cg0830	Membranprotein	0,26
cg0831	<i>tusG</i> , Zucker ABC-Transporter, Permeaseprotein	0,20
cg0832	<i>tusF</i> , ABC-Transporter, Membranprotein, Threaloseaufnahme	0,24
cg0833	putatives Membranprotein, involviert in Threaloseaufnahme	0,25
cg3107	<i>adhA</i> , Zn-anhängige Alkoholdehydrogenase	0,37
cg3227	<i>lldD</i> , chinonabhängige L-Laktatdehydrogenase LldD	2,04
Transporter		
cg1109	<i>porB</i> , Anionen-spezifischer Porin-Vorläufer	0,39
cg3395	<i>proP</i> , Prolin/Ectoin-Transporter	0,44
sonstige Funktionen		
cg0134	Hydrolase, AMA/HIPO/HYUC-Familie	0,49
cg0838	Helicase	0,42
cg1513	<i>tnp23a</i> (ISCg23a), Transposase Fragment	2,03
cg3138	<i>ppmA</i> , putativer mebrangebundener Proteasemodulator	2,84
cg3140	<i>tagA1</i> , mögliche DNA-3-Methyladenin-Glycosylase I	2,67
hypothetische und uncharakterisierte Proteine		
cg0107	sekretiertes Protein	0,49
cg0837	hypothetisches Protein	0,37
cg0839	hypothetisches Protein	0,36
cg1514	sekretiertes Protein	2,70
cg3139	hypothetisches Protein	2,49
cg4005	putatives sekretiertes Protein	2,23

6.3 Versuche zur heterologen Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* in *C. glutamicum*

Zur funktionellen Synthese der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* in *C. glutamicum* wurden, wie in der Zielsetzung erläutert, neben den Genen für die Oxidase (*fixNOQP*) auch Gene für akzessorische Proteine benötigt, welche an der Cofaktorbereitstellung und am Zusammenbau der Oxidase beteiligt sind (*fixGHIS*). Zur Expression wurden die Operons ausgehend von chromosomaler DNA von *B. japonicum* amplifiziert und in Expressionsvektoren kloniert, wie in Material und Methoden beschrieben. Anschließend wurden der *C. glutamicum* Wildtyp und die Δ *cydAB*-Mutante sequenziell mit den beiden Vektoren transformiert. Beide Ausgangsstämme wurden auch mit den beiden Leervektoren pEKEx2 und pVWEx2 als Kontrolle transformiert.

Das Wachstumsverhalten des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fixNOQP* pVWEx2-*fixGHIS* und die entsprechende Leervektorkontrolle *C. glutamicum* pEKEx2 pVWEx2 wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose im Schüttelkolben untersucht. Dem Medium wurde entsprechend der Resistenzgene auf den Vektoren Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt. Neben der OD₆₀₀ wurde auch der Verlauf des Gelöstsauerstoffs im Medium mittels des SFR-Systems untersucht (Abbildung 6-13).

C. glutamicum pEKEx2-*fixNOQP* pVWEx2-*fixGHIS* und *C. glutamicum* pEKEx2 pVWEx2 zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten ($\mu = 0,33 \pm < 0,01$ bzw. $0,34 \pm < 0,01$; maximale OD₆₀₀ = $54,5 \pm 5,9$ bzw. $52,1 \pm 1,2$). Auch der Verlauf der Gelöstsauerstoff-Konzentration war vergleichbar und näherte sich bei beiden Stämmen nach ca. 8 h dem Nullpunkt.

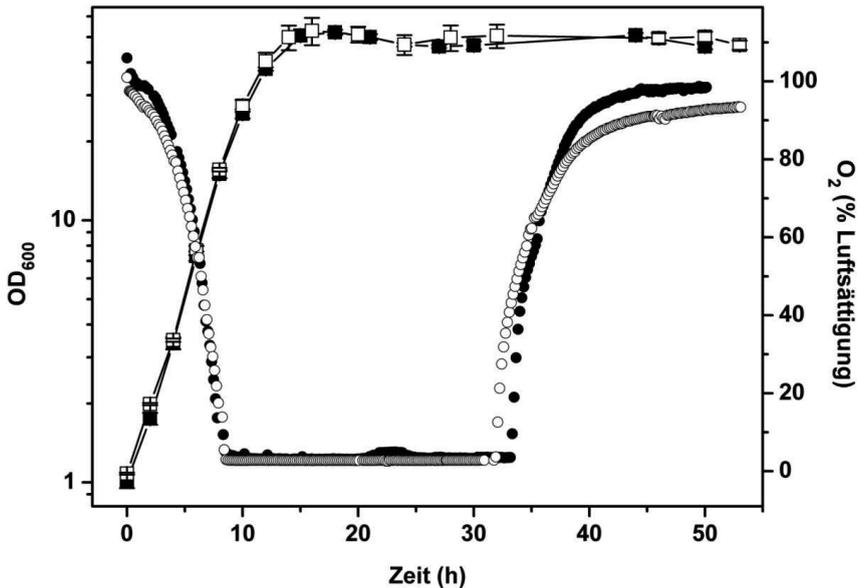


Abbildung 6-13: Wachstum (Quadrate) und Gelöstsauerstoff-Konzentration (Punkte) von *C. glutamicum* Wildtyp pEKEx2 pVWEx2 (gefüllte Symbole) und Wildtyp pEKEx2-fixNOQP pVWEx2-fixGHIS (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin und $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tetracyclin. Für das Wachstum wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und abgebildet, beim Gelöstsauerstoff wurde ein repräsentatives Experiment aus den drei unabhängigen Kultivierungen ausgewählt.

Auch das Wachstumsprofil der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Deletionsmutante ΔcydAB mit den Expressionsvektoren für die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase wurde im Vergleich zur Leervektorkontrolle in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose im Schüttelkolben untersucht. Neben der OD_{600} wurde auch der Verlauf der Gelöstsauerstoff-Konzentration mittels des SFR-Systems untersucht (Abbildung 6-14). *C. glutamicum* ΔcydAB pEKEx2-fixNOQP pVWEx2-fixGHIS wuchs mit der gleichen Wachstumsrate wie die Leervektorkontrolle *C. glutamicum* ΔcydAB pEKEx2 pVWEx2 ($\mu = 0,33 \pm 0,01$). Beide Stämme erreichten auch eine vergleichbare Biomasse ($OD_{600} = 51,5 \pm 0,6$ für *C. glutamicum* ΔcydAB pEKEx2-fixNOQP pVWEx2-fixGHIS bzw. $54,0 \pm 1,6$ für *C. glutamicum* ΔcydAB pEKEx2 pVWEx2). Ohne die Zugabe von IPTG zur Induktion der Expression hatten die beiden Vektoren pEKEx2-fixNOQP und pVWEx2-fixGHIS keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten oder den Sauerstoffverbrauch von *C. glutamicum* Wildtyp oder ΔcydAB .

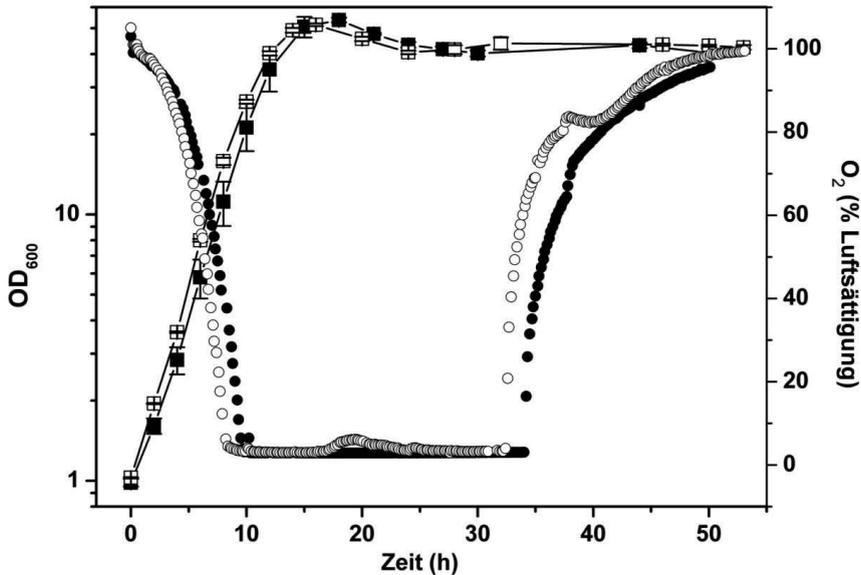


Abbildung 6-14: Wachstum (Quadrate) und Gelöstsauerstoff-Konzentration (Punkte) von *C. glutamicum* Δ cydAB pEKEEx2 pVWEx2 (gefüllte Symbole) und pEKEEx2-fixNOQP pVWEx2-fixGHIS (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 μ g ml⁻¹ Kanamycin und 3 μ g ml⁻¹ Tetracyclin. Für das Wachstum wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und abgebildet, beim Gelöstsauerstoff wurde ein repräsentatives Experiment aus den drei unabhängigen Kultivierungen ausgewählt.

In einem weiteren Experiment wurden die Stämme *C. glutamicum* Δ cydAB pEKEEx2-fixNOQP pVWEx2-fixGHIS und *C. glutamicum* Δ cydAB pEKEEx2 pVWEx2 in Gegenwart von 0,1 mM IPTG zur Induktion der Expression der heterologen Cytochrom-cbb₃-Oxidase kultiviert. Hierbei zeigte sich ein anderes Wachstumsverhalten. Während die Zugabe von IPTG keinen Einfluss auf den Stamm mit den Leervektoren hatte (nicht gezeigt), wurde das Wachstum von *C. glutamicum* Δ cydAB pEKEEx2-fixNOQP pVWEx2-fixGHIS für etwa 20 h gehemmt (Abbildung 6-15). Anschließend fing der Stamm an zu wachsen und erreichte eine ähnliche finale optische Dichte wie Kulturen ohne IPTG. Von den exponentiell wachsenden Zellen wurde eine Probe entnommen und in frisches Medium mit 0,1 mM IPTG überimpft. In diesem Fall wuchsen die Zellen sofort ohne lag-Phase weiter (nicht gezeigt). Es wurden drei Einzelkolonien der möglichen Suppressormutanten aus einer Kultivierung isoliert und erneut in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 0,1 mM IPTG kultiviert (Abbildung 6-15, gezeigt ist Mutante 1). Die Stämme wuchsen ohne lag-Phase, was darauf hindeutete, dass sie eine Suppressormutation trugen. Diese wurden genauer untersucht.

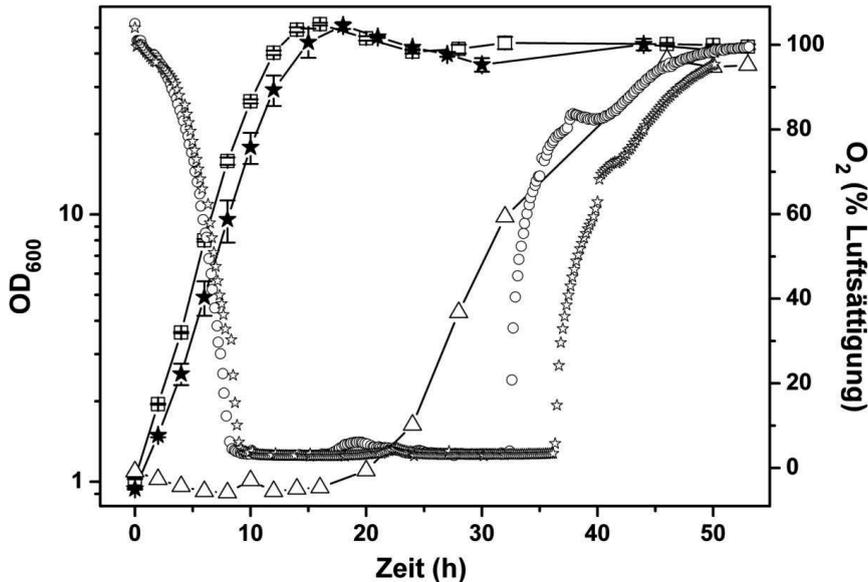


Abbildung 6-15: Wachstum (Symbole mit Linien) und Gelöstsauerstoff-Konzentration (Symbole ohne Linien) von *C. glutamicum* $\Delta cydAB$ pEKEx2-*fixNOQP* pVWEx2-*fixGHIS* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin, $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tetracyclin, einmal ohne IPTG (offene Quadrate und offene Punkte) und einmal mit 0,1 mM IPTG (offene Dreiecke). Mit gefüllten Sternen ist das Wachstum der Suppressormutante 1 in Medium mit 0,1 mM IPTG dargestellt, mit den offenen Sternen der Verlauf des Gelöstsauerstoffs. Für das Wachstum wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus je drei unabhängigen Experimenten ausgewertet und aufgetragen, beim Gelöstsauerstoff wurde ein repräsentatives Experiment aus den drei unabhängigen Kultivierungen ausgewählt.

Um einzugrenzen, welche Gene für die Wachstumshemmung in Gegenwart von 0,1 mM IPTG verantwortlich waren, wurden Wachstumsversuche mit Stämmen durchgeführt, die nur je einen der beiden Vektoren trugen. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose jeweils mit und ohne IPTG kultiviert. Das Medium enthielt entweder $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin (*C. glutamicum* $\Delta cydAB$ pEKEx2-*fixNOQP*) oder $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tetracyclin (*C. glutamicum* $\Delta cydAB$ pVWEx2-*fixGHIS*). Wie in Abbildung 6-16 dargestellt, zeigte nur der Stamm *C. glutamicum* $\Delta cydAB$ pVWEx2-*fixGHIS* eine ca. 20 h dauernde Wachstumshemmung in Gegenwart von 0,1 mM IPTG. Daraus wurde geschlossen, dass der Wachstumsdefekt auf die Expression eines oder mehrerer Gene des Operons *fixGHIS* zurückzuführen war.

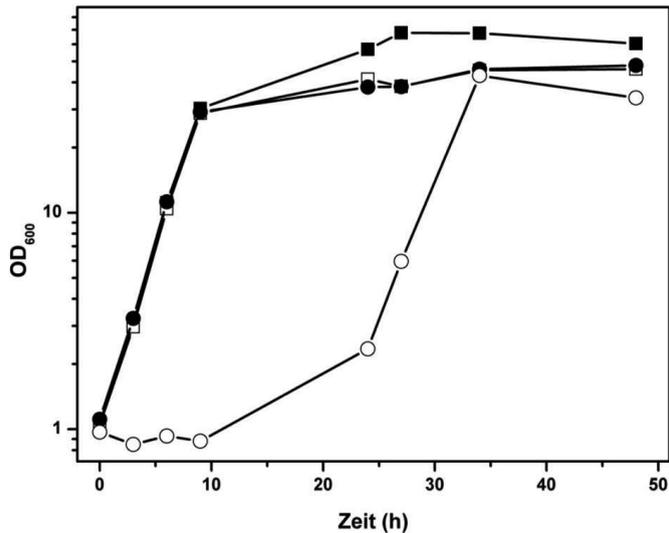


Abbildung 6-16: Wachstum von *C. glutamicum* Δ *cydAB* pEKEEx2-*fixNOQP* (Quadrate) und *C. glutamicum* Δ *cydAB* pVWEx2-*fixGHIS* (Punkte) ohne (gefüllt) und mit 0,1 mM IPTG (offen) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und entweder 25 μ g ml⁻¹ Kanamycin (pEKEEx2-*fixNOQP*) oder 3 μ g ml⁻¹ Tetracyclin (pVWEx2-*fixGHIS*). Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Kultivierungen. Die Abweichung betrug weniger als 6 % in der exponentiellen Phase und weniger als 15 % in der stationären Phase.

Zur Identifizierung der Suppressormutationen wurden die Plasmide der drei isolierten Einzelkolonien der Suppressormutanten aus *C. glutamicum* Δ *cydAB* pEKEEx2-*fixNOQP* pVWEx2-*fixGHIS* isoliert und die Plasmidmischung sequenziert. Die Plasmide der drei isolierten Stämme zeigten eine Punktmutation im Gen *fixG*, welche zu einem Stop-Codon an Codon-Position 67 führte (Q67STOP). Somit war in den Mutanten die Bildung eines vollständigen FixG-Proteins aus 488 Aminosäuren nicht mehr möglich. Anscheinend ist das intakte FixG-Protein für *C. glutamicum* toxisch. Da es aber für die Bildung der aktiven Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase essentiell ist (Preisig *et al.*, 1996a), war die funktionelle Synthese des Proteins in *C. glutamicum* nicht möglich.

6.4 Versuche zur Etablierung der anaeroben Nitrat-Ammonifikation in *C. glutamicum*

6.4.1 Das anaerobe Wachstum von *C. glutamicum*

Das anaerobe Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 in CGXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose als einziger Kohlenstoffquelle wurde untersucht. Es zeigte sich, dass *C. glutamicum* in CGXII-Minimalmedium ohne finalen Elektronenakzeptor ein geringes Potential für Wachstum besitzt. Nach 29 h war die OD₆₀₀ von $0,98 \pm 0,02$ auf $1,57 \pm 0,08$ angestiegen, nach 76 h auf $2,84 \pm 0,12$ (nicht gezeigt). In Medium mit 30 mM Kaliumnitrat als finalem Elektronenakzeptor war ein deutlich schnelleres Wachstum zu beobachten

(Abbildung 6-17), welches allerdings nach 14 h bei einer OD_{600} von $2,14 \pm 0,07$ beendet war. Nach diesem Zeitpunkt nahm die OD_{600} stetig ab. Nachdem das Wachstum beendet war, wurde weiterhin Nitrit gebildet, also waren die Zellen weiterhin metabolisch aktiv und Nitratatmung fand statt. Zum Zeitpunkt, als das Wachstum stoppte, waren ca. 20 mM Nitrit gebildet worden. Zu diesem Zeitpunkt war die Kohlenstoffquelle noch nicht verbraucht (Daten nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass die Akkumulation von Nitrit das Wachstum hemmte. Die Zugabe von 30 mM Kaliumnitrat als finalem Elektronenakzeptor führte zu einer Beschleunigung des Wachstums, aber zu einer Erniedrigung der Biomasseausbeute.

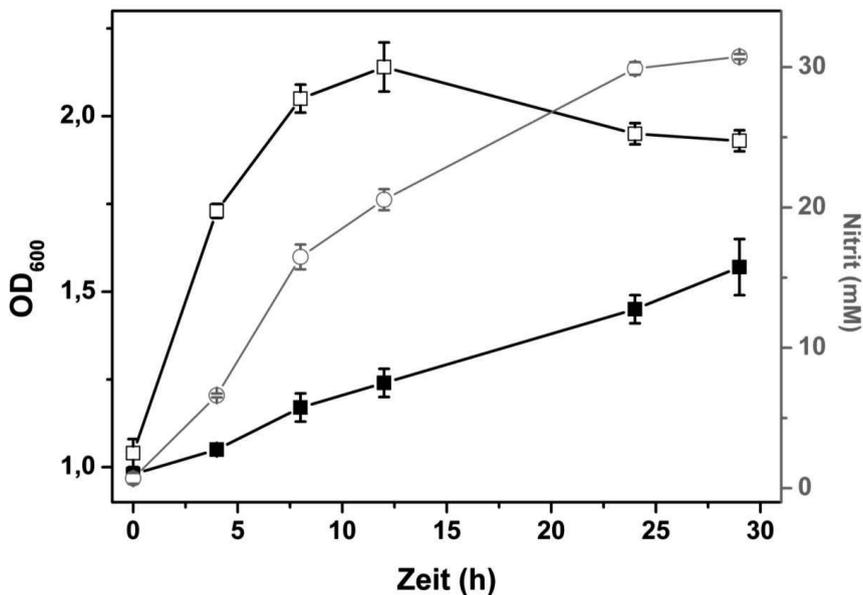


Abbildung 6-17: Wachstum (Quadrate) von *C. glutamicum* ATCC13032 bei der anaeroben Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose ohne Nitrat (gefüllte Quadrate) und mit 30 mM Nitrat als finalem Elektronenakzeptor (offene Quadrate). Die Nitritbildung bei der Kultivierung mit Nitrat (offene Kreise) wurde verfolgt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

6.4.2 Versuche zur Expression der Gene für die dissimilatorische Nitritreduktase Nrf aus *W. succinogenes* in *C. glutamicum*

Um den Abbau von Nitrit zu ermöglichen und das Wachstum unter anaeroben Bedingungen zu verbessern, wurden die Gene für die dissimilatorische Nitritreduktase Nrf aus *Wolinella succinogenes* amplifiziert, in das Expressionsplasmid pEKEx2 kloniert und *C. glutamicum* mit dem resultierenden Plasmid pEKEx2-nrfHAIJ transformiert. Um die Aktivität der Nitritreduktase zu überprüfen, wurde ein Wachstumsexperiment mit *C.*

glutamicum pEKEx2-*nrfHAIJ* und *C. glutamicum* pEKEx2 als Leervektorkontrolle unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Medium enthielt immer $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und mit 10 mM Nitrit kultiviert. Der Hauptkultur wurden 0,5 mM IPTG zur Induktion der Expression der Nitritreduktase zugegeben. Es zeigte sich, dass durch das Nitritreduktase-Expressionsplasmid ein Wachstumsdefekt ausgelöst wurde (Abbildung 6-18 A). Die Wachstumsrate war von $0,31 \pm 0,01$ für *C. glutamicum* pEKEx2 auf $0,22 \pm 0,01$ im Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*nrfHAIJ* reduziert. Die erreichte maximale OD₆₀₀ lag im Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*nrfHAIJ* bei $48,4 \pm 0,7$, während *C. glutamicum* pEKEx2 $65,7 \pm 2,7$ erreichte.

