

Energie- und Redoxstoffwechsel  
von *Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Armin Kabus

aus Solingen

Februar 2006

**Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Forschungszentrum Jülich GmbH unter Anleitung von Prof. Dr. M. Bott durchgeführt.**

**Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Referent: Prof. Dr. M. Bott**

**Korreferent: Prof. Dr. H. Weiss**

**Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2006**

## Abstract

In this work three different aspects of the energy and redox metabolism of the aerobic Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* were investigated. This species is used industrially for the large-scale production of amino acids, in particular the flavour-enhancer L-glutamate (1.5 million tons per year) and the feed-additive L-lysine (0.8 million tons per year).

In the main part of the work, the role of cytochrome *bd* oxidase for growth and lysine production was analysed. Previous investigations suggested that electron transfer to oxygen by the wild type ATCC 13032 is mainly catalysed by the cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* supercomplex and that cytochrome *bd* oxidase is of minor importance. In the current work it could be shown, however, that the deletion of the cytochrome *bd* oxidase genes *cydAB* in strain 13032 led to a drastic growth defect, starting in the late exponential growth phase. In the lysine-producing strains MH20-22B and DM1730, deletion of the *cydAB* genes had only minor effects on growth, but lysine formation was increased by approximately 10 %, which is probably due to a reduced glucose demand for energy generation and maintenance. Thus, the respiratory chain was shown to be a target for metabolic engineering. The different effects of the *cydAB* deletion on growth might result from different growth rates and different ATP requirements for biomass and lysine formation. Overproduction of an active cytochrome *bd* oxidase, which was verified by an increased cytochrome *d* content and increased oxygen consumption rates, led to reduced growth rates and reduced biomass formation of all strains mentioned above, whereas lysine production varied strain-specifically. The negative effect of *bd* overproduction on growth might be explained by a reduced P/O ratio due to an increased electron flow through the *bd* branch of the respiratory chain.

In a second part of this work, *C. glutamicum* strains lacking the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase genes (*atpBEFHAGDC*) were constructed and characterised. These mutants can form ATP only via substrate-level phosphorylation and, as expected, showed strongly reduced growth rates and cell yields on glucose minimal medium. Furthermore, they formed large amounts of acetate, indicating a limitation of the carbon flux through the tricarboxylic acid cycle. Deletion of the F<sub>0</sub> genes (*atpBFE*) in strain DM1730 led to a significant decrease in lysine formation, but caused the excretion of alanine.

In the third part of this work, the membrane-integral transhydrogenase PntAB from *Escherichia coli* was overproduced in *C. glutamicum* DM1730 in order to improve the NADPH availability, which is critical for lysine formation. PntAB uses the electrochemical proton potential to reduce NADP<sup>+</sup> with NADH