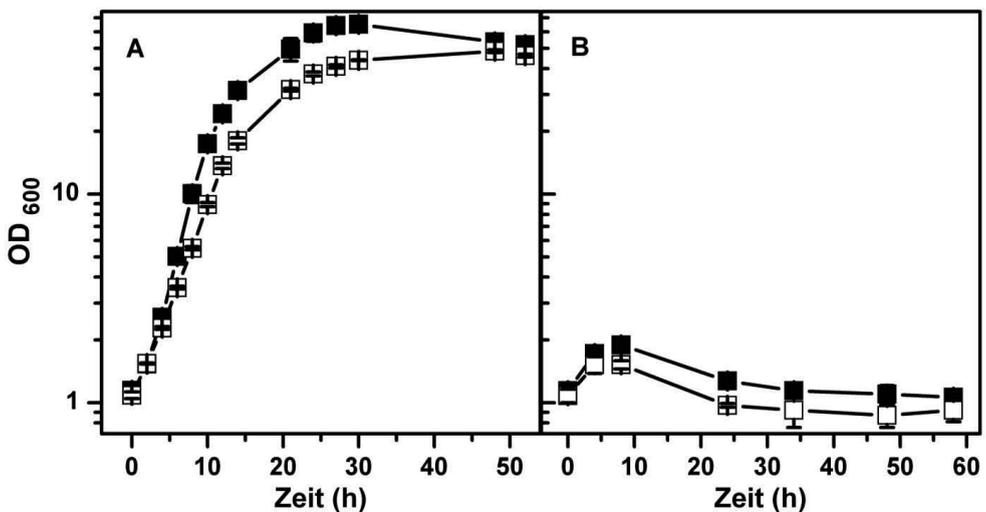


Abbildung 6-18: Aerobes Wachstum (Quadrate) von *C. glutamicum* pEKEx2 (geschlossene Symbole) und *C. glutamicum* pEKEx2-*nrfHAIJ* (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, sowie $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin und 0,5 mM IPTG. In (A) wurden dem Medium 10 mM Kaliumnitrit zugesetzt, in (B) war Nitrit die einzige Stickstoffquelle. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Nitritkonzentration wurde für den Verlauf der Kultivierungen bestimmt. Es zeigte sich, dass mit der Nitritreduktase kein Unterschied in den Nitritkonzentrationen im Vergleich zum Stamm mit dem Leervektor gefunden werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die beiden Stämme wurden mit 10 mM Nitrit als einziger Stickstoffquelle in der Hauptkultur kultiviert. Beide Stämme zeigten einen anfänglichen Anstieg der OD₆₀₀, welcher jedoch nach 24 h wieder sank. Die Nitritkonzentration fiel in beiden Stämmen im Verlauf der Kultivierung von $9,5 \pm 0,2$ mM auf $8,4 \pm 0,3$ mM (Leervektorkontrolle) bzw. von $9,9 \pm 0,1$ mM auf $9,4 \pm 0,6$ mM (Stamm mit Nitritreduktase). Dies deutet darauf hin, dass der Stamm mit dem Plasmid pEKEx2-*nrfHAIJ* keine Nitritreduktase-Aktivität unter aeroben Bedingungen besitzt.

Beide Stämme wurden anaerob in CGXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose und 30 mM Kaliumnitrat als finalem Elektronenakzeptor kultiviert (Abbildung 6-19). *C. glutamicum* pEKEx2 wuchs zu einer OD_{600} von $2,21 \pm 0,13$, während *C. glutamicum* pEKEx2-*nrfHAIJ* eine OD_{600} von $1,80 \pm 0,05$ erreichte. Beide Stämme akkumulierten im Kultivierungsverlauf 30 mM Nitrit aus den anfänglich eingesetzten 30 mM Nitrat. Da das Nitrit nicht weiter umgesetzt wurde, schien der Stamm mit dem Plasmid pEKEx2-*nrfHAIJ* auch unter anaeroben Bedingungen keine Nitritreduktase-Aktivität zu besitzen.

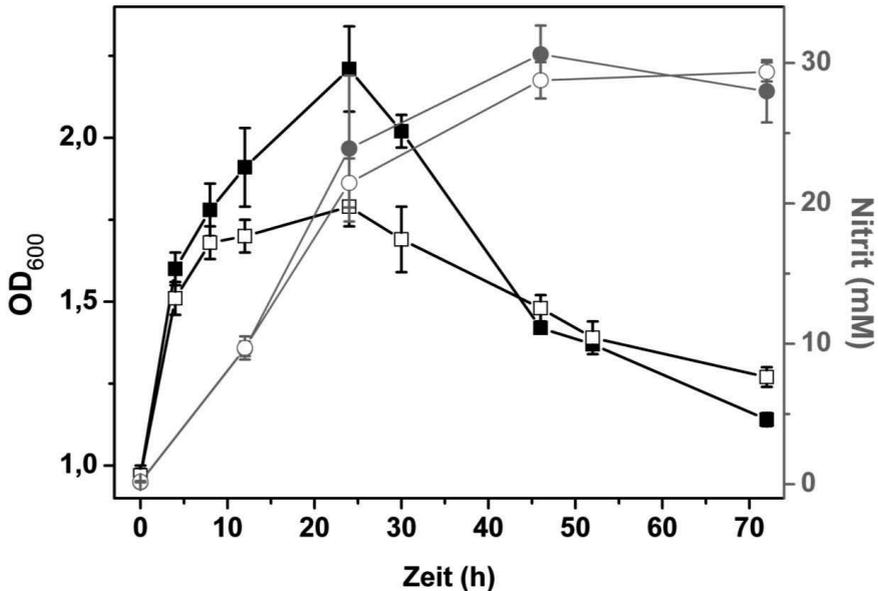


Abbildung 6-19: Anaerobes Wachstum (Quadrate) und Nitrit-Bildung (Punkte) von *C. glutamicum* pEKEx2 (geschlossene Symbole) und *C. glutamicum* pEKEx2-*nrfHAIJ* (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose, $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin und 30 mM Nitrat. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

6.4.3 Heterologe Expression der assimilatorischen Nitritreduktase Nir aus *M. smegmatis*

Die Gene *nirBD* für die assimilatorische Nitritreduktase Nir aus *Mycobacterium smegmatis* wurden von den Kooperationspartnern Dr. Nadine Rehm und Prof. Dr. Andreas Burkovski (Universität Erlangen-Nürnberg) amplifiziert und in den Expressionsvektor pZ8-1 kloniert. Außerdem enthielt der Vektor neben den Genen *nirBD* noch das Gen *nark3* für einen Nitritexporter. Das Plasmid pZ-*nirBD-nark3* wurden vom Kooperationspartner zu weiteren Analysen überlassen und *C. glutamicum* mit dem Vektor und der Leervektorkontrolle pZ8-1 transformiert.

Wie bereits von Dr. Rehm gezeigt worden war (unveröffentlichte Daten), konnte *C. glutamicum* pZ-nirBD-narK3 aerob mit Nitrit als einziger Stickstoffquelle wachsen (Abbildung 6-20). *C. glutamicum* pZ8-1 zeigte hingegen nur zu Beginn der Kultivierung eine geringe Zunahme der OD₆₀₀, welche innerhalb von 24 h jedoch wieder fiel. Es zeigte sich, dass das Wachstum mit Nitrit als einziger Stickstoffquelle davon abhängig war, mit welcher Base der pH-Wert des Mediums eingestellt wurde. Wurde Kaliumhydroxid verwendet, wurden nur etwa 4 mM Nitrit verbraucht und eine OD₆₀₀ von 2,33 ± 0,02 erreicht. Ein vollständiger Verbrauch des Nitrits und ein Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 6,63 ± 0,51 wurde dagegen erreicht, wenn der pH-Wert mit Natriumhydroxid eingestellt wurde. Dr. Rehm konnte zeigen, dass eine Zugabe von Nitrit zu Ende der Kultivierung kein besseres Wachstum ermöglichte, da der pH-Wert des Mediums zu diesem Zeitpunkt bereits zu stark gefallen war (unveröffentlichte Daten). Eine Erklärung für den positiven Effekt von Natriumionen gibt es bisher nicht.

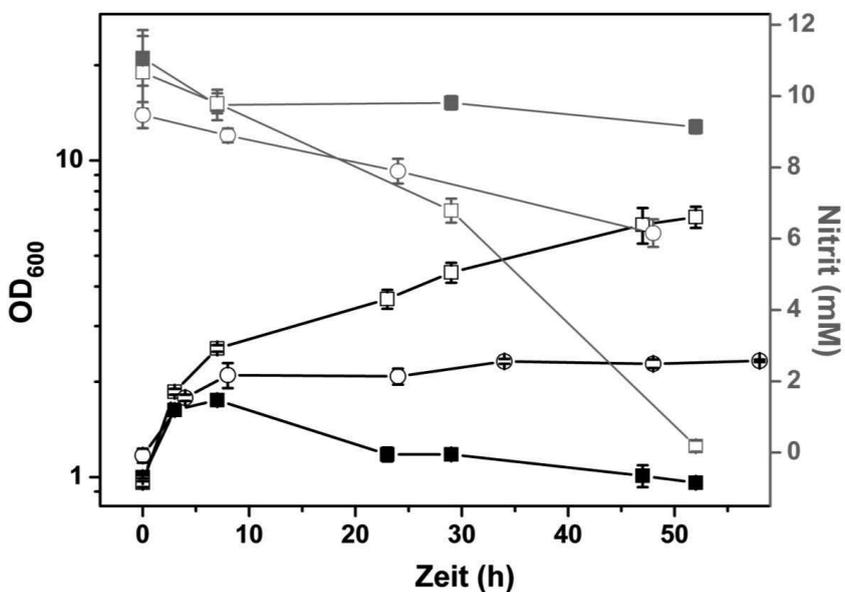


Abbildung 6-20: Wachstum (schwarze Symbole) und Nitritkonzentration (graue Symbole) von *C. glutamicum* pZ8-1 (gefüllte Symbole) und pZ-nirBD-narK3 (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium ohne Harnstoff und Ammonium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 10 mM Nitrit als einziger Stickstoff-Quelle. Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH (Quadrate) oder KOH (Punkte) eingestellt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat zeigte sich kein verbessertes Wachstum von *C. glutamicum* pZ-nirBD-narK3 gegenüber *C. glutamicum* pZ8-1 (Abbildung 6-21 A). Beide Stämme erreichten mit 1,95 ± 0,18 (pZ8-1) bzw. 1,97 ± 0,08 (pZ-nirBD-narK3) die gleiche

maximale Biomasse. Beide Stämme akkumulierten gleich viel Nitrit während der Kultivierung, welches nicht wieder umgesetzt wurde. Dies zeigte, dass die Nitritreduktase NirBD unter diesen anaeroben Bedingungen in *C. glutamicum* nicht aktiv war.

Beide Stämme wurden auch anaerob mit Nitrit als einziger Stickstoffquelle kultiviert. Es konnte kein Wachstum beobachtet werden, weder für *C. glutamicum* pZ8-1, noch für *C. glutamicum* pZ-nirBD-nark3 (Abbildung 6-21 B). Von beiden Stämmen wurde anaerob kein Nitrit umgesetzt.

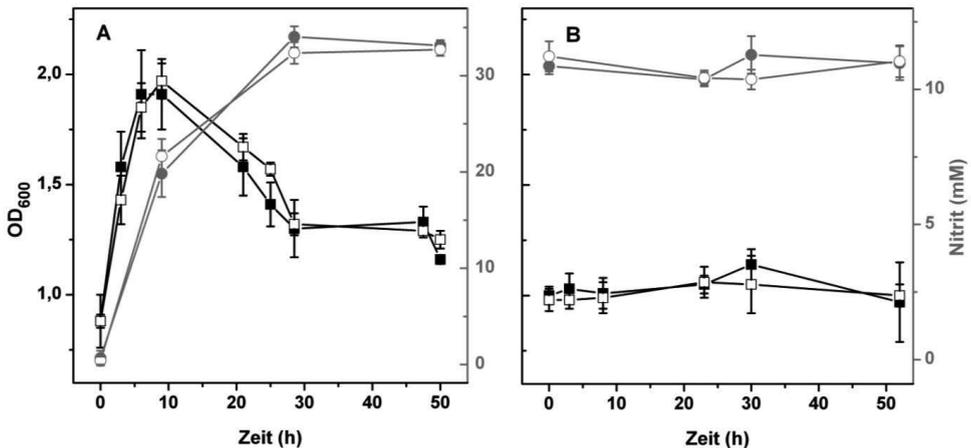


Abbildung 6-21: Anaerobes Wachstum (Quadrate) und Nitritkonzentration (Punkte) von *C. glutamicum* pZ8-1 (gefüllte Symbole) und *C. glutamicum* pZ-nirBD-nark3 (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose, 25 µg ml⁻¹ Kanamycin und 30 mM Nitrat als Elektronenakzeptor (A) bzw. in CGXII-Minimalmedium ohne Harnstoff und Ammonium mit 10 mM Nitrit als einziger Stickstoffquelle und 1,8 % (w/v) Glucose (B). Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

6.5 Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum und die globale Genexpression von *C. glutamicum*

6.5.1 Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum

Um den Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum von *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und mit verschiedenen Konzentrationen von Kaliumnitrat bzw. Kaliumnitrit versetzt und *C. glutamicum* aerob im Schüttelkolben in diesen Medien kultiviert. Es zeigte sich, dass bei zunehmender Konzentration von Nitrat und auch von Nitrit das Wachstum gehemmt wurde, was in einer Verminderung der Wachstumsrate μ resultierte. In den Experimenten wurde jedoch immer eine vergleichbare maximale Biomasse erreicht (Abbildung 6-22). Eine letale Konzentration von Nitrat wurde erst bei 2 M Nitrat erreicht (Löslichkeitsmaximum in CGXII-Medium, Daten

nicht gezeigt). Hingegen wirkten bereits 100 mM Nitrit letal. Das Wachstum wurde durch die Zugabe von Nitrit stärker gehemmt als bei der Zugabe von Nitrat.

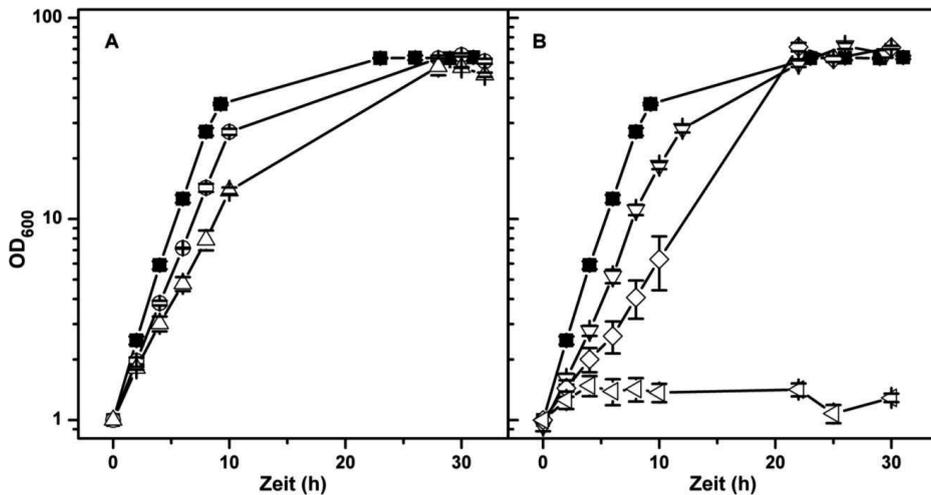


Abbildung 6-22: Wachstum von *C. glutamicum* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose mit verschiedenen Konzentrationen von (A) Kaliumnitrat (Punkte 50 mM, Dreiecke 500 mM) und (B) Kaliumnitrit (Dreiecke mit der Spitze nach unten 10 mM, Rauten 25 mM und seitliche Dreiecke 100 mM) unter aeroben Bedingungen. Gefüllte Quadrate symbolisieren in (A) und (B) das Wachstum von *C. glutamicum* ohne Zusätze. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei unabhängigen Experimenten.

Um auszuschließen, dass es sich bei den Wachstumsdefekten ausschließlich um Effekte des osmotischen Stresses handelt, wurde *C. glutamicum* mit Kaliumchlorid in den Konzentrationen 5, 50 und 500 mM kultiviert. Es zeigte sich auch mit Kaliumchlorid ein Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wachstum in CGXII-Minimalmedium ohne Zusatz, jedoch war dieser wesentlich geringer als der von Nitrat und Nitrit (Abbildung 6-23). Es wurde nach einem Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Zusatzkonzentration gesucht. Hierzu wurden die Wachstumsraten gegen die Konzentration des Zusatzes graphisch aufgetragen (Abbildung 6-23). Es ließ sich jedoch kein quantifizierbarer Zusammenhang erkennen. Sowohl im Fall von Nitrat, als auch bei Nitrit war die Abnahme der Wachstumsrate bei geringeren Konzentrationen stärker, als bei höheren. Somit wirkten sich geringere Konzentrationen von Nitrat und Nitrit stärker aus. Eine Aufstellung der Wachstumsraten der Experimente mit Kaliumnitrat, Kaliumnitrit und Kaliumchlorid findet sich in Tabelle 9-1 im Anhang.

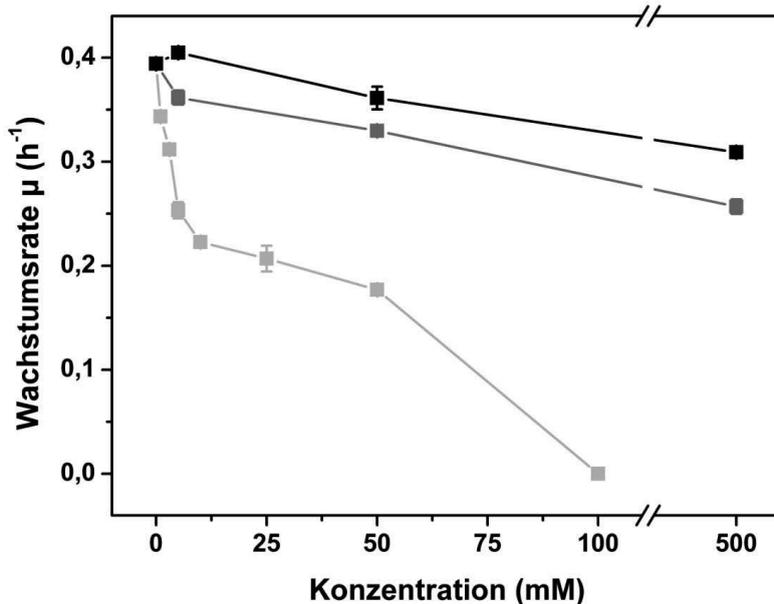


Abbildung 6-23: Zusammenhang von Wachstumsraten μ und Kaliumchlorid- (schwarze Quadrate) Kaliumnitrat- (dunkelgraue Quadrate) bzw. Kaliumnitritkonzentration (hellgraue Quadrate) bei der aeroben Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und verschiedenen Konzentrationen von Kaliumchlorid, Kaliumnitrat und Kaliumnitrit. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Wachstumsdefekte von Nitrat und Nitrit additiv verhalten. Hierzu wurde *C. glutamicum* mit verschiedenen Kombinationen von Kaliumnitrat, Kaliumnitrit und Kaliumchlorid kultiviert. Ein Vergleich der Verläufe der OD_{600} ist in der Abbildung 9-2 im Anhang dargestellt. Die gewählten Konzentrationen von Nitrat und Nitrit lösten einen Wachstumsdefekt aus. Eine Kombination von Nitrat und Nitrit verhielt sich vergleichbar mit dem Wachstum des Wildtyps mit Nitrit alleine. Die Wachstumsdefekte von Nitrat und Nitrit verhielten sich bei den gewählten Bedingungen nicht additiv.

6.5.2 Einfluss von Nitrat und Nitrit auf die globale Genexpression

Neben dem Wachstumsverhalten wurde auch der Einfluss von Kaliumnitrat und Kaliumnitrit auf das Transkriptom untersucht. Hierzu wurde der *C. glutamicum* Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose mit und ohne Zusatz kultiviert. Es wurden 5 mM Kaliumnitrat, 3 mM Kaliumnitrit und 10 mM Kaliumnitrit als Zusatz verwendet. Bei einer $OD_{600} = 5$ wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und globale Transkriptomvergleiche durchgeführt. In Tabelle 6-4 sind die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst.

Tabelle 6-4: Ergebnisse DNA-Microarray-Analysen zur Identifizierung von Genen, deren Expression durch die Anwesenheit von Nitrat bzw. Nitrit im Medium beeinflusst wurde. *C. glutamicum* Wildtyp wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in An- bzw. Abwesenheit von 5 mM Kaliumnitrat, 3 mM Kaliumnitrit bzw. 10 mM Kaliumnitrit kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für die RNA-Isolierung geerntet. Dargestellt sind alle Gene, deren mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kultur ohne Nitrat bzw. Nitrit 2-fach verändert waren. Als statistisch signifikant verändert wurden die Gene angesehen, deren *p*-Wert $\leq 0,05$ war. Ergänzt wurden die entsprechenden Werte der anderen Experimente und Gene von besonderem Interesse. War deren *p*-Wert $>0,05$, so wurde der entsprechende Wert in der Tabelle unterstrichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, bei 10 mM Nitrit aus vier unabhängigen Experimenten.

cg-Nummer	Genname, Annotation	mRNA-Verhältnis		
		+/- 5 mM Nitrat	+/- 3 mM Nitrit	+/- 10 mM Nitrit
cg3141	<i>hmp</i> , Flavohämoprotein	<u>2,8</u>	<u>4,0</u>	19,1
NAD-Synthese				
cg1214	<i>nadS</i> , Cysteindesulfurase-ähnliches Protein, involviert in Fe-S-Cluster Aufbau	<u>1,1</u>	1,4	2,0
cg1215	<i>nadC</i> , Quinolinat-Phosphoribosyltransferase	<u>1,0</u>	1,5	2,8
cg1216	<i>nadA</i> , Quinolinatsynthetase	<u>1,0</u>	1,6	3,1
cg1218	<i>ndnR</i> , Repressor der NAD-de-novo-Biosynthesegene	<u>1,0</u>	1,8	2,9
Kohlenstoffstoffwechsel				
cg0444	<i>ramB</i> , Transkriptionsregulator, Acetatmetabolismus	<u>0,9</u>	<u>1,4</u>	2,5
cg0230	<i>gltD</i> , Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase	<u>0,8</u>	0,5	<u>0,7</u>
cg0759	<i>prpD2</i> , 2-Methylcitratdehydratase	<u>0,7</u>	<u>1,1</u>	2,4
cg0760	<i>prpB2</i> , 2-Methylisocitratlyase	<u>0,7</u>	<u>1,1</u>	3,0
cg0762	<i>prpC2</i> , 2-Methylcitratsynthase	0,6	<u>1,0</u>	2,4
cg1581	<i>argJ</i> , bifunktionelle Ornithinacetyltransferase/ N-Acetylglutamatsynthase	<u>0,8</u>	0,4	0,4
cg1582	<i>argB</i> , Acetylglutaminkinase	<u>1,0</u>	0,5	<u>0,5</u>
cg3107	<i>adhA</i> , Zn-abhängige Alkoholdehydrogenase	<u>1,2</u>	2,0	<u>1,0</u>
cg3226	putative L-Laktatpermease	<u>0,7</u>	0,2	0,2
cg3227	<i>lldD</i> , Chinonabhängige L-Laktatdehydrogenase LldD	<u>1,0</u>	0,2	0,2
Metallionen- und Phosphatstoffwechsel				
cg0464	<i>ctpA</i> , Kupfertransport ATPase	0,9	<u>0,8</u>	2,2
cg0924	ABC-Typ Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophortransport System	<u>1,0</u>	0,6	0,4
cg2782	<i>ftn</i> , Ferritin-ähnliches Protein	<u>0,9</u>	<u>1,3</u>	4,0
cg2845	<i>pstC</i> , ABC-Typ Phosphattransportsystem, Permease	0,7	0,5	<u>0,2</u>
cg2911	ABC-Typ Mn ²⁺ /Zn ²⁺ Transportsystem	0,8	0,8	4,6
cg2912	ABC-Typ Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophortransportsystem	<u>1,0</u>	0,9	4,2
cg2913	ABC-Typ Mn ²⁺ /Zn ²⁺ Transportsystem, Permease	0,9	0,8	2,2
cg3082	bakterielles regulatorisches Protein, ArsR Familie	0,3	0,4	<u>0,6</u>
cg3083	vorhergesagter Co/Zn/Cd Kationentransporter	0,3	0,1	<u>0,0</u>
cg3084	vorhergesagte Flavin-enthaltende Monooxygenase	0,5	0,4	<u>0,2</u>
cg3282	Kationentransport ATPase	<u>0,9</u>	0,8	3,0
hypothetische Proteine				
cg0494	hoch-konserviertes hypothetisches Protein	<u>1,5</u>	<u>1,2</u>	2,5
cg0793	sekretiertes Protein	2,7	2,6	2,6
cg1514	sekretiertes Protein	0,5	0,7	<u>1,5</u>
cg1934	hypothetisches Protein	0,4	<u>1,2</u>	-
cg2567	hypothetisches Protein	<u>1,1</u>	1,2	2,6
cg2651	konserviertes hypothetisches Proteinfragment	2,0	2,6	-

Fortsetzung Tabelle 6-4		mRNA-Verhältnis		
cg-Nummer	Genname, Annotation	+/-	+/-	+/-
		5 mM Nitrat	3 mM Nitrit	10 mM Nitrit
Gene von besonderem Interesse				
cg1340	<i>arnR</i> , Transkriptionsregulator von <i>narKGHJI</i>	1,4	1,4	1,7
cg1341	<i>narI</i> , respiratorische Nitratreduktase γ UE	1,4	<u>1,2</u>	1,7
cg1342	<i>narJ</i> , respiratorische Nitratreduktase δ UE	1,4	1,2	1,5
cg1343	<i>narH</i> , respiratorische Nitratreduktase β UE	1,3	<u>1,0</u>	1,3
cg1344	<i>narG</i> , respiratorische Nitratreduktase α UE	<u>1,4</u>	<u>1,1</u>	1,3
cg1345	<i>narK</i> , putativer Nitrat/Nitrittransporter	1,5	1,4	1,6

Die Zugabe von 5 mM Nitrat hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf das Transkriptom von *C. glutamicum*, lediglich das Gen cg0793 wurde mehr als 2-fach vermehrt transkribiert und 5 Gene zeigten einen mehr als zweifach erniedrigten mRNA-Spiegel. Hingegen war die Reaktion auf 3 mM Nitrit und 10 mM Nitrit stärker. Dies war aufgrund des stärkeren Wachstumsdefekts unter diesen Bedingungen erwartet worden.

Cg3082, welches für einen putativen Regulator aus der ArsR-Familie kodiert, und die beiden dahinter liegenden Gene cg3083 (ein vorhergesagter Schwermetallkationen-transporter) und cg3084 (eine mögliche Flavin-enthaltende Monooxygenase) wurden sowohl in Gegenwart von Nitrat, als auch in Gegenwart von Nitrit weniger stark exprimiert. Da der Regulator in allen Experimenten mit Nitrat und Nitrit einen veränderten mRNA-Spiegel aufweist, könnte er eine bisher unbekannte Rolle in der Reaktion auf nitrosativen Stress spielen. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig, da es bisher keine biochemischen Untersuchungen zu diesem Regulator oder den durch ihn regulierten Genen gibt. Andere Schwermetall-Exporteur (cg2911-2913) und Eisenspeicherkomponenten (cg2782, Ferritin-ähnliches Protein) wurden in Anwesenheit von 10 mM Nitrit vermehrt transkribiert. Dies könnte möglicherweise ein Mittel sein um oxidativen und nitrosativen Stress in der Zelle zu vermindern. Warum allerdings cg3083 weniger stark exprimiert wird, kann an dieser Stelle nicht erklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen zum Substrat des Transporters.

Das auffälligste veränderte Gen war cg3141, welches für das Flavohämoprotein Hmp kodiert. Es wurde in Gegenwart von 5 mM Nitrat 2,8-fach, mit 3 mM Nitrit 4,0-fach und in Anwesenheit von 10 mM Nitrit 19-fach stärker transkribiert. In den beiden erstgenannten Fällen war der *p*-Wert aufgrund der unterschiedlichen Expressionsstärken in den Einzelerperimenten größer als 0,05 (z.B. 3, 9 und 90 im Fall von 5 mM Nitrat und 1, 4 und 687 im Fall von 3 mM Nitrit).

Die Expression der *narKGHJI*-Gene für die Nitratreduktase und den putativen Nitrat-Nitrit-Antiporter war in Gegenwart von Nitrat und Nitrit 1,2- bis 1,7-fach verstärkt, jedoch war der *p*-Wert nicht für alle Gene kleiner 0,05. Der mRNA-Spiegel des Regulatorgens *arnR* war 1,4- bis 1,7-fach erhöht. Dies spricht entweder dafür, dass es neben dem

sauerstoffabhängigen Regulator ArnR noch einen zweiten Regulationsmechanismus der Nitratreduktasegene geben könnte, welcher auf Nitrat, Nitrit oder eine reaktive Stickstoffspezies reagiert, oder dass ArnR auch mit Nitrat, Nitrit oder einer reaktiven Stickstoffspezies interagieren kann.

6.6 Untersuchungen zur Rolle des Flavohämoproteins Hmp

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das Transkriptom von *C. glutamicum* war das am auffälligsten veränderte Gen *hmp* (cg3141), welches für ein Flavohämoprotein kodiert. Um die Rolle dieses Proteins in *C. glutamicum* genauer zu untersuchen, wurde eine Deletionsmutante Δhmp durch markerfreie Gendeletion konstruiert. Unter aeroben Bedingungen in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose wuchs die Δhmp -Mutante wie der Wildtyp (Abbildung 6-24 A). Setzte man dem Medium jedoch 10 mM Kaliumnitrit zu, so zeigte die Δhmp -Mutante einen starken Wachstumsdefekt (Abbildung 6-24 B). Es gab eine auf etwa sechs Stunden verlängerte lag-Phase, während der Wildtyp sofort exponentiell zu wachsen begann. Im Nitrit-haltigen Medium wuchs der Wildtyp mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, während die Mutante ein biphasisches Wachstumsverhalten zeigte, mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,30 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ in der ersten und $\mu = 0,12 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ in der zweiten Wachstumsphase. Die Biomassebildung der Δhmp -Mutante war um etwa 50 % reduziert ($\text{OD}_{600(\text{max})} = 30,8 \pm 2,6$).

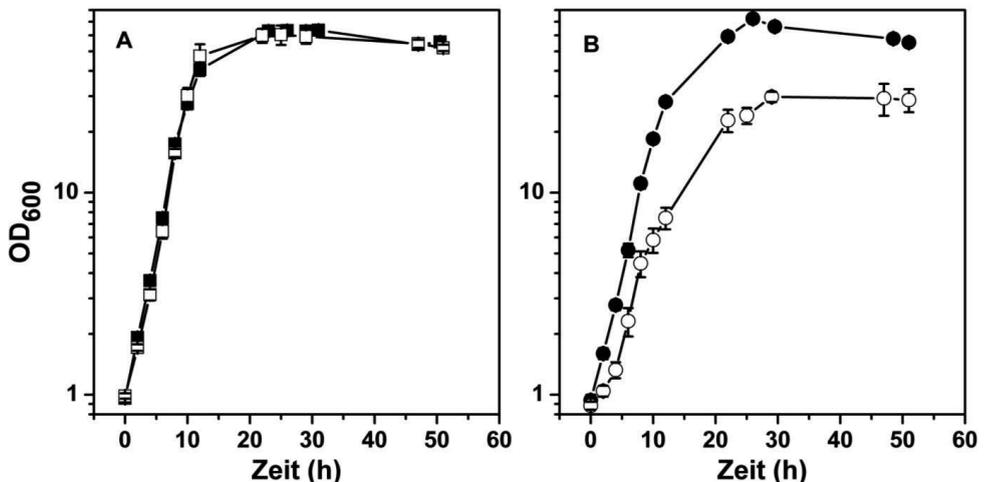


Abbildung 6-24: Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp (geschlossene Symbole) und der Δhmp -Mutante (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose unter aeroben Bedingungen ohne Nitrit (A) bzw. mit 10 mM Kaliumnitrit (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Zur Komplementation des Wachstumsdefekts wurde die Deletionsmutante Δhmp mit dem Expressionsvektor pEKEx2-*hmp*, sowie mit dem Leervektor pEKEx2 transformiert. Der Stamm *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2-*hmp*, sowie die Referenzstämme *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2 und *C. glutamicum* pEKEx2 wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose mit 10 mM Kaliumnitrit und 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin kultiviert. Durch die vektorbasierte Expression von *hmp* konnte das Wachstum von *C. glutamicum* Δhmp verbessert werden (Abbildung 6-25 A). *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2-*hmp* zeigte das gleiche Wachstumsverhalten, wie *C. glutamicum* pEKEx2 (Abbildung 6-25 B). Somit war die Komplementation erfolgreich. Die Deletion von *hmp* verursachte in *C. glutamicum* eine erhöhte Nitritsensitivität. Die Komplementation des Wachstumsphänotyps gelang ohne Induktion der Expression mit IPTG. Die basale Expression von *hmp* reichte um hinreichend Hmp zu bilden, um die Deletion zu komplementieren.

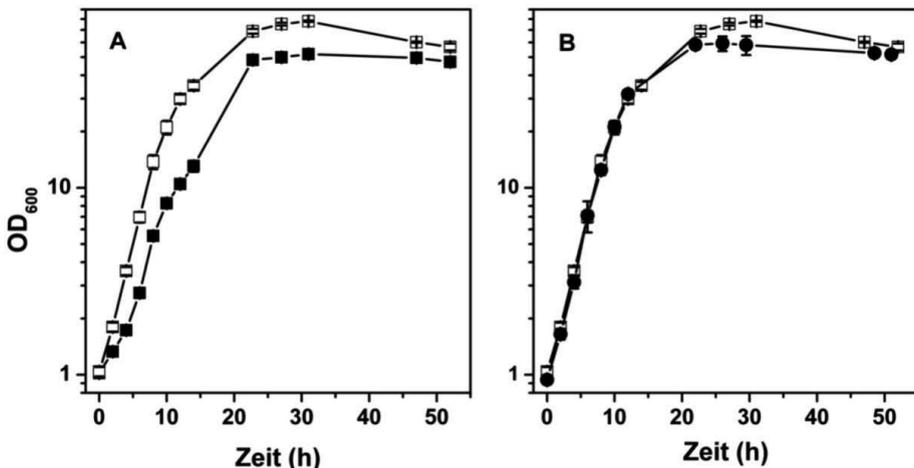


Abbildung 6-25: Wachstum von *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2 (gefüllte Quadrate), Δhmp pEKEx2-*hmp* (offene Quadrate) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin unter aeroben Bedingungen mit 10 mM Nitrit (A). Vergleich des Wachstumsverhaltens von Δhmp pEKEx2-*hmp* (offene Quadrate) mit dem Wildtyp mit pEKEx2 (gefüllte Punkte) (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Es wurde untersucht, ob durch die Induktion der Expression von *hmp* mit IPTG mehr Hmp-Protein nachweisbar war. Hierzu wurden *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2 und *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2-*hmp* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert. Zur Induktion wurden dem Medium verschiedene Konzentrationen IPTG (0 mM, 0,1 mM oder 1 mM) zugesetzt. Nach 5 h wurde je ein $OD_{600} = 20$ Aliquot Zellen geerntet, welche mit Glycerperlen im Silamaten direkt im SDS-Probenpuffer aufgeschlossen wurden. 10 μL des Zelllysats wurden nach der Denaturierung für 5 min bei 90 °C auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt

(Abbildung 6-26). Bei der errechneten Masse von Hmp von 42 kDa konnte im Stamm *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2-*hmp* bei der Kultivierung mit 0,1 und 1 mM IPTG eine deutlich dickere Bande beobachtet werden, als im Stamm *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2-*hmp* ohne IPTG oder im Deletionsstamm mit Leervektor. Die Bande wurde mittels MALDI-TOF-MS als Hmp identifiziert. Durch die Induktion mit IPTG konnte eine deutliche Überproduktion von Hmp erreicht werden.

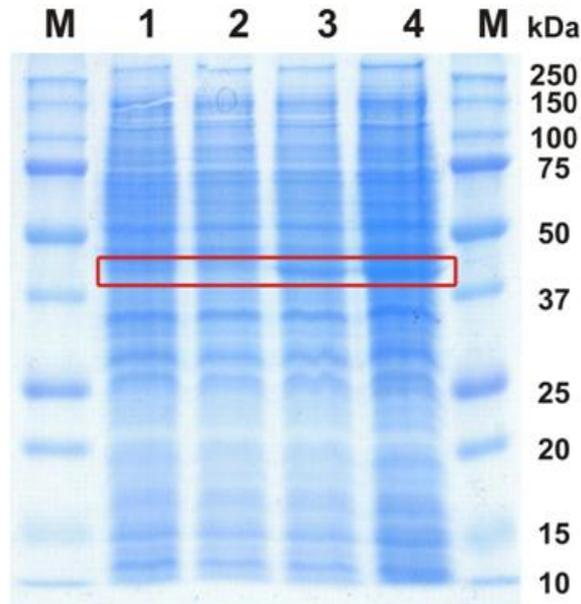


Abbildung 6-26: Coomassie-gefärbtes 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel von Rohextrakten von Zellen von *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2 (Spur 1) und *C. glutamicum* Δhmp pEKEx2-*hmp* (Spuren 2-4), welche in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin ohne IPTG (Spuren 1 & 2) und mit 0,1 mM IPTG (Spur 3) oder 1 mM IPTG (Spur 4) für 5 h kultiviert wurden. Die Hmp-Bande ist in rot markiert. Als Größenmarker (M) wurde der Precision Plus Dual Color Protein Standard (BioRad) verwendet.

Es wurde untersucht, inwiefern sich eine erhöhte Expression von *hmp* auf das Wachstum und die Nitritresistenz von *C. glutamicum* auswirkte. Die hierzu verwendeten verschiedenen Konzentrationen von IPTG (0, 0,05 und 0,1 mM) führten im Wildtyp nicht zu einer verbesserten Nitritresistenz bei keiner der getesteten Nitritkonzentrationen (0, 5, 10, 15 und 20 mM). Das Wachstum von *C. glutamicum* wurde im Gegenteil sogar gehemmt. Die Abbildung 6-27 zeigt exemplarisch das Wachstum bei den verschiedenen IPTG-Konzentrationen bei der Kultivierung mit 20 mM Nitrit und zum Vergleich das Wachstum ohne Nitrit.

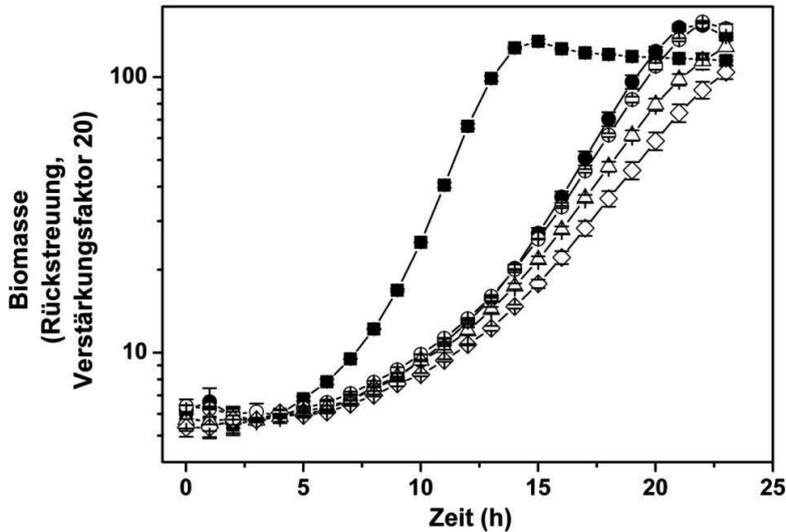


Abbildung 6-27: Wachstum von *C. glutamicum* pEKEx2 (gefüllte Symbole) und *C. glutamicum* pEKEx2-*hmp* (offene Symbole) im BioLector in 700 μ l CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose, 25 μ g ml⁻¹ Kanamycin und mit verschiedenen Nitrit- und IPTG-Konzentrationen. Die Symbole repräsentieren folgende Nitrit- und IPTG-Konzentrationen: Quadrate: 0 mM Nitrit und 0 mM IPTG, Kreise: 20 mM Nitrit und 0 mM IPTG, Dreiecke: 20 mM Nitrit und 0,05 mM IPTG und Rauten: 20 mM Nitrit und 0,1 mM IPTG. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Das Flavohämoprotein Hmp detoxifiziert in anderen Mikroorganismen, z.B. *E. coli* und *B. subtilis*, Stickstoffmonoxid. In diesen Mikroorganismen konnte auch gezeigt werden, dass *hmp*-Deletionsmutanten hypersensitiv gegenüber NO-Donoren waren (Membrillo-Hernandez *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob Hmp von *C. glutamicum* auch eine Rolle im NO-Stoffwechsel spielt, wurden der Wildtyp und die Deletionsmutante Δ *hmp* mit dem NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert (Abbildung 6-28). Das Medium wurde kurz vor der Inokulation mit 20 mM SNP versetzt. SNP verlangsamte das Wachstum des Wildtyps auf eine Wachstumsrate von $\mu = 0,29 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Die maximale OD₆₀₀ war nicht beeinflusst. Die Mutante Δ *hmp* hingegen zeigte eine verlängerte *lag*-Phase von ca. sechs Stunden und wuchs dann mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,29 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Die Biomassebildung der Mutante war um etwa 45 % gegenüber der des Wildtyps reduziert. Somit war der Stamm Δ *hmp* deutlich sensibler gegenüber dem NO-Donor SNP.

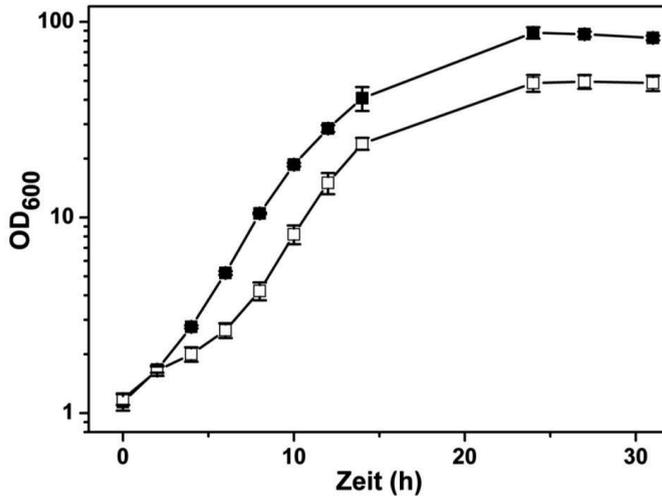


Abbildung 6-28: Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp (gefüllte Quadrate) und dem Stamm Δhmp (offene Quadrate) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose unter aeroben Bedingungen mit dem NO-Donor SNP (20 mM). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

C. glutamicum Δhmp wurde anaerob mit 30 mM Nitrat kultiviert, um zu untersuchen, ob das Flavohämoprotein Hmp einen Einfluss auf das anaerobe Wachstum hat. Der *C. glutamicum* Wildtyp wuchs unter diesen Bedingungen zu einer maximalen OD₆₀₀ von $2,1 \pm 0,1$, während die Δhmp -Mutante nur eine maximale OD₆₀₀ von $1,4 \pm 0,1$ erreichte (Abbildung 6-29). Die OD₆₀₀ der Mutante fiel innerhalb von 32 h wieder. Die Nitritbildung und damit die Nitratatmung von Δhmp waren ebenfalls verlangsamt. Während der Wildtyp die anfänglich einsetzten 30 mM Nitrat innerhalb von 30 h vollständig zu Nitrit umsetzte, bildete die Mutante in dieser Zeit lediglich ca. 20 mM Nitrit. Die Deletion von *hmp* hatte also einen negativen Effekt auf das anaerobe Wachstum von *C. glutamicum* mit Nitrat.

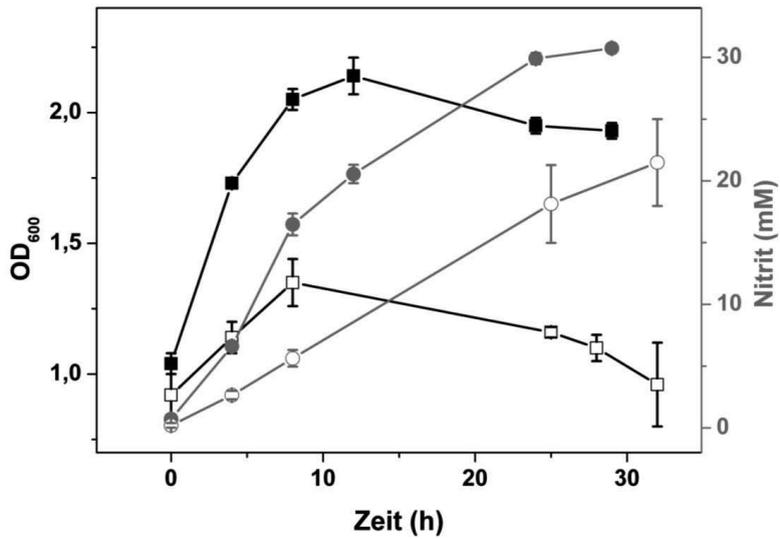


Abbildung 6-29: Anaerobes Wachstum (Quadrate) und Nitritbildung (Punkte) von *C. glutamicum* Wildtyp (geschlossene Symbole) und dem Stamm Δhmp (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit 1,8 % (w/v) Glucose und 30 mM Nitrat. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

7 DISKUSSION

Corynebacterium glutamicum ist von großer industrieller Bedeutung und wird u. a. für die biotechnologische Produktion von L-Aminosäuren, besonders L-Glutamat und L-Lysin, eingesetzt. In Produktionsprozessen begegnet *C. glutamicum* mikroaeroben Bedingungen. Gründe hierfür sind zum einen die hohe Zelldichte am Ende des Wachstums, und zum anderen die inhomogene Verteilung des Sauerstoffs in großen Fermentern. Diese Sauerstofflimitierung führt möglicherweise zu Einbußen in der Produktausbeute. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, die mikroaerobe Atmung bzw. die oxidative Phosphorylierung zu verbessern. Des Weiteren ist die Begasung großvolumiger Fermenter technisch aufwändig und daher kostenintensiv. Eine mögliche Alternative könnten anaerobe Produktionsprozesse sein, bei denen Nitrat als finaler Elektronenakzeptor und als Stickstoffquelle dient. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, heterologe Nitritreduktasen in *C. glutamicum* zu synthetisieren, die eine Reduktion von Nitrit zu Ammonium ermöglichen. Außerdem wurden neue Erkenntnisse zur Atmungskette von *C. glutamicum* und zur Antwort auf Nitrit-Stress erlangt.

7.1 Der Einfluss einer erhöhten Produktion des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes auf *C. glutamicum*

Um eine erhöhte Expression des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes zu erreichen, wurden drei sequenzielle Promotoraustausche durchgeführt. Die Promotoren der Gene *ctaD*, *ctaCF* und *ctaC-qcrCAB* wurden gegen den Promotor des Gens *tuf* chromosomal ausgetauscht und so der Stamm SC^{plus} konstruiert. Mittels globaler Transkriptomanalysen und qRT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die entsprechenden Gene in der exponentiellen Wachstumsphase etwa zweifach verstärkt transkribiert wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass der Promotor P_{tuf} unter diesen Bedingungen stärker ist als die nativen Promotoren der Superkomplex-Gene. Überraschenderweise wurden auch die Gene der Cytochrom-*bd*-Oxidase im Stamm SC^{plus} etwa sechsfach vermehrt transkribiert. Mittels Cytochromspektren und Häm-Färbung konnte ein erhöhter Proteingehalt des Superkomplexes nachgewiesen werden. Die Überexpression des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes in der exponentiellen Wachstumsphase war demnach erfolgreich. Die Membranspektren deuteten darauf hin, dass auch mehr Cytochrom *d*, also mehr Cytochrom-*bd*-Oxidase auf Proteinebene vorhanden war. Zusätzlich wies der Stamm SC^{plus} eine um 30 % erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate in der exponentiellen Wachstumsphase auf, welche eindeutig für eine erhöhte Atmungsaktivität spricht. Aufgrund der ebenfalls erhöhten Expression der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Gene und der größeren Menge an Cytochrom *d*, kann diese Rate jedoch nicht allein dem Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex zugeschrieben werden, sondern wird wahrscheinlich durch größere Mengen beider terminaler Oxidasen

verursacht. Ein Grund für die vermehrte Bildung der energetisch weniger effiziente Cytochrom-*bd*-Oxidase könnte Kupfermangel sein, da Kupfer eventuell von der größeren Menge Cytochrom-*aa*₃-Oxidase gebunden wird. Es konnte gezeigt werden, dass, wenn *C. glutamicum* unter Kupfermangel kultiviert wird, eine ca. 5-fach erhöhte Expression der Cytochrom-*bd*-Oxidase stattfindet (X. Schuplezow, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in einer ΔF_1F_0 -Mutante mit einer drastisch erhöhten Atmungsrate, die Cytochrom-*bd*-Oxidase ebenfalls vermehrt gebildet wurde (Koch-Körfges *et al.*, 2012). Daher könnte auch die erhöhte Atmungsrate die vermehrte Expression der Cytochrom-*bd*-Oxidase verursachen.

Möglicherweise ist die vermehrte Expression der Cytochrom-*bd*-Oxidase ein Grund dafür, dass das Wachstum des Stammes SC^{plus} sich kaum vom Wachstum des Wildtyps unterschied. Durch die größere Menge der Cytochrom-*bd*-Oxidase konnten vermutlich nicht mehr Elektronen über den energetisch effizienteren Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex geleitet werden, sondern der Elektronenfluss verteilte sich ähnlich wie im Wildtyp auf beide Zweige der Atmungskette. Somit konnte keine Verbesserung der oxidativen Phosphorylierung durch Erhöhung der protonenmotorischen Kraft erreicht werden. Ein vermehrter Elektronenfluss über die Cytochrom-*bd*-Oxidase führte in vorangegangenen Untersuchungen zu einer starken Reduzierung des Wachstums (Kabus *et al.*, 2007), da ein erhöhter Elektronenfluss über diese energetisch ineffizientere Oxidase zu einer Reduzierung der Energieausbeute führte. In einer *cydAB*-Deletionsmutante konnte keine erhöhte Expression der Gene für den Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex detektiert werden (Koch-Körfges, 2011). Man muss daher davon ausgehen, dass die native Menge an Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex für das Wachstum und die Energiekonservierung ausreichend ist. Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine Überexpression des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes ohne den Nebeneffekt der Überexpression der Cytochrom-*bd*-Oxidase hat, muss diese im Stamm SC^{plus} deletiert werden. Möglicherweise kann ein solcher Stamm deutlich besser wachsen, als die einzelnen Mutanten SC^{plus} und $\Delta cydAB$. In einem solchen Stamm wäre zusätzlich zur Linearisierung des Elektronenflusses eine größere Menge an Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex vorhanden und könnte tatsächlich zu einer verbesserten Energieausbeute führen.

Dass die vermehrte Expression einer energetisch effizienten Oxidase tatsächlich die Energiekonservierung verbessern kann, zeigen Untersuchungen aus anderen Organismen. Eine vermehrte Expression der endogenen Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase führte in *Rhizobium etli* zu einer verbesserten Stickstofffixierung in der Symbiose (Talbi *et al.*, 2012). In diesem Bakterium wurde vektorbasiert die für die symbiontische Stickstofffixierung wichtige Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase überexprimiert. Dies führte zu höheren Sauerstoffaufnahmeleistungen der Bacteroide und zu einer besseren Stickstofffixierung, welche sehr energieintensiv ist. Die

Energiekonservierung von *Rhizobium etli* wurde durch die Überexpression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase verbessert.

Ähnliches wurde bei einer Mutante von *Rhizobium phaesoli* (Stamm CFN4205) beobachtet, in welcher die endogene Cytochrom-*aa*₃-Oxidase vermehrt exprimiert wurde (Soberon *et al.*, 1989). In dieser Mutante war ebenfalls die Stickstofffixierung in der Symbiose mit *Phaseolus vulgaris* gesteigert, was darauf zurückgeführt wurde, dass durch die vermehrte Expression der Cytochrom-*aa*₃-Oxidase eine Verbesserung der Energiekonservierung erreicht worden war. Hier ist anzumerken, dass anders als in *B. japonicum*, wo die Cytochrom-*aa*₃-Oxidase in der Symbiose nicht essentiell ist (Bott *et al.*, 1990), in *R. phaesoli* die Cytochrom-*aa*₃-Oxidase in der Symbiose wichtig für die Energiegewinnung zu sein scheint.

Während in der exponentiellen Phase im Stamm SC^{plus} der Gehalt an Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplex signifikant gesteigert werden konnte, waren in der stationären Phase erhöhte Mengen der Superkomplex-Proteine nicht eindeutig nachweisbar. Dafür könnte eine schwächere Expression des Promotors P_{tuf} in der stationären Phase verantwortlich sein. DNA-Microarray-Analysen des *C. glutamicum* Wildtyps deuten darauf hin, dass nach 24 h Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose nur noch ca. 40 % des Transkriptspiegels des Gens *tuf* im Vergleich zum exponentiellen Wachstum vorhanden ist (Dr. A. Koch-Körfges, unveröffentlichte Daten). Jedoch werden in dieser Phase die meisten Gene weniger stark exprimiert, was dazu führt, dass der *p*-Wert bei 0,25 liegt und damit nicht als signifikant betrachtet werden kann. Dies deutet darauf hin, dass der Promotor P_{tuf} eventuell keine konstante Expression über alle Wachstumsphasen hinweg ermöglicht und nicht zwingend der beste Kandidat für die vermehrte Expression von Genen in *C. glutamicum* ist.

Durch die verstärkte Synthese des Cytochrom-*bc*₁-*aa*₃-Superkomplexes gab es im Stamm SC^{plus} einen erhöhten Bedarf an Cofaktoren für diese Enzyme. Als Folge wurden diverse Gene vermehrt transkribiert, deren Genprodukte an der Cofaktorherstellung und dem Zusammenbau der Oxidasen beteiligt sind. Die Gene für den Häm-Aufbau (Bott & Niebisch, 2003) waren im Stamm SC^{plus} erhöht transkribiert, wobei keines der bekannten Regulationssysteme der Häm-Biosynthesegene (HrrSA, CgtSR8 (Frunzke *et al.*, 2011) oder DtxR (Wennerhold & Bott, 2006)) einen veränderten mRNA-Spiegel aufwies. Diverse Siderophortransporter wurden vermehrt exprimiert, vermutlich um den erhöhten Eisenbedarf für die Cofaktorbildung zu decken. Siderophore binden Eisenionen und werden dann in die Zelle transportiert, sodass das Eisen biologisch verfügbar gemacht wird (Dertz *et al.*, 2006).

Die Erhöhung der Transkription der Cofaktor-Biosynthese-Gene deutet darauf hin, dass *C. glutamicum* in der Lage sein könnte, die Menge an Atmungskettenenzymen festzustellen. Ein Mechanismus hierfür muss jedoch noch aufgeklärt werden. Man kann

annehmen, dass die durch die Feststellung der Verfügbarkeit der Cofaktoren der Atmungskettenenzyme hierbei eine Rolle spielt. Eine größere Menge an Atmungskettenenzymen bindet mehr Cofaktoren, sodass deren Konzentration in der Zelle sinkt. Dies führt wahrscheinlich zur vermehrten Expression der Gene, die an der Bereitstellung der Cofaktoren beteiligt sind. Der Cofaktor Eisen und die Eisenverfügbarkeit in der Zelle könnten hierbei auch eine Rolle spielen. Der Eisenstoffwechsel ist strikt kontrolliert (Andrews *et al.*, 2003), da freies Eisen in der Zelle z.B. zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beitragen kann. Daher wird wahrscheinlich nur so viel Eisen in die Zelle transportiert, wie gerade benötigt wird, z. B. für die Synthese von Häm oder Eisen-Schwefel-Clustern.

Die Lysinbildung in dem Lysinproduktionsstamm DM1945 SC^{plus} unter mikroaeroben Bedingungen konnte nicht verbessert werden. Auch in diesem Fall sollte eine Deletion der Gene *cydAB* erfolgen, um zu untersuchen, ob nicht ein alleiniger Fluss über den Cytochrom-*bc₁-aa₃*-Superkomplex die Energiegewinnung für die Lysin-Produktion verbessern kann. Eine Δ *cydAB*-Mutante des Stammes MH20-22B produzierte 10 % mehr Lysin, als der Ausgangsstamm (Kabus *et al.*, 2007). Sollte eine Überproduktion des Cytochrom-*bc₁-aa₃*-Superkomplexes zu einer verbesserten oxidativen Phosphorylierung führen, könnte die Lysinbildung weiter verbessert werden, da die Energieausbeute aus der Kohlenstoffquelle verbessert würde und somit mehr Kohlenstoffquelle für die Lysinbildung zur Verfügung stünde.

7.2 Der native Promotor der Gene der F₁F₀-ATP-Synthase scheint geeignet für biotechnologische Anwendungen

Die F₁F₀-ATP-Synthase katalysiert die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Hierbei nutzt sie die protonenmotorische Kraft (PMK), welche sich aus dem Protonengradienten und dem Membranpotential zusammensetzt und von den Atmungskettenenzymen aufgebaut wird. Der Rückfluss der Protonen durch die F₁F₀-ATP-Synthase liefert die notwendige Energie für die Synthese von ATP. Vorangegangene Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass in *C. glutamicum* nicht 100 % der PMK von der F₁F₀-ATP-Synthase genutzt werden (Koch-Körfges *et al.*, 2012). Daher könnte eine erhöhte Menge F₁F₀-ATP-Synthase die Energiekonservierung über oxidative Phosphorylierung verbessern.

Durch den Promotoraustausch von P_{*atpB*} gegen P_{*tuf*} konnte jedoch keine erhöhte Expression des *atp*-Operons erreicht werden. Das Gegenteil war der Fall, denn Transkriptomanalysen ergaben, dass nur noch zwischen 40 und 50 % des Transkripts des *atp*-Operons in der exponentiellen Phase gebildet wurde. Dies zeigte, dass der native Promotor von *atpB* stärker ist, als der *tuf*-Promotor. Es war aufgrund vorangegangener Transkriptomuntersuchungen davon ausgegangen worden, dass das Gen *tuf* stärker in *C.*

glutamicum exprimiert wird, als die Gene der F_1F_0 -ATP-Synthase (N. Dobler und Dr. T. Polen, Tilingarray-Daten, unveröffentlichte Daten). Der Elongationsfaktor Tu ist außerdem eines der häufigsten Proteine im Cytoplasma von *C. glutamicum*, wie durch Proteomanalysen nachgewiesen wurde (Schaffer *et al.*, 2001). Diese neuen Erkenntnisse zur Promotorstärke machen den P_{atpB} -Promotor zu einem interessanten Kandidaten für weitere Experimente. P_{atpB} könnte zur erhöhten Expression von Genen in der Stammentwicklung eingesetzt werden. Es sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Voraussage zu bestätigen. Es sollte ein Promotoraustausch eines Gens erfolgen, welches bereits erfolgreich mit P_{tur} überexprimiert wurde, denn so ließe sich feststellen, ob der Promotor P_{atpB} tatsächlich eine noch größere Steigerung der Expression ermöglicht.

Die Annahme, dass im Stamm $P_{tur}F_1F_0$ die F_1F_0 -ATP-Synthase in geringeren Mengen vorkommt als im Wildtyp, wurde von den Ergebnissen der Wachstumsanalyse auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle untermauert. Diese Ergebnisse wurden im BioLector gewonnen, welcher nicht sehr sensitiv gegenüber geringen Zunahmen an Biomasse ist. Daher sollten diese Ergebnisse durch Kultivierung im Schüttelkolben verifiziert werden, da ein so starker Wachstumsdefekt bei einer ca. 50 %igen Reduzierung der Menge an F_1F_0 -ATP-Synthase nicht zu erwarten war. Mit Hilfe von quantitativen Western-Blots, GC-MS-Proteom-Analysen oder ATPase-Aktivitätsmessungen sollte man den tatsächlichen Gehalt an F_1F_0 -ATP-Synthase in diesem Stamm im Vergleich zum Wildtyp untersuchen. Dies ist insofern interessant, als dass eine Verringerung der F_1F_0 -ATP-Synthase-Aktivität das anaerobe Wachstum und die anaerobe Produktion von organischen Säuren von *C. glutamicum* verbessert (A. Michel, Dr. A. Koch-Körfges, unveröffentlichte Daten). Unter anaeroben Bedingungen, oder auch durch eine vollständige Inaktivierung der Atmungskette im Stamm DOOR, kann *C. glutamicum* keine protonenmotorische Kraft mehr über die beiden terminalen Oxidasen aufbauen, sondern nur noch über die Rückreaktion der Succinatdehydrogenase oder die F_1F_0 -ATP-Synthase. Daher hydrolysiert die F_1F_0 -ATP-Synthase unter diesen Bedingungen ATP, um Protonen aus der Zelle zu pumpen und den internen pH-Wert zu stabilisieren (Dr. A. Koch-Körfges, unveröffentlichte Daten). Die ATP-Hydrolyse führt allerdings zu einem Energiemangel in der Zelle und die Abwesenheit der F_1F_0 -ATP-Synthase zu einer drastisch reduzierten pH-Toleranz in anaeroben *C. glutamicum* Zellen. Daher hat sich gezeigt, dass ein Stamm mit einer F_1F_0 -Restaktivität (Sekine *et al.*, 2001) unter diesen Bedingungen weniger ATP hydrolysiert, aber dennoch Protonen pumpt, sodass mit diesem Stamm das beste Wachstum unter diesen Bedingungen ermöglicht wird. Mit dem Stamm $P_{tur}F_1F_0$ stehen nun Mutanten zur Verfügung, welche 25 % Restaktivität (Sekine *et al.*, 2001), 40-50 % Transkript der F_1F_0 -ATP-Synthase ($P_{tur}F_1F_0$) und eine

vollständige Deletion der F_1F_0 -ATP-Synthase (Koch-Körfiges *et al.*, 2012) tragen. Es können nun Untersuchungen zur graduellen Inaktivierung der F_1F_0 -ATP-Synthase erfolgen.

7.3 Versuch der heterologen Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum*

Der Versuch die heterologe Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *Bradyrhizobium japonicum* in *C. glutamicum* zu exprimieren, war leider nicht erfolgreich. Die Induktion der Expression des Operons *fixGHIS* mit IPTG führte in *C. glutamicum* zu einer vollständigen Wachstumshemmung. Anschließend bildeten sich Suppressormutanten, welche zwar mit IPTG wachsen konnten, jedoch im Gen *fixG* eine Punktmutation trugen, welche zu einem Stop-Codon und somit zu einer verkürzten und nicht mehr funktionellen FixG-Variante führten. Da FixG für die Bereitstellung des Cu-Cofaktors in die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase von *B. japonicum* essentiell ist (Preisig *et al.*, 1996a), konnte die Oxidase nicht funktionell in *C. glutamicum* exprimiert werden. FixG ist ein bakterielles Ferredoxin und möglicherweise geht die Wachstumshemmung, welche von FixG ausgelöst wird, darauf zurück, dass FixG in *C. glutamicum* Kupfer bindet, welches dann nicht mehr für die native Cytochrom-*aa*₃-Oxidase zur Verfügung steht. Gegebenenfalls führt die Aktivität von FixG jedoch auch zum gegenteiligen Effekt, nämlich zu mehr Kupfer in der Membran, da in *C. glutamicum* möglicherweise kein Akzeptor in Form der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase zur Verfügung steht. Die könnte oxidativen Stress auslösen, wie es für hohe Kupferkonzentrationen bekannt ist (Osman & Cavet, 2008). Möglicherweise kann FixG auch nicht korrekt gebildet werden, sodass die Membranintegrität von *C. glutamicum* gestört wird. Da keine Untersuchungen zum Grund der FixG-Toxizität durchgeführt wurden, kann der genaue Grund nicht genannt werden. Die Bildung von FixG in *C. glutamicum* sollte genauer untersucht werden, um den Grund für die Unverträglichkeit zu verstehen.

Des Weiteren wurden während dieser Arbeit weitere Studien zu Cytochrom-*cbb*₃-Oxidasen publiziert, welche Proteine identifizierten, die für die funktionelle Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase essentiell sind. Dabei handelt es sich überwiegend um Proteine, die an der Kupferbereitstellung beteiligt sind. In *B. japonicum* wurden Insertionsmutanten der Gene *bll4880* und *bll1131* hergestellt (Arunothayanan *et al.*, 2010). Die resultierenden Stämme *Bll4880::Ω*, *Bll1131::Tc* und die Doppelmutante fixierten in der Symbiose mit *Glycine max* weniger Stickstoff und die Bacteroide wiesen eine signifikant geringere Cytochrom-*c*-Oxidase-Aktivität auf. Da *Bll4880* ein Kupferbindemotiv aufweist und *Bll1131* ein Homolog eines *ScoI*-Proteins ist, welches in Mitochondrien an der Kupferbereitstellung beteiligt ist (Cobine *et al.*, 2006), wurde geschlossen, dass die beiden Proteine *Bll4880* und *Bll1131* an der Kupfer-Bereitstellung für die symbiontisch wichtige Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase beteiligt sind (Arunothayanan *et al.*, 2010). In *Rhodobacter capsulatus* konnte ein Protein der

Major-Facilitator-Superfamilie, CcoA, identifiziert werden, welches für die Bildung der aktiven Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase wichtig ist (Ekici *et al.*, 2012). Der Phänotyp einer *ccoA*-Mutante konnte durch erhöhte Mengen Kupfer komplementiert werden, sodass geschlossen wurde, dass CcoA für die Kupferbereitstellung wichtig ist. Das *B. japonicum* Homolog zu CcoA ist Blr1017 (41 % Identität), wobei noch zu untersuchen ist, ob es auch in *B. japonicum* an der Bildung der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase beteiligt ist. Das *pcuC*-Gen von *B. japonicum* scheint ebenfalls an der Kupferbereitstellung für die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase unter symbiontischen Bedingungen beteiligt zu sein (Serventi *et al.*, 2012). Eine *pcuC*-Deletionsmutante zeigte eine 75 %ige Reduzierung der symbiontischen Stickstofffixierungsaktivität und Membranen von Bacteroiden hatten eine drastisch reduzierte Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase-Aktivität. *C. glutamicum* besitzt kein Homolog dieser Gene, sodass für eine funktionelle Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase wahrscheinlich zusätzlich diese heterologen Proteine notwendig wären. Würde man diese auch heterolog in *C. glutamicum* einbringen, so könnte dies möglicherweise zum Erfolg führen. Man muss jedoch beachten, dass *B. japonicum* Gram-negativ ist und Oxidasen vom *cbb*₃-Typ bisher ausschließlich in Gram-negativen Bakterien gefunden wurden, während *C. glutamicum* Gram-positiv ist, sodass es möglicherweise Probleme beim Einbau in die Membran geben könnte.

Außerdem problematisch für die heterologe Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* in *C. glutamicum* könnte der ungewöhnliche Cytochrom-*bc*₁-Komplex von *C. glutamicum* sein. Die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* ist abhängig von einem Cytochrom-*bc*₁-Komplex zur Weiterleitung der Elektronen vom Elektronendonator Menachinol bzw. Ubichinol. Da *C. glutamicum* einen ungewöhnlichen Cytochrom-*bc*₁-Komplex besitzt, welcher einen Superkomplex mit der Cytochrom-*aa*₃-Oxidase bildet (Bott & Niebisch, 2003), ist nicht auszuschließen, dass der *C. glutamicum* Cytochrom-*bc*₁-Komplex nicht mit der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* kompatibel ist. Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *C. glutamicum* enthält zwei Häm *c*, denn wahrscheinlich ist das separate lösliche Cytochrom *c* mit dem Cytochrom *c*₁ fusioniert. Möglicherweise steht der Cytochrom-*bc*₁-Komplex auch nicht frei zur Verfügung, da er wegen QcrC immer im Superkomplex gebunden ist. Darüber hinaus ist der Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *B. japonicum* selbst außergewöhnlich, denn die Gene von Cytochrom *c*₁ und Cytochrom *b* sind zu einem Gen fusioniert (Thöny-Meyer *et al.*, 1989). Auch sterische Hinderung könnte einer Interaktion von Cytochrom-*bc*₁-Komplex und Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase im Wege stehen. Um eine funktionale Expression der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum* in *C. glutamicum* zu erreichen, ist es also notwendig die Gründe für die FixG-Toxizität zu untersuchen, eventuell die oben beschriebenen Proteine (CcuA, Bll4880, Bll1131 und PcuC) für die Assemblierung der Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase in *C. glutamicum* zu exprimieren und festzustellen, ob der Cytochrom-*bc*₁-Komplex mit der Oxidase vom *cbb*₃-Typ interagieren kann.

7.4 Die heterologe Expression der Nitritreduktase Nrf aus *Wolinella succinogenes* und Nir aus *Mycobacterium smegmatis*

Um das bei der Nitratatmung entstehende Nitrit abzubauen, wurde versucht, heterologe Nitritreduktasen in *C. glutamicum* zu exprimieren. Die respiratorische Nitritreduktase Nrf aus *W. succinogenes* zeigte unter keiner der untersuchten Bedingungen Aktivität, weder aerob noch anaerob. Die Gründe hierfür konnten nicht ermittelt werden. Denkbar sind Probleme beim Einbau der Nitritreduktase in die Membran und bei der Cofaktorbereitstellung. Dies sollte untersucht werden um zu ergründen, warum die heterologe Expression nicht erfolgreich war.

Die cytosolische assimilatorische Nitritreduktase Nir aus *Mycobacterium smegmatis* (Amon *et al.*, 2009) konnte, wie bereits vom Kooperationspartner gezeigt, aerob funktionell in *C. glutamicum* exprimiert werden (Dr. N. Rehm und Prof. Dr. A. Burkovski, Universität Erlangen-Nürnberg, unveröffentlichte Daten). Mit Nitrit als einziger Stickstoffquelle wurde ein Wachstum von *C. glutamicum* in Glucose-Minimalmedium erreicht, bis das Nitrit verbraucht war. Jedoch gelang dies ausschließlich, wenn der pH-Wert des Mediums mit Natriumhydroxidlösung eingestellt wurde, und nicht, wenn Kaliumhydroxid verwendet wurde. Da im definierten CGXII-Minimalmedium nur Spuren von Natrium durch Verunreinigungen der eingesetzten Chemikalien vorhanden sind, wenn der pH-Wert mit Kaliumhydroxid eingestellt wird (vgl. Zusammensetzung von CGXII-Minimalmedium in Abschnitt 5.5.1.1), muss Natrium eine essentielle Funktion unter diesen speziellen Bedingungen haben. Man sollte untersuchen, ob Natrium eventuell in der Nitritreduktasereaktion wichtig ist. Hierzu sollte man das Enzym in Medium überproduzieren, in welchem kein Natrium vorhanden ist und nach der Aufreinigung Enzymaktivitätstests in Puffer mit und ohne Natrium durchführen. Gegebenenfalls spielt Natrium auch eine Rolle in Transportprozessen, z. B. im Export von toxischem Nitrit aus der Zelle. Da der Nitritexporter NarK3 bisher nicht untersucht wurde, ist nicht klar, wie der Nitritexport funktioniert, dieser könnte Natrium-abhängig sein.

Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat konnte keine Reduktion des Nitrits durch den die Nitritreduktase NirBD beobachtet werden. Der Stamm *C. glutamicum* pZ-nirBD-narK3 akkumulierte genauso viel Nitrit wie der Wildtyp, welches nicht weiter umgesetzt wurde. Daher war es nicht überraschend, dass auch bei der anaeroben Kultivierung mit Nitrit als einziger Stickstoffquelle keine Umsetzung des Nitrits und kein Wachstum beobachtet werden konnte. Da die vektorbasierte Expression der Nitritreduktase keiner Induktion bedarf, wurde die Nitritreduktase NirBD bereits in der aeroben Vorkultur in CGXII-Minimalmedium gebildet, sodass in den Zellen, welche für die Hauptkultur eingesetzt wurden, funktionale Nitritreduktase vorhanden sein musste. Daher ist es verwunderlich, dass diese keinerlei Aktivität in der anaeroben Hauptkultur zeigte. Die Aufnahme oder Umsetzung des Nitrits scheint unter anaeroben Bedingungen gehemmt zu sein. Es sollte zunächst geklärt werden,

ob die Nitritreduktase NADH- oder NADPH-abhängig ist. Hierzu könnte ein einfacher Enzymtest mit Rohextrakt von Zellen des aerob gewachsenen Stammes *C. glutamicum* pZ-*nirBD-narK3* durchgeführt werden. Sollte die Nitritreduktase NADPH-abhängig sein, könnte man einen anaeroben Wachstumsversuch durchführen, in welchem ein Substrat eingesetzt wird, welches über den Pentosephosphatweg abgebaut wird, da hierbei NADPH freigesetzt wird. Ungeklärt ist bisher auch die Biosynthese des Cofaktors Sirohäm in *C. glutamicum*, welcher in die Nitritreduktase Nir eingebaut wird. Es ist möglich, dass die Biosynthese von Sirohäm unter anaeroben Bedingungen in *C. glutamicum* nicht funktioniert, obwohl sie aerob offensichtlich funktional ist. Allerdings erklärt dies nicht, warum die Restaktivität der Nitritreduktase aus der Vorkultur des Stammes *C. glutamicum* pZ-*nirBD-narK3* nicht für eine teilweise Umsetzung des Nitrits unter anaeroben Bedingungen ausreichte. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, die klären könnten, warum die Nitritreduktase Nir funktional aerob, aber nicht anaerob in *C. glutamicum* exprimiert werden kann.

7.5 Der Einfluss von Nitrat und Nitrit auf *C. glutamicum*

Da *C. glutamicum* ein limitiertes Potential für anaerobes Wachstum durch Nitratatmung besitzt (Nishimura *et al.*, 2007; Takeno *et al.*, 2007), wurden Untersuchungen zum Nitrat- und Nitritstoffwechsel interessant. Bei der Nitratatmung akkumuliert Nitrit im Medium, welches nicht weiter umgesetzt wird und aufgrund seiner Toxizität das Wachstum limitiert. In dieser Arbeit wurden daher Untersuchungen zur Nitrat- und Nitrittoleranz von *C. glutamicum* unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Sowohl Nitrat als auch Nitrit verlangsamten das Wachstum von *C. glutamicum* konzentrationsabhängig. Hierbei wirkte wie erwartet Nitrit stärker wachstumshemmend als Nitrat. Trotz des relativ starken Wachstumsdefekts, welcher von 10 mM Nitrit ausgelöst wurde, war der Einfluss auf das globale Transkriptom eher gering. Die Gene für die Nitratreduktase wurden in diesen Analysen leicht (im Schnitt 1,5-fach), aber signifikant vermehrt transkribiert. Eine Ähnliche Erhöhung des mRNA-Spiegels des *nar*-Operons wurde auch bei 5 mM Nitrat und 3 mM Nitrit beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass es einen Regulationsmechanismus geben könnte, der auf Nitrat, Nitrit oder eine reaktive Stickstoffspezies reagiert und die Transkription des *nar*-Operons unter aeroben Bedingungen ermöglicht. Hierbei sind zwei Transkriptionsregulatoren interessante Kandidaten, zum einen ArnR, auf den im folgenden Kapitel näher eingegangen wird, zum anderen ein vorhergesagter Regulator aus der ArsR-Familie, der im Gen cg3082 kodiert wird. In allen Experimenten mit Nitrat oder Nitrit im Medium wurde das Gen cg3082 für den Transkriptionsregulator weniger stark transkribiert (0,3- bis 0,6-fach). Auch die dahinter liegenden Gene cg3083 (ein vorhergesagter Schwermetall-Kationentransporter) und cg3084 (eine putative Flavin-enthaltende Monooxygenase) wurden weniger stark exprimiert. Cg3082 und cg3083 bilden vermutlich ein

Operon und werden von DtxR reprimiert (Wennerhold & Bott, 2006). Cg3084 liegt in einem Operon mit cg3085 und wird ebenfalls von DtxR reguliert, sowie vom Regulator RosR, welcher auch ein Aktivator der Transkription des *nar*-Operons ist (Bussmann *et al.*, 2010). Eine genauere Untersuchung des Regulators Cg3082 und der dahinterliegenden Gene, z. B. über die Charakterisierung von Deletionsmutanten, ist vonnöten, um die Rolle in der Antwort auf nitrosativen Stress zu verstehen. Das Gen, welches den am stärksten erhöhten mRNA-Spiegel aufwies, war *hmp* (cg3141), welches für ein Flavohämoprotein kodiert. Die Rolle von Flavohämoprotein Hmp in *C. glutamicum* wurde im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht und wird im folgenden Kapitel beschrieben.

7.6 Das Flavohämoprotein Hmp in *C. glutamicum* ist in die Antwort auf nitrosativen Stress involviert

Nitratatmung und die Anwesenheit von Nitrit führen durch die Bildung von reaktiven Stickstoffspezies zu nitrosativem Stress in der Zelle. Eine gut untersuchte reaktive Stickstoffspezies ist Stickstoffmonoxid NO. Stickstoffmonoxid ist ein Radikal, welches mit den Eisenionen eisenhaltiger Enzyme (z.B. Aconitase (Gardner *et al.*, 1997)) reagiert, sodass das reaktive Zentrum blockiert wird. Es kann auch mit Membranbestandteilen und aromatischen Aminosäuren reagieren und diese inaktivieren bzw. zerstören, daher ist Stickstoffmonoxid toxisch für Zellen. Die Bildung von Stickstoffmonoxid ist ein Teil der Immunantwort von mit Bakterien infizierten Eukaryoten (De Groote & Fang, 1995). Dabei wird Stickstoffmonoxid durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) aus Arginin gebildet (Alderton *et al.*, 2001). In saurem Milieu kann aus Nitrit spontan NO durch Protonierung entstehen, wenn ein Elektronendonator vorhanden ist (z.B. Fe^{2+}), wobei sich zunächst salpetrige Säure bildet, welche mit einem weiteren Proton und einem Elektron zu NO und Wasser zerfällt. Da *C. glutamicum* das Medium im Verlauf der Kultivierung ansäuert, ist dies eine Möglichkeit für die Entstehung von NO. Es ist ebenfalls bekannt, dass Nitratreduktasen vom Nar-Typ in einer Nebenreaktion Nitrit zu NO umsetzen können, wenn Nitrit im Überschuss vorhanden ist (Gilberthorpe & Poole, 2008; Ji & Hollocher, 1988) (Abbildung 7-1). Möglicherweise kann auch die Cytochrom-*aa*₃-Oxidase aus *C. glutamicum* diese Reaktion katalysieren, denn in Mitochondrien kann sowohl Cytochrom *c* (Basu *et al.*, 2008) als auch die Cytochrom-*c*-Oxidase (Ball *et al.*, 2011) aus Nitrit NO bilden. Um zu klären, ob und wie NO in *C. glutamicum* gebildet wird, müssen diese Wege im Einzelnen untersucht werden.

Mechanismen um mit Stickstoffmonoxid umzugehen, wurden in verschiedenen pathogenen Bakterien beschrieben, z.B. in *E. coli*. Dessen Flavohämoglobin Hmp detoxifiziert Stickstoffmonoxid (Gardner *et al.*, 1998). Unter aeroben Bedingungen wird Stickstoffmonoxid NADH-abhängig von Hmp zu Nitrat umgesetzt, wobei ein Elektron von

NADH über die Cofaktoren FAD und Häm auf Sauerstoff übertragen wird. Das gebildete Superoxidanion (O_2^-) reagiert dann mit NO zu Nitrat. Unter anaeroben Bedingungen wurde gezeigt, dass Distickstoffmonoxid (N_2O) von Hmp gebildet wird (Kim *et al.*, 1999). Hierbei wird ein Elektron auf NO übertragen und zwei NO^- -Moleküle reagieren im Anschluss mit zwei Protonen zu N_2O und Wasser. Eine Δhmp -Mutante von *E. coli* kann den Harnweg von Mäusen nicht mehr infizieren, da *E. coli* nicht mehr auf die NO-Bildung des Wirts reagieren kann (Svensson *et al.*, 2010). So wurde gezeigt, dass Hmp ein wichtiger Schutzmechanismus von *E. coli* gegen die Bildung von NO in der Immunreaktion ist.

Zur genauen Rolle von Hmp in *C. glutamicum* wurden bisher keine Untersuchungen publiziert. Es ist bekannt, dass die Expression des Gens *hmp* durch den Regulator ArnR unter aeroben Bedingungen reprimiert wird (Nishimura *et al.*, 2008). Hmp wird bei anaerobem Wachstum mit Nitrat 30-fach vermehrt transkribiert (Nishimura *et al.*, 2011a), überraschenderweise jedoch nicht unter sauerstofflimitierten Bedingungen (Inui *et al.*, 2007). Demnach könnte auch Nitrat, Nitrit oder eine reaktive Stickstoffspezies ein Effektor von ArnR sein.

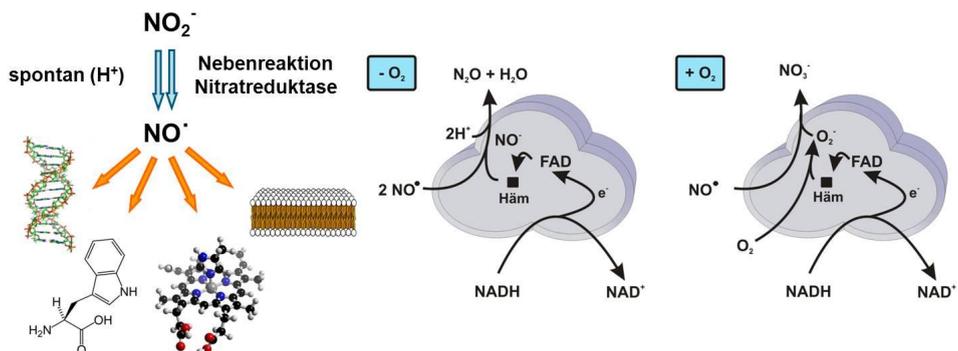


Abbildung 7-1: Links: Bildung von Stickstoffmonoxid aus Nitrit (NO_2^-) durch spontane Protonierung zu salpetriger Säure und dem anschließenden Zerfall in NO und Wasser im sauren Milieu oder durch die Nebenreaktion der Nitratreduktase. NO reagiert mit DNA, aromatischen Aminosäuren, eisenhaltigen Enzymen und Membranbestandteilen. Die Detoxifizierung von NO erfolgt durch Flavohämoprotein Hmp unter aeroben (rechts) und anaeroben Bedingungen (mittig).

Bei den Untersuchungen des Einflusses von Nitrat und Nitrit auf das Transkriptom von *C. glutamicum* wurde das Gen *cg3141*, welches für das Flavohämoprotein Hmp kodiert, am auffälligsten verändert transkribiert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf einen weiteren Regulationsmechanismus von *hmp* hin, der auf Nitrat, Nitrit oder reaktive Stickstoffspezies reagiert. Eine genauere Untersuchung der Rolle des Flavohämoproteins Hmp in *C. glutamicum* wurde in dieser Arbeit durchgeführt. Eine Deletionsmutante Δhmp wurde hergestellt und untersucht. Es zeigte sich, dass diese hypersensitiv gegenüber Nitrit

und dem NO-Donor Natriumnitroprussid war. Dies ist auch in entsprechenden Mutanten von *E. coli* und *B. subtilis* der Fall (Membrillo-Hernandez *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2004). Durch vektorbasierte Expression konnte der Wachstumsdefekt der Deletionsmutante aufgehoben werden. Demnach ist das Flavohämoprotein Hmp von *C. glutamicum* in die aerobe Antwort auf nitrosativen Stress involviert. Das Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat war bei der Mutante ebenfalls stark beeinträchtigt, was eine Rolle von Hmp auch in der anaeroben Antwort auf nitrosativen Stress zeigt.

Eine erhöhte Expression von Hmp zeigte keine Verbesserung der Nitritresistenz von *C. glutamicum*. Das Wachstum wurde im Gegenteil sogar durch eine vermehrte Expression gehemmt. Hierfür gibt es mehrere mögliche Gründe: (i) Die native Menge von Hmp unter Nitritstress ist möglicherweise schon optimal und bedarf keiner weiteren Erhöhung. Nitrit hat neben der Bildung von NO (durch Hmp detoxifiziert) noch weitere Wirkmechanismen, welche nicht durch Hmp beeinflusst werden können, sodass eine erhöhte Expression von Hmp keinen positiven Einfluss mehr haben kann. (ii) Möglicherweise hat Stickstoffmonoxid, das wahrscheinlichste Substrat von Hmp, eine Rolle in *C. glutamicum* als Signalmolekül. Es wurde z.B. für *E. coli* gezeigt, dass die Transkription der Nitritreduktase von NO abhängig ist (für ein Review zur NO-abhängigen Regulation siehe (Spiro, 2007)). Eine erhöhte Expression von Hmp könnte einen bisher unbekanntem Regulationsmechanismus stören. (iii) Es ist auch vorstellbar, dass der erhöhte Bedarf an Energie, Kohlenstoff und Stickstoff für die Überexpression von Hmp das Wachstum verlangsamt und dadurch den Vorteil einer höheren Nitritresistenz zunichtemacht.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K. & Kinoshita, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 279-301.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. (2001).** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **357**, 593-615.
- Amon, J., Titgemeyer, F. & Burkovski, A. (2009).** A genomic view on nitrogen metabolism and nitrogen control in *Mycobacteria*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 20-29.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215-237.
- Arslan, E. (2001).** The *cbb₃*- and *bd*-type oxidases of soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. Zürich, Schweiz: Eidgenössische Technische Hochschule.
- Arunothayanan, H., Nomura, M., Hamaguchi, R., Itakura, M., Minamisawa, K. & Tajima, S. (2010).** Copper metallochaperones are required for the assembly of bacteroid cytochrome *c* oxidase which is functioning for nitrogen fixation in soybean nodules. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1242-1246.
- Ball, K. A., Castello, P. R. & Poyton, R. O. (2011).** Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome *c* oxidase: Implications for phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* **102**, 182-191.
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Flechoso, F. & Martin, J. F. (2006).** Transcriptional analysis of the F_0F_1 ATPase operon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 reveals strong induction by alkaline pH. *Microbiology* **152**, 11-21.
- Barry, C. E., 3rd, Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schröder, B. G., Slayden, R. A. & Yuan, Y. (1998).** Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **37**, 143-179.
- Bartels, K. M., Funken, H., Knapp, A., Brocker, M., Bott, M., Wilhelm, S., Jäger, K. E. & Rosenau, F. (2011).** Glycosylation is required for outer membrane localization of the lectin LecB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **193**, 1107-1113.
- Basu, S., Azarova, N. A., Font, M. D., King, S. B., Hogg, N., Gladwin, M. T., Shiva, S. & Kim-Shapiro, D. B. (2008).** Nitrite reductase activity of cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **283**, 32590-32597.
- Bergersen, F. J. (1982).** *Root nodules of legumes: structure and functions*. Chichester; New York: Research Studies Press.
- Bertani, G. (1958).** Lysogeny. *Adv. Virus Res.* **5**, 151-193.
- Binder, S., Schendzielorz, G., Stäbler, N., Krumbach, K., Hoffmann, K., Bott, M. & Eggeling, L. (2012).** A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome Biol* **13**, R40.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- Blasco, F., Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Giordano, G. & Rothery, R. A. (2001).** The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 179-193.
- Blombach, B., Riestler, T., Wieschalka, S., Ziert, C., Youn, J. W., Wendisch, V. F. & Eikmanns, B. J. (2011).** *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3300-3310.
- Bokranz, M., Katz, J., Schröder, I., Roberton, A. & Kröger, A. (1983).** Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **135**, 36-41.
- Bott, M., Bolliger, M. & Hennecke, H. (1990).** Genetic analysis of the cytochrome *c-aa₃* branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. *Mol. Microbiol.* **4**, 2147-2157.
- Bott, M., Preisig, O. & Hennecke, H. (1992).** Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* **158**, 335-343.
- Bott, M. & Niebisch, A. (2003).** The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 129-153.
- Brown, K. R., Allan, B. M., Do, P. & Hegg, E. L. (2002).** Identification of novel hemes generated by heme *a* synthase: evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry* **41**, 10906-10913.
- Buhler, D., Rossmann, R., Landolt, S., Balsiger, S., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (2010).** Disparate pathways for the biogenesis of cytochrome oxidases in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **285**, 15704-15713.
- Bussmann, M., Baumgart, M. & Bott, M. (2010).** RosR (Cg1324), a hydrogen peroxide-sensitive MarR-type transcriptional regulator of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **285**, 29305-29318.
- Clegg, S., Yu, F., Griffiths, L. & Cole, J. A. (2002).** The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol. Microbiol.* **44**, 143-155.
- Cobine, P. A., Pierrel, F. & Winge, D. R. (2006).** Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 759-772.
- De Groote, M. A. & Fang, F. C. (1995).** NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin. Infect. Dis.* **21 Suppl 2**, S162-165.
- Dertz, E. A., Stintzi, A. & Raymond, K. N. (2006).** Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 1087-1097.
- Diesvelt, R. (2005).** Untersuchungen zum Serinhydroxymethyltransferase / *p*-Aminobenzoatsynthase Gencluster in *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Dusch, N., Puhler, A. & Kalinowski, J. (1999).** Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate-alpha-decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1530-1539.

- Eggeling, L. & Bott, M. (2005).** *Handbook of Corynebacterium glutamicum*: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. (1998).** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14863-14868.
- Ekici, S., Yang, H., Koch, H. G. & Daldal, F. (2012).** Novel transporter required for biogenesis of *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *MBio* **3**.
- Francis, R. T., Jr. & Becker, R. R. (1984).** Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal. Biochem.* **136**, 509-514.
- Frunzke, J., Bramkamp, M., Schweitzer, J. E. & Bott, M. (2008a).** Population heterogeneity in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 caused by prophage CGP3. *J. Bacteriol.* **190**, 5111-5119.
- Frunzke, J., Engels, V., Hasenbein, S., Gätgens, C. & Bott, M. (2008b).** Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol. Microbiol.* **67**, 305-322.
- Frunzke, J., Gatgens, C., Brocker, M. & Bott, M. (2011).** Control of heme homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* by the two-component system HrrSA. *J. Bacteriol.* **193**, 1212-1221.
- Gardner, P. R., Costantino, G., Szabo, C. & Salzman, A. L. (1997).** Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J. Biol. Chem.* **272**, 25071-25076.
- Gardner, P. R., Costantino, G. & Salzman, A. L. (1998).** Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. *J. Biol. Chem.* **273**, 26528-26533.
- Gilberthorpe, N. J. & Poole, R. K. (2008).** Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J. Biol. Chem.* **283**, 11146-11154.
- Göttfert, M., Hennecke, H. & Tabata, S. (2004).** In *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms*, pp. 99-112. Edited by R. Palacois & W. E. Newton. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. (1982).** Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Griess, J. P. (1879).** Bemerkungen zu der Abhandlung der HH: Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **12**, 426-428.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

- Hanahan, D. (1985).** Techniques of Transformation of *E. coli*. In *DNA-Cloning*, pp. 109-135. Edited by D. M. Glover: IRL-Press.
- Inui, M., Kawaguchi, H., Murakami, S., Vertes, A. A. & Yukawa, H. (2004).** Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 243-254.
- Inui, M., Suda, M., Okino, S., Nonaka, H., Puskas, L. G., Vertes, A. A. & Yukawa, H. (2007).** Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology* **153**, 2491-2504.
- Jäger, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G. & Wohlleben, W. (1992).** Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **174**, 5462-5465.
- Ji, X. B. & Hollocher, T. C. (1988).** Mechanism for nitrosation of 2,3-diaminonaphthalene by *Escherichia coli*: enzymatic production of NO followed by O₂-dependent chemical nitrosation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1791-1794.
- Jones, B. N. & Gilligan, J. P. (1983).** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* **266**, 471-482.
- Jordan, D. C. (1982).** NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **32**, 136-139.
- Kabashima, Y., Kishikawa, J., Kurokawa, T. & Sakamoto, J. (2009).** Correlation between proton translocation and growth: genetic analysis of the respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biochem.* **146**, 845-855.
- Kabus, A., Niebisch, A. & Bott, M. (2007).** Role of cytochrome *bd* oxidase from *Corynebacterium glutamicum* in growth and lysine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 861-868.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D. & other authors (2003).** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**, 5-25.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S. & other authors (2002).** Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**, 189-197.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**, 5595-5603.
- Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R. K. & Buchs, J. (2009).** Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb. Cell Fact.* **8**, 31.
- Kern, M., Mager, A. M. & Simon, J. (2007).** Role of individual *nap* gene cluster products in NapC-independent nitrate respiration of *Wolinella succinogenes*. *Microbiology* **153**, 3739-3747.

- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O. & Yanofsky, C. (2000).** DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12170-12175.
- Kim, S. O., Orii, Y., Lloyd, D., Hughes, M. N. & Poole, R. K. (1999).** Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.* **445**, 389-394.
- Kinoshita, S., Nakayama, K. & Akita, S. (1958).** Taxonomical study of glutamic acid accumulating bacteria, *Micrococcus glutamicus* nov. sp. *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan* **22**, 176-185.
- Kirchner, O. (1896).** Die Wurzelknöllchen der Sojabohne. *Beitr. Biol. Pflanz.* **7**, 213-224.
- Kirchner, O. & Tauch, A. (2003).** Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 287-299.
- Koch-Körffges, A. (2011).** Novel insights into the energy metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by comprehensive analysis of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Koch-Körffges, A., Kabus, A., Ochrombel, I., Marin, K. & Bott, M. (2012).** Physiology and global gene expression of a *Corynebacterium glutamicum* DeltaF₁F₀-ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 370-380.
- Koch-Körffges, A., Pfelzer, N., Platzen, L., Oldiges, M. & Bott, M. (2013).** Conversion of *Corynebacterium glutamicum* from an aerobic respiring to an aerobic fermenting bacterium by inactivation of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 699-708.
- Koch, H. G., Winterstein, C., Saribas, A. S., Alben, J. O. & Daldal, F. (2000).** Roles of the *ccoGHIS* gene products in the biogenesis of the *ccb₃*-type cytochrome *c* oxidase. *J. Mol. Biol.* **297**, 49-65.
- Kroger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G. & Lancaster, C. R. (2002).** Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 23-38.
- Kusumoto, K., Sakiyama, M., Sakamoto, J., Noguchi, S. & Sone, N. (2000).** Menaquinol oxidase activity and primary structure of cytochrome *bd* from the amino-acid fermenting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **173**, 390-397.
- Kusumoto, T., Aoyagi, M., Iwai, H., Kabashima, Y. & Sakamoto, J. (2011).** Monitoring enzyme expression of a branched respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum* using an EGFP reporter gene. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**, 257-266.
- Kuzma, M. M., Hunt, S. & Layzell, D. B. (1993).** Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiol.* **101**, 161-169.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liebl, W. (2001).** *Corynebacterium* nonmedical. In *The Prokaryotes*. Edited by M. Dworkin. Berlin Heidelberg New York: Springer.

- Lin, J. T. & Stewart, V. (1998).** Nitrate assimilation by bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 1-30, 379.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**, 1667-1674.
- Link, A. J., Phillips, D. & Church, G. M. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**, 6228-6237.
- Litsanov, B., Kabus, A., Brocker, M. & Bott, M. (2012).** Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* **5**, 116-128.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Meissner, D., Vollstedt, A., van Dijk, J. M. & Freudl, R. (2007).** Comparative analysis of twin-arginine (TAT)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 633-642.
- Membrillo-Hernandez, J., Coopamah, M. D., Anjum, M. F., Stevanin, T. M., Kelly, A., Hughes, M. N. & Poole, R. K. (1999).** The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a "nitric oxide releaser," and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **274**, 748-754.
- Miller, M. J. & Gennis, R. B. (1985).** The cytochrome *d* complex is a coupling site in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 14003-14008.
- Mimitsuka, T., Sawai, H., Hatsu, M. & Yamada, K. (2007).** Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2130-2135.
- Moore, C. M., Nakano, M. M., Wang, T., Ye, R. W. & Helmann, J. D. (2004).** Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J. Bacteriol.* **186**, 4655-4664.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nantapong, N., Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004).** Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 187-193.
- Nicholls, D. G. & Ferguson, S. J. (1992).** *Bioenergetics*. London: Academic Press.
- Niebisch, A. & Bott, M. (2001).** Molecular analysis of the cytochrome *bc₁-aa₃* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c₁*. *Arch. Microbiol.* **175**, 282-294.
- Nishimura, T., Vertes, A. A., Shinoda, Y., Inui, M. & Yukawa, H. (2007).** Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 889-897.

- Nishimura, T., Teramoto, H., Vertes, A. A., Inui, M. & Yukawa, H. (2008).** ArnR, a novel transcriptional regulator, represses expression of the *narKGHJI* operon in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **190**, 3264-3273.
- Nishimura, T., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2011a).** Gene expression profiling of *Corynebacterium glutamicum* during anaerobic nitrate respiration: induction of the SOS response for cell survival. *J. Bacteriol.* **193**, 1327-1333.
- Nishimura, T., Teramoto, H., Toyoda, K., Inui, M. & Yukawa, H. (2011b).** Regulation of the nitrate reductase operon *narKGHJI* by the cAMP-dependent regulator GlxR in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **157**, 21-28.
- Osman, D. & Cavet, J. S. (2008).** Copper homeostasis in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **65**, 217-247.
- Pappin, D. J., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. (1993).** Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**, 327-332.
- Patek, M. & Nesvera, J. (2011).** Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **154**, 101-113.
- Pawlik, G., Kulajta, C., Sachelaru, I., Schroder, S., Waidner, B., Hellwig, P., Daldal, F. & Koch, H. G. (2010).** The putative assembly factor CcoH is stably associated with the *cbb₃*-type cytochrome oxidase. *J. Bacteriol.* **192**, 6378-6389.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. (1999).** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Pittman, M. S., Corker, H., Wu, G., Binet, M. B., Moir, A. J. & Poole, R. K. (2002).** Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. *J. Biol. Chem.* **277**, 49841-49849.
- Pittman, M. S., Robinson, H. C. & Poole, R. K. (2005).** A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J. Biol. Chem.* **280**, 32254-32261.
- Platzen, L., Koch-Körfges, A., Weil, B., Brocker, M. & Bott, M. (2013).** Role of flavohaemoprotein Hmp and nitrate reductase NarGHJI of *Corynebacterium glutamicum* for coping with nitrite and nitrosative stress. *FEMS Microbiol Lett.*
- Preisig, O., Anthamatten, D. & Hennecke, H. (1993).** Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3309-3313.
- Preisig, O., Zufferey, R. & Hennecke, H. (1996a).** The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. *Arch. Microbiol.* **165**, 297-305.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A. & Hennecke, H. (1996b).** A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **178**, 1532-1538.

- Pugia, M. J., Lott, J. A., Wallace, J. F., Cast, T. K. & Bierbaum, L. D. (2000).** Assay of creatinine using the peroxidase activity of copper-creatinine complexes. *Clin. Biochem.* **33**, 63-70.
- Rauhamaeki, V., Bloch, D. A. & Wikstrom, M. (2012).** Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome *cbb₃*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7286-7291.
- Rodrigues, M. L., Scott, K. A., Sansom, M. S., Pereira, I. A. & Archer, M. (2008).** Quinol oxidation by *c*-type cytochromes: structural characterization of the menaquinol binding site of NrfHA. *J. Mol. Biol.* **381**, 341-350.
- Roth, L. E., Jeon, K. & Stacey, G. (1988).** Homology in endosymbiotic systems: The term "symbiosome". In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 220-225. Edited by R. Palacois & D. P. S. Verma. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K. & Anraku, Y. (1993).** In vitro heme *o* synthesis by the *cyoE* gene product from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26041-26044.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T. & Bott, M. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**, 4404-4422.
- Schelder, S., Zaade, D., Litsanov, B., Bott, M. & Brocker, M. (2011).** The two-component signal transduction system CopRS of *Corynebacterium glutamicum* is required for adaptation to copper-excess stress. *PLoS One* **6**, e22143.
- Schwarzer, A. & Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N Y)* **9**, 84-87.
- Seibold, G., Dempf, S., Schreiner, J. & Eikmanns, B. J. (2007).** Glycogen formation in *Corynebacterium glutamicum* and role of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Microbiology* **153**, 1275-1285.
- Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F. & Yokota, A. (2001).** H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 534-540.
- Serventi, F., Youard, Z. A., Murset, V. & other authors (2012).** Copper starvation-inducible protein for cytochrome oxidase biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.*
- Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996).** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* **6**, 639-645.

- Sharma, V., Wikstrom, M. & Kaila, V. R. (2012).** Dynamic water networks in cytochrome *cbb*₃ oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 726-734.
- Simon, J., Gross, R., Einsle, O., Kroneck, P. M., Kroger, A. & Klimmek, O. (2000).** A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**, 686-696.
- Sleight, S. C., Bartley, B. A., Lieviant, J. A. & Sauro, H. M. (2010).** In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2624-2636.
- Smith, K. M., Cho, K. M. & Liao, J. C. (2010).** Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1045-1055.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. & other authors (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Soberon, M., Williams, H. D., Poole, R. K. & Escamilla, E. (1989).** Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**, 465-472.
- Sone, N., Nagata, K., Kojima, H., Tajima, J., Kodera, Y., Kanamaru, T., Noguchi, S. & Sakamoto, J. (2001).** A novel hydrophobic diheme *c*-type cytochrome. Purification from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the *qcrCBA* operon encoding three subunit proteins of a putative cytochrome reductase complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 279-290.
- Spiro, S. (2007).** Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 193-211.
- Stähler, N., Oikawa, T., Bott, M. & Eggeling, L. (2011).** *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-Amino Acids. *J. Bacteriol.* **193**, 1702-1709.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. & Holle, A. (2003).** A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 952-965.
- Surpin, M. A., Moshiri, F., Murphy, A. M. & Maier, R. J. (1994).** Genetic evidence for a fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene* **143**, 73-77.
- Surpin, M. A., Lubben, M. & Maier, R. J. (1996).** The *Bradyrhizobium japonicum* *coxWXYZ* gene cluster encodes a *bb*₃-type ubiquinol oxidase. *Gene* **183**, 201-206.
- Svensson, L., Poljakovic, M., Save, S., Gilberthorpe, N., Schon, T., Strid, S., Corker, H., Poole, R. K. & Persson, K. (2010).** Role of flavohemoglobin in combating nitrosative stress in uropathogenic *Escherichia coli*-implications for urinary tract infection. *Microb. Pathog.* **49**, 59-66.
- Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K. & Ikeda, M. (2007).** Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1173-1182.
- Talbi, C., Sanchez, C., Hidalgo-Garcia, A., Gonzalez, E. M., Arrese-Igor, C., Girard, L., Bedmar, E. J. & Delgado, M. J. (2012).** Enhanced expression of *Rhizobium etli cbb*₃ oxidase improves drought tolerance of common bean symbiotic nitrogen fixation. *J. Exp. Bot.* **63**, 5035-5043.

- Tanner, A. C., Badger, S., Lai, C.-H., Listgarten, M. A., Visconti, R. A. & Socransky, S. S. (1981).** *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **31**, 432-445.
- Thomas, P. E., Ryan, D. & Levin, W. (1976).** An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **75**, 168-176.
- Thöny-Meyer, L., Stax, D. & Hennecke, H. (1989).** An unusual gene cluster for the cytochrome *bc₁* complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell* **57**, 683-697.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., Besra, G. S. & Bhatt, A. (2012).** *mmpL* genes are associated with mycolic acid metabolism in Mycobacteria and Corynebacteria. *Chem. Biol.* **19**, 498-506.
- Vertes, A. A., Inui, M. & Yukawa, H. (2005).** Manipulating corynebacteria, from individual genes to chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7633-7642.
- Wendisch, V. F. (1997).** Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur in vivo-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Wendisch, V. F., Zimmer, D. P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N. & Kustu, S. (2001).** Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal. Biochem.* **290**, 205-213.
- Wennerhold, J., Krug, A. & Bott, M. (2005).** The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under iron limitation and is itself repressed by DtxR. *J. Biol. Chem.* **280**, 40500-40508.
- Wennerhold, J. & Bott, M. (2006).** The DtxR regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **188**, 2907-2918.
- Wittmann, C., Kim, H. M., John, G. & Heinzle, E. (2003).** Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnol. Lett.* **25**, 377-380.
- Wolin, M. J., Wolin, E. A. & Jacobs, N. J. (1961).** Cytochrome-producing anaerobic *Vibrio succinogenes*, sp. n. *J. Bacteriol.* **81**, 911-917.
- Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H. & Thöny-Meyer, L. (1996).** Assembly and function of the cytochrome *cbb₃* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **271**, 9114-9119.

9 ANHANG

9.1 Ergänzende Abbildungen

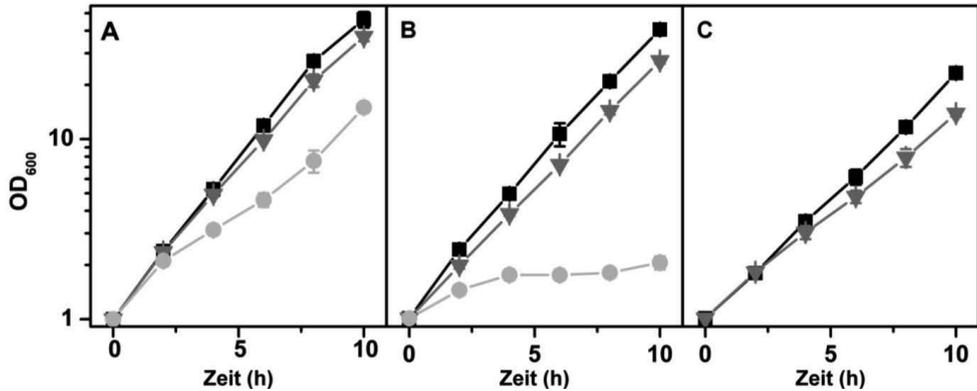


Abbildung 9-1: Vergleich der ersten 10 Stunden des Wachstums von *C. glutamicum* Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose mit verschiedenen Konzentrationen (A) 5 mM, (B) 50 mM und (C) 500 mM der Zusätze Kaliumnitrat (dunkelgraue Dreiecke), Kaliumnitrit (hellgraue Punkte) und Kaliumchlorid (schwarze Quadrate). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

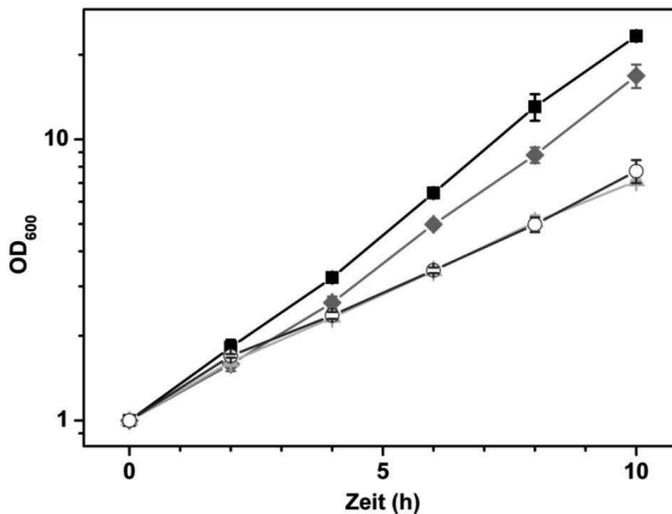


Abbildung 9-2: Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* Wildtyp mit Kaliumchlorid (125 mM, schwarze Quadrate), Kaliumnitrit (25 mM mit 100 mM Kaliumchlorid, hellgraue Dreiecke), Kaliumnitrat (100 mM mit 25 mM KCl, dunkelgraue Rauten) und einer Kombination von Nitrat und Nitrit (25 mM Nitrit, 100 mM Nitrat, offene Kreise) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

9.2 Vektorkarten

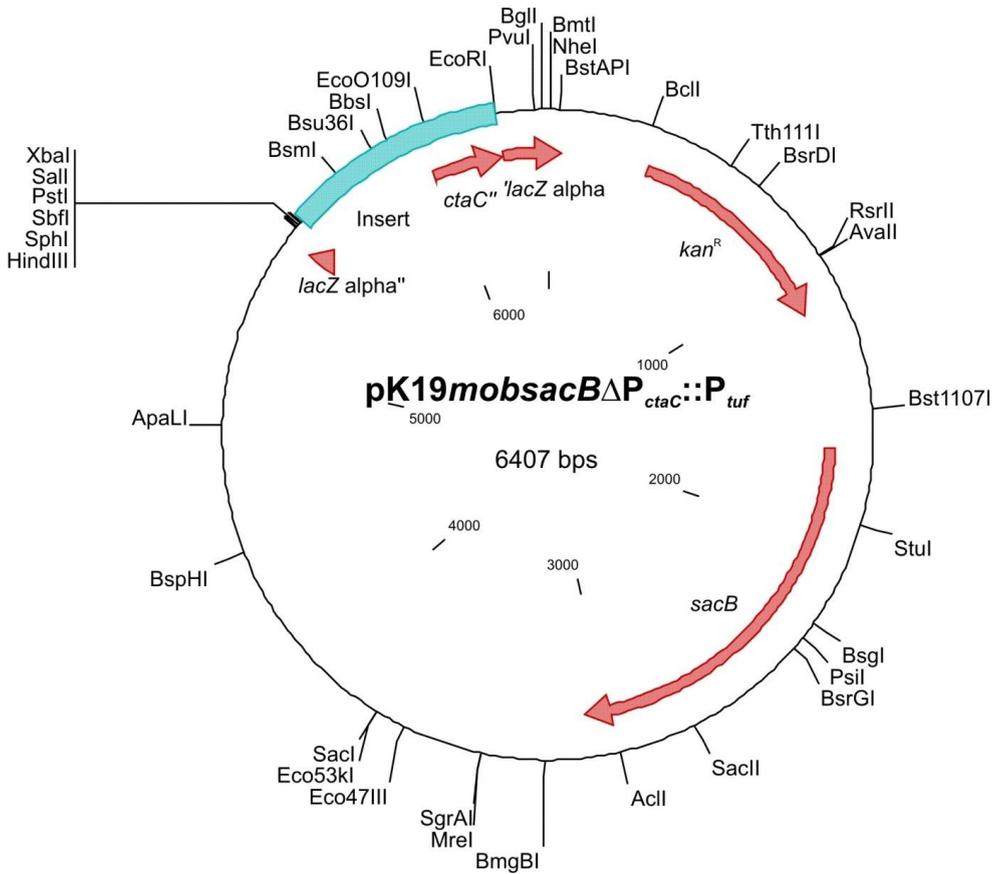


Abbildung 9-3: Vektorkarte des pK19mobsacB-Derivates pK19mobsacBΔPctac::Ptuf für den chromosomalen Austausch des Promotors von ctaC gegen P_{tuf}, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

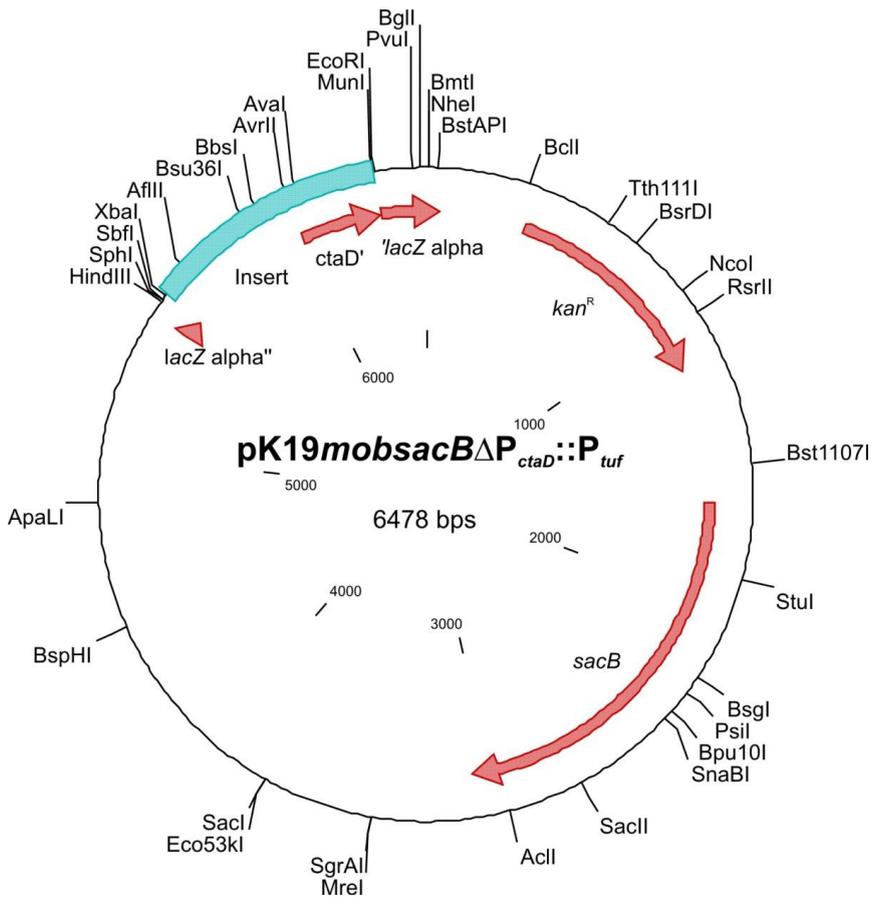


Abbildung 9-4: Vektorkarte des pK19mobsacB-Derivates pK19mobsacB Δ P_{ctaD}::P_{tuf} für den chromosomalen Austausch des Promotors von *ctaD* gegen P_{tuf} mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

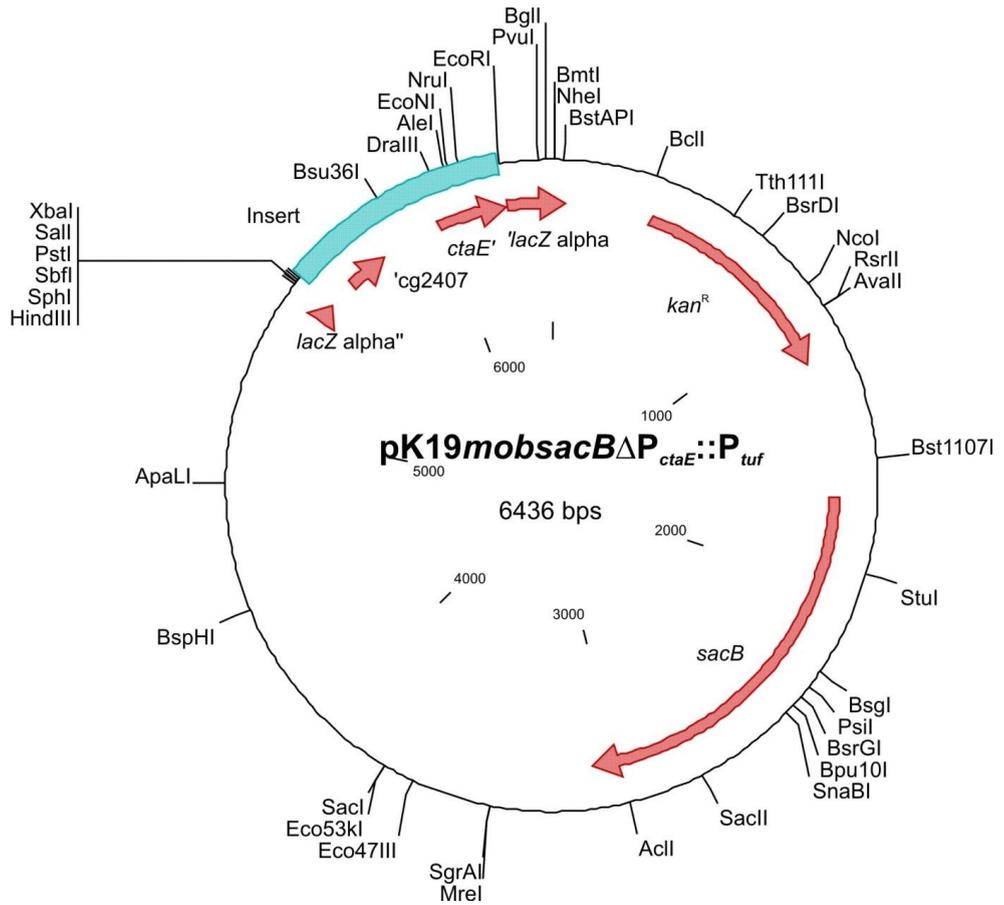


Abbildung 9-5: Vektorkarte des pK19mobsacB-Derivates pK19mobsacB Δ P_{ctaE}::P_{tuf} für den chromosomalen Austausch des Promotors von *ctaE* gegen P_{tuf}, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

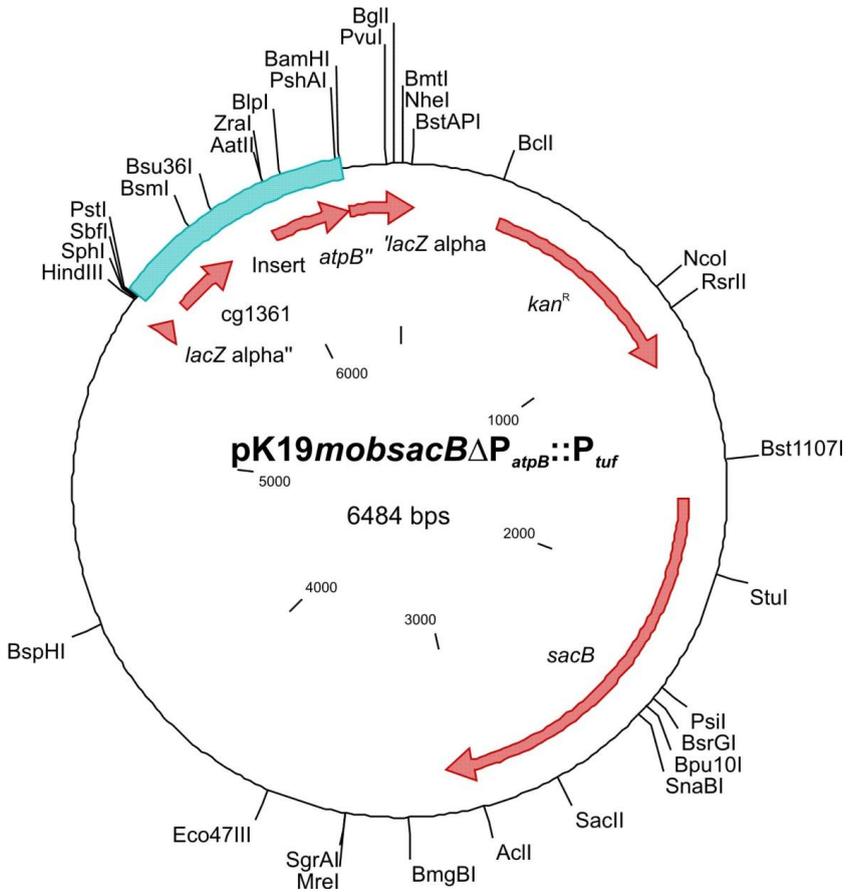


Abbildung 9-6: Vektorkarte des pK19mobsacB-Derivates pK19mobsacB Δ P_{atpB}::P_{tuf} für den chromosomalen Austausch des Promotors von atpB gegen P_{tuf} mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

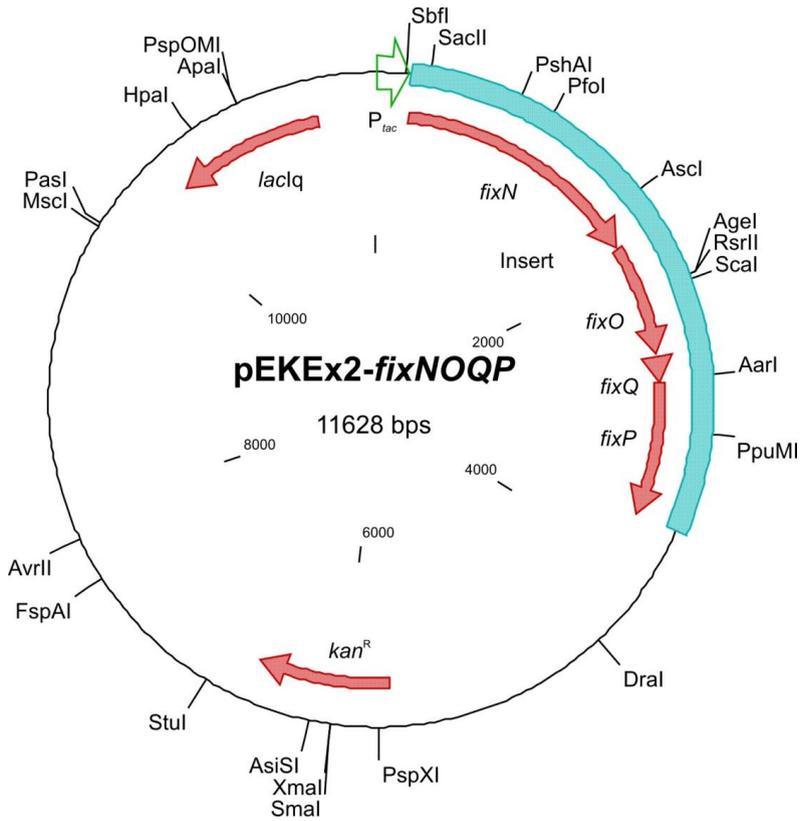


Abbildung 9-7: Vektorkarte des Expressionsvektors pEKEx2-fixNOQP für die Cytochrom-*cbb*₃-Oxidase aus *B. japonicum*, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

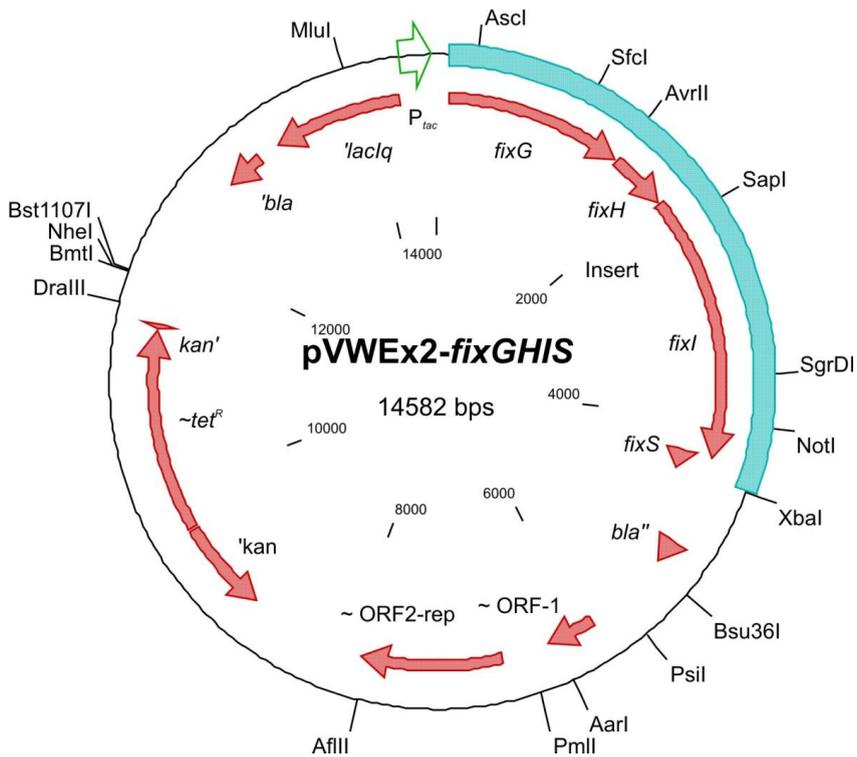


Abbildung 9-8: Vektorkarte des Expressionsvektors pVWEx2-fixGHIS für die akessorischen Proteine für den Aufbau der Cytochrom-*cbb₃*-Oxidase aus *B. japonicum*, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

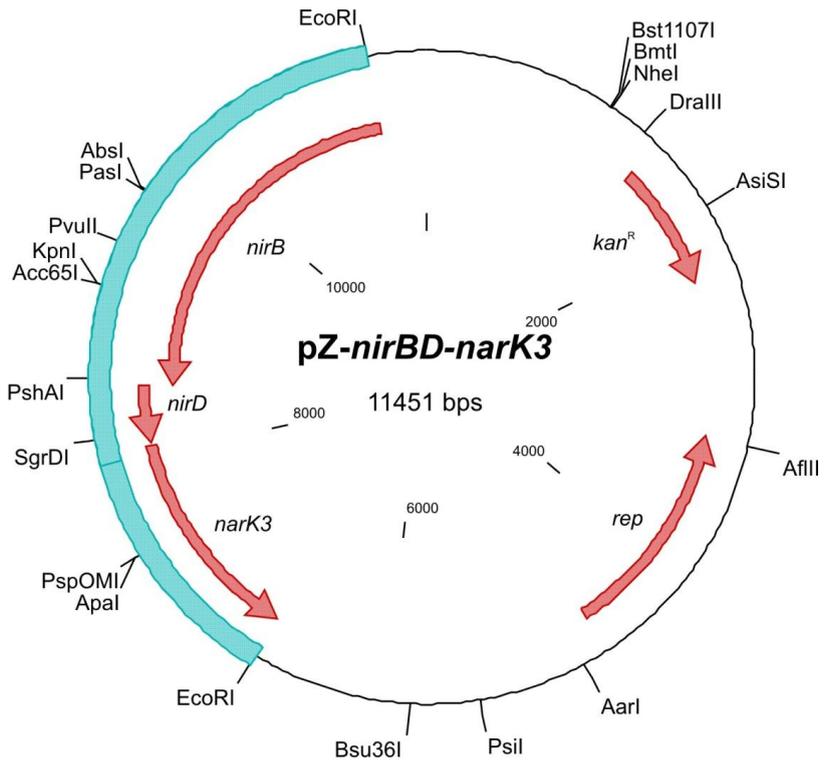


Abbildung 9-9: Vektorkarte des Expressionsvektors pZ-nirBD-narK3 für die heterologe Expression der assimilatorischen Nitritreduktase NirBD aus *M. smegmatis*, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

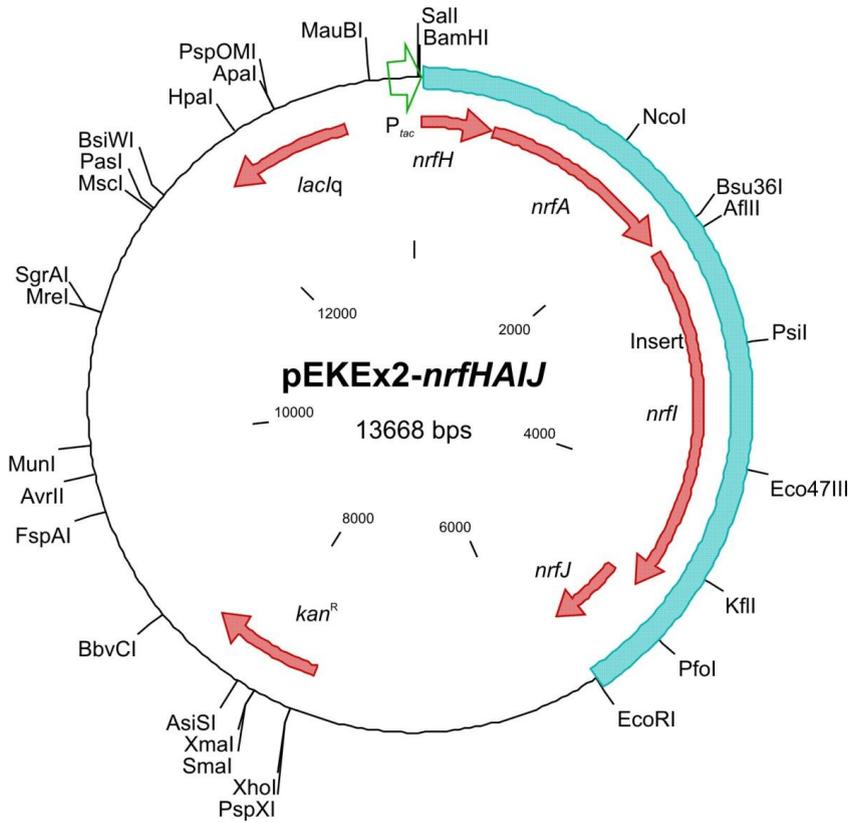


Abbildung 9-10: Vektorkarte des Expressionsvektors pEKEx2-nrfHAIJ für die heterologe Expression der dissimilatorischen Nitritreduktase NrfHA aus *W. succinogenes*, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

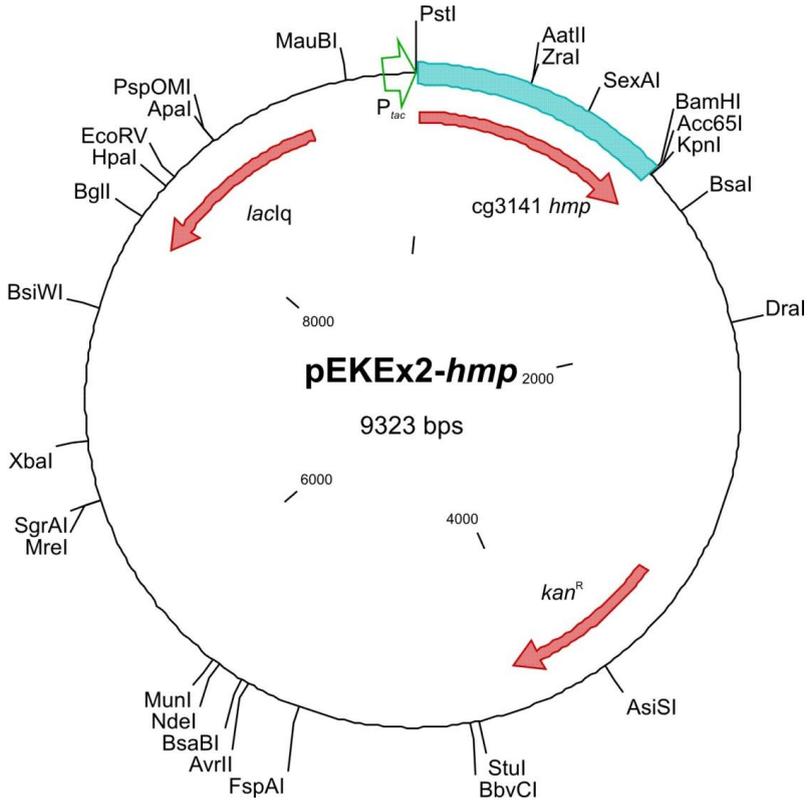


Abbildung 9-11: Vektorkarte des Expressionsvektors pEKEx2-hmp zur homologen Expression des Flavohämoproteins Hmp, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

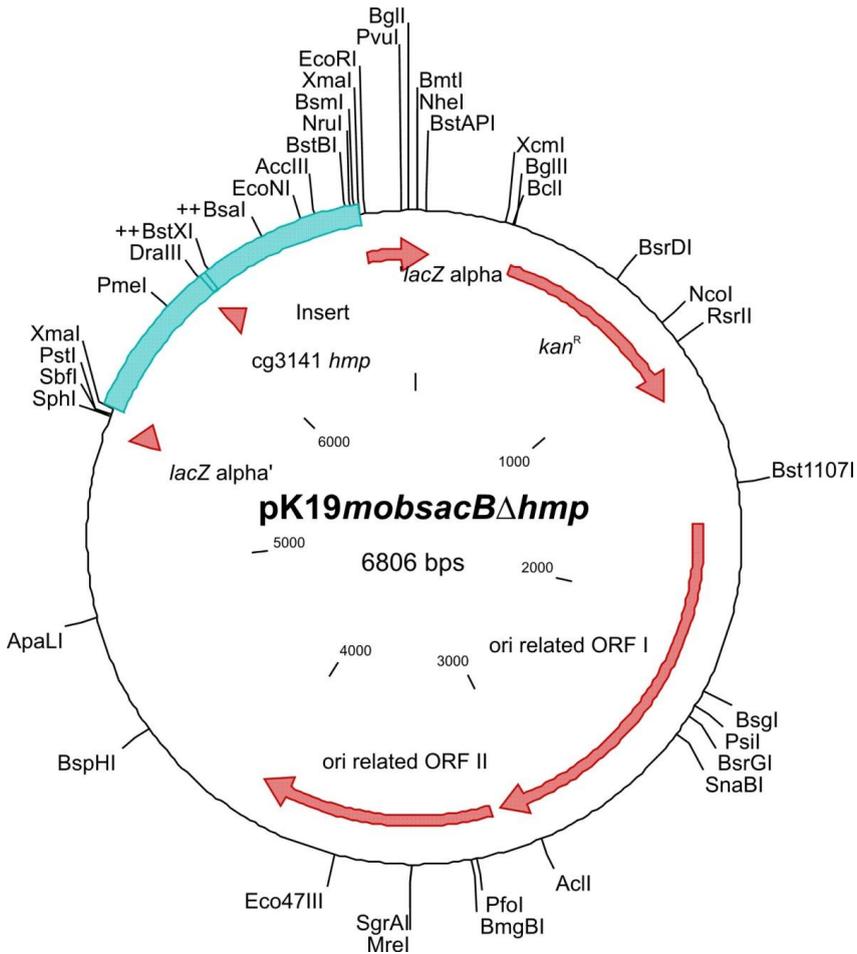


Abbildung 9-12: Vektorkarte des pK19mobsacB-Derivats pK19mobsacB Δ hmp zur chromosomalen Deletion von cg3141, hmp, mit allen einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

9.3 Ergänzende Tabellen

Tabelle 9-1: Wachstumsraten von *C. glutamicum* beim Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose mit verschiedenen Konzentrationen von Kaliumchlorid, Kaliumnitrat und Kaliumnitrit. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Konzentration (mM)	Wachstumsrate μ (h^{-1})		
	KCl	KNO ₃	KNO ₂
0	0,41 \pm < 0,01		
1	n.b.	n.b.	0,34 \pm 0,02
3	n.b.	n.b.	0,31 \pm 0,01
5	0,41 \pm < 0,01	0,38 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01
10	n.b.	n.b.	0,22 \pm 0,01
25	n.b.	n.b.	0,21 \pm 0,01
50	0,36 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01
100	n.b.	n.b.	letal
500	0,31 \pm < 0,01	0,26 \pm 0,01	n.b.
2000	n.b.	letal	n.b.

Tabelle 9-2: Ergebnisse der globalen Transkriptomanalysen des Stammes SC^{plus} im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind alle Gene des Prophagen CGP3.

cg-Nummer	Genname, Annotation	SC ^{plus} /WT	n	p-Wert
cg1890	hypothetisches Protein	0,034	3	0,005
cg1891	hypothetisches Protein	0,032	3	0,010
cg1892	hypothetisches Protein	0,137	3	0,001
cg1893	Acetyltransferase	0,026	3	0,003
cg1894	hypothetisches Protein	0,006	3	0,001
cg1895	putatives sekretiertes Protein	0,008	3	0,001
cg1896	putatives sekretiertes Protein	0,043	3	0,007
cg1897	putatives sekretiertes Protein	0,015	3	0,010
cg1898	hypothetisches Protein	0,156	3	0,018
cg1899	hypothetisches Protein	0,036	3	0,019
cg1900	hypothetisches Protein	0,139	3	0,001
cg1901	hypothetisches Protein	0,027	3	0,008
cg1902	putatives sekretiertes Protein	0,011	3	0,004
cg1903	ABC-Typ Transportsystem, ATPasekomponente	0,004	3	0,003
cg1904	hypothetisches Protein	0,009	3	0,009
cg1905	hypothetisches Protein	0,001	3	0,003
cg1906	hypothetisches Protein	0,003	3	0,002
cg1907	putative Phosphopantothenoilcysteine-synthetase/- decarboxylase	0,003	3	0,000
cg1908	hypothetisches Protein	0,006	3	0,002
cg1909	hypothetisches Protein	0,097	3	0,005
cg1910	putatives sekretiertes oder Membranprotein	0,004	3	0,005
cg1911	putatives sekretiertes Protein	0,003	3	0,013
cg1912	hypothetisches Protein	0,104	3	0,004
cg1913	hypothetisches Protein	0,072	3	0,002
cg1914	hypothetisches Protein	0,086	3	0,004

cg1915	hypothetisches Protein	0,061	2	0,062
Fortsetzung Tabelle 9-2				
cg-Nummer	Genname, Annotation	SC ^{plus} /WT	n	p-Wert
cg1916	hypothetisches Protein	0,076	3	0,001
cg1917	hypothetisches Protein	0,002	3	0,002
cg1918	putatives sekretiertes Protein	0,001	3	0,008
cg1919	hypothetisches Protein	0,085	3	0,003
cg1920	hypothetisches Protein	0,082	3	0,002
cg1921	hypothetisches Protein	0,060	3	0,001
cg1922	hypothetisches Protein	0,064	3	0,014
cg1923	hypothetisches Protein	0,061	3	0,012
cg1924	hypothetisches Protein	0,107	3	0,001
cg1925	hypothetisches Protein	0,020	3	0,004
cg1926	hypothetisches Protein	0,022	3	0,000
cg1927	putative molekulare Chaperone	0,069	3	0,001
cg1928	hypothetisches Protein	0,037	3	0,005
cg1929	<i>res</i> , Resolvase-Familie Recombinase	0,017	3	0,006
cg1930	putative sekretierte Hydrolase	0,031	3	0,010
cg1931	putatives sekretiertes Protein	0,018	3	0,002
cg1934	hypothetisches Protein	0,047	3	0,040
cg1935	<i>gntR2</i> , Gluconate-abhängiger Repressor	0,056	3	0,002
cg1936	putatives sekretiertes Protein	0,065	3	0,010
cg1937	putatives sekretiertes Protein	0,016	3	0,034
cg1940	putatives sekretiertes Protein	0,062	3	0,006
cg1941	putatives sekretiertes Protein	0,098	3	0,005
cg1942	putatives sekretiertes Protein	0,166	3	0,003
cg1943	hypothetisches Protein	0,258	3	0,004
cg1944	hypothetisches Protein	0,049	3	0,022
cg1945	hypothetisches Protein	0,038	3	0,001
cg1946	hypothetisches Protein	0,019	3	0,009
cg1947	hypothetisches Protein	0,043	3	0,005
cg1948	hypothetisches Protein	0,118	2	0,036
cg1949	hypothetisches Protein	0,233	3	0,012
cg1950	<i>tnp14b</i> (ISCg14a), Transposase	0,289	3	0,011
cg1951	<i>tnp14a</i> (ISCg14a), Transposase	0,146	3	0,013
cg1954	hypothetisches Protein	0,067	2	0,052
cg1955	putatives sekretiertes Protein	0,038	3	0,000
cg1956	<i>recJ</i> , einzelsträngige-DNA-spezifische Exonuclease	0,033	3	0,014
cg1957	hypothetisches Protein	0,046	2	0,026
cg1959	<i>priP</i> , Prophage DNA-Primase	0,104	3	0,003
cg1960	hypothetisches Protein	0,053	3	0,013
cg1961	hypothetisches Protein	0,017	3	0,003
cg1962	hypothetisches Protein	0,005	3	0,002
cg1963	Superfamilie II DNA/RNA-Helicase	0,013	3	0,005
cg1964	hypothetisches Protein	0,081	3	0,001
cg1965	ähnlich zu hypothetischem Protein gp57-Phage N15	0,114	3	0,005
cg1966	hypothetisches Protein	0,002	3	0,004
cg1967	hypothetisches Protein	0,021	3	0,002
cg1968	hypothetisches Protein	0,025	3	0,006
cg1969	hypothetisches Protein	0,054	3	0,004
cg1970	hypothetisches Protein	0,035	3	0,000
cg1971	hypothetisches Protein	0,129	2	0,003
cg1974	putatives Lysin	0,027	3	0,007
cg1975	hypothetisches Protein	0,012	3	0,002

cg1976	hypothetisches Protein	0,026	2	0,013
Fortsetzung Tabelle 9-2				
cg-Nummer	Genname, Annotation	SC^{plus}/WT	n	p-Wert
cg1977	putatives sekretiertes Protein	0,019	3	0,004
cg1978	hypothetisches Protein	0,042	3	0,007
cg1980	MoxR-ähnliche ATPase	0,058	3	0,008
cg1981	hypothetisches Protein	0,009	3	0,007
cg1982	ATPase mit Chaperone-Aktivität, ATP-bindende UE	0,042	3	0,007
cg1983	hypothetisches Protein	0,053	3	0,006
cg1984	hypothetisches Protein	0,065	3	0,000
cg1985	Superfamilie I DNA oder RNA-Helicase	0,041	3	0,005
cg1986	hypothetisches Protein	0,079	3	0,010
cg1987	hypothetisches Protein	0,071	3	0,007
cg1988	hypothetisches Protein	0,047	3	0,003
cg1989	hypothetisches Protein	0,045	3	0,007
cg1990	NUDIX Hydrolase	0,291	3	0,020
cg1991	ähnlich dem gp52-Bacteriophagen PHIC31	0,058	3	0,001
cg1992	hypothetisches Protein	0,007	3	0,006
cg1993	hypothetisches Protein	0,019	3	0,002
cg1994	hypothetisches Protein	0,023	3	0,003
cg1995	hypothetisches Protein	0,035	3	0,002
cg1996	<i>cgIII</i> M, Modification-methylase	0,005	3	0,001
cg1997	<i>cgII</i> R, Typ II Restriktionsendonuclease	0,004	3	0,003
cg1998	<i>cgIII</i> R, Restriktionsendonuclease CGLIIR Protein	0,004	3	0,003
cg1999	hypothetisches Protein	0,034	3	0,002
cg2000	hypothetisches Protein	0,018	3	0,012
cg2001	hypothetisches Protein	0,025	3	0,006
cg2002	hypothetisches Protein	0,025	3	0,010
cg2003	hypothetisches Protein	0,045	3	0,002
cg2004	ähnlich dem 232 Protein-Lactobacillus Bacteriophage g1e	0,021	3	0,019
cg2005	konserviertes hypothetisches Protein-Plasmid-kodiert	0,029	3	0,013
cg2006	hypothetisches Protein	0,012	3	0,008
cg2007	hypothetisches Protein	0,049	3	0,001
cg2008	hypothetisches Protein	0,038	3	0,000
cg2009	putative CLP-Familie ATP-bindende Protease	0,047	3	0,003
cg2010	Permease der <i>major facilitator</i> Superfamilie	0,039	3	0,022
cg2011	hypothetisches Protein	0,054	3	0,006
cg2012	putatives sekretiertes Protein	0,154	2	0,030
cg2014	hypothetisches Protein	0,021	3	0,002
cg2015	hypothetisches Protein	0,176	3	0,006
cg2016	hypothetisches Protein	0,038	3	0,018
cg2017	hypothetisches Protein	0,044	3	0,006
cg2018	hypothetisches Protein	0,028	3	0,002
cg2019	hypothetisches Protein	0,031	3	0,008
cg2020	hypothetisches Protein	0,033	3	0,010
cg2021	ähnlich zu p18, Bacteriophage CP-1 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	0,071	3	0,004
cg2022	putatives sekretiertes Protein	0,033	3	0,008
cg2023	hypothetisches Protein	0,180	3	0,020
cg2024	putative Nuclease UE des Excinucleasekomplexes	0,043	3	0,016
cg2025	hypothetisches Protein	0,003	3	0,005
cg2026	hypothetisches Protein	0,002	3	0,004
cg2027	hypothetisches Protein	0,027	3	0,004
cg2028	hypothetisches Protein	0,025	3	0,000

cg2029	hypothetisches Protein	0,028	3	0,003
Fortsetzung Tabelle 9-2				
cg-Nummer	Genname, Annotation	SC^{plus}/WT	n	p-Wert
cg2030	hypothetisches Protein	0,027	3	0,005
cg2031	hypothetisches Protein	0,025	3	0,011
cg2032	hypothetisches Protein	0,042	3	0,003
cg2033	putatives sekretiertes Protein	0,011	3	0,008
cg2034	hypothetisches Protein	0,002	3	0,002
cg2035	putative Methyltransferase	0,078	3	0,003
cg2036	putatives sekretiertes Protein	0,015	3	0,001
cg2037	hypothetisches Protein	0,077	3	0,006
cg2038	hypothetisches Protein	0,036	3	0,000
cg2039	hypothetisches Protein	0,009	3	0,003
cg2040	putativer Transkriptionsregulator	0,005	3	0,007
cg2041	hypothetisches Protein	0,022	3	0,010
cg2042	putatives sekretiertes Protein	0,028	3	0,007
cg2043	hypothetisches Protein	0,002	3	0,003
cg2044	putatives sekretiertes Protein	0,054	3	0,010
cg2045	hypothetisches Protein	0,015	3	0,004
cg2046	hypothetisches Protein	0,005	3	0,005
cg2047	putatives sekretiertes Protein	0,017	3	0,000
cg2048	hypothetisches Protein	0,065	2	0,061
cg2049	hypothetisches Protein	0,076	2	0,032
cg2050	hypothetisches Protein	0,051	3	0,003
cg2051	hypothetisches Protein	0,033	3	0,002
cg2052	putatives sekretiertes Protein	0,005	3	0,014
cg2053	hypothetisches Protein	0,008	3	0,003
cg2054	hypothetisches Protein	0,013	3	0,000
cg2055	hypothetisches Protein	0,037	3	0,005
cg2056	hypothetisches Protein	0,096	3	0,010
cg2057	putatives sekretiertes Protein	0,024	3	0,007
cg2058	hypothetisches Protein	0,026	3	0,015
cg2059	putatives sekretiertes Protein	0,322	3	0,003
cg2060	hypothetisches Protein	0,257	3	0,015
cg2061	<i>psp3</i> , putatives sekretiertes Protein	0,166	3	0,002
cg2062	ähnlich dem Plasmid-kodiertem Protein PXO2,09	0,046	3	0,008
cg2063	hypothetisches Protein	0,060	3	0,018
cg2064	DNA-Topoisomerase I (omega-Protein)	0,079	3	0,001
cg2065	Superfamilie II DNA oder RNA-Helicase	0,178	3	0,014
cg2070	<i>int2</i> , putative Phage-integrase (C-terminales Fragment)	0,256	3	0,014
cg2071	<i>int2</i> ', putative Phage-integrase (N-terminales Fragment)	0,107	3	0,001

DANKSAGUNG

Für ihre Hilfe und Unterstützung während meiner Doktorarbeit möchte ich herzlich den folgenden Personen danken:

Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die Überlassung der interessanten, herausfordernden Themen und die Betreuung in den letzten Jahren.

PD Dr. Ulrich Schulte danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und den unermüdlichen Einsatz im Studiengang Biochemie.

Dr. Melanie Brocker möchte ich für die Betreuung und die entspannte Fahrgemeinschaft danken.

Prof. Dr. Andreas Burkovski und Dr. Nadine Rehm danke ich für den Expressionsvektor pZ-*nirBD-nark3*.

Dem BMBF und der Firma Evonik danke ich für die Finanzierung meines Projekts im Rahmen des Projekts FlexFit.

Allen meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die lustige Zeit und die konstruktive Zusammenarbeit. Dr. Simon Klaffl, Doris Rittmann, Dr. Christian Schulz und Uli Viets danke ich für die angenehme Zeit in Labor und Büro. Dr. Simon Klaffl und Michael Vogt danke ich für die Unterstützung an der uHPLC. Dr. Tino Polen und Andreas Küberl möchte ich für die Hilfe mit den DNA-Microarrays danken. Dr. Horst Funken und Andreas Knapp danke ich für die Hilfe mit der qRT-PCR. Brita Weil danke ich für die Hilfe bei Klonierungen und Kultivierungen. Dr. Meike Baumgart und Tina Mack möchte ich für die MALDI-Messungen danken. Steffi Schweikert und Sonja Müller danke ich für die Henkel-Revivals. Allen weiteren Kollegen des IBG danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und das lustige Miteinander.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Abigail Koch-Körffges, Dr. Sabine Krawczyk und Dr. Irene Kullartz für die großartige Unterstützung und ihre Freundschaft. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Mädels, Ihr seid die Besten!

Meinen Eltern und meinen Schwestern bin ich zu großem Dank verpflichtet, da sie mich immer unterstützt haben und mir den Rücken frei gehalten haben. Danke.

Und Arne, danke, dass Du immer zu mir und mich bei Verstand gehalten hast.

Band / Volume 55

Development of Surface-FIDA towards a diagnostic tool for Alzheimer's disease

L. Wang-Dietrich (2012), VI, 103 pp
ISBN: 978-3-89336-801-3

Band / Volume 56

Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum*

S. Scheele (2012), vii, 127 pp
ISBN: 978-3-89336-815-0

Band / Volume 57

Novel insights into the energy metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by comprehensive analysis of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation

A. Koch-Körfges (2012), III, 137 pp
ISBN: 978-3-89336-826-6

Band / Volume 58

Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen

P. Rohe (2012), 165 pp
ISBN: 978-3-89336-834-1

Band / Volume 59

Validation and characterisation of novel cellular ligands of membrane-associated HIV-1 Nef

E.C.Kammula (2012), 151 pp
ISBN: 978-3-89336-839-6

Band / Volume 60

Untersuchungen zur Membranintegrität während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

S. Fleckenstein (2013), VI, 160 pp
ISBN: 978-3-89336-841-9

Band / Volume 61

Characterization of Novel Amyloid- β Peptide (A β) Binding Ligands

S. Dornieden (2013), vii, 129 pp
ISBN: 978-3-89336-844-0

Band / Volume 62

Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

A. R. Chattopadhyay (2013), VIII, 195 pp
ISBN: 978-3-89336-845-7

Band / Volume 63

***Gluconobacter oxydans* strain development:
Studies on central carbon metabolism and respiration**

J. Richhardt (2013), III, 181 pp

ISBN: 978-3-89336-851-8

Band / Volume 64

**Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum*
für die Produktion einer Dicarbonsäure**

A. Otten (2013), 98 pp

ISBN: 978-3-89336-860-0

Band / Volume 65

**Rapid Development of Small-Molecule producing Microorganisms
based on Metabolite Sensors**

S. Binder (2013), 138 pp

ISBN: 978-3-89336-872-3

Band / Volume 66

**Increasing the NADPH supply for whole-cell biotransformation
and development of a novel biosensor**

S. Solvej (2013), 130 pp

ISBN: 978-3-89336-900-3

Band / Volume 67

**Expression, purification and biophysical characterization
of human Presenilin 2**

G. Yang (2013), 159 pp

ISBN: 978-3-89336-928-7

Band / Volume 68

**Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum*
und Rolle des Flavohämoproteins Hmp**

L. Plätzen (2013), IV, 119 pp

ISBN: 978-3-89336-931-7

Weitere **Schriften des Verlags im Forschungszentrum Jülich** unter
<http://www.zb1.fz-juelich.de/verlagextern1/index.asp>



Gesundheit / Health
Band / Volume 68
ISBN 978-3-89336-931-7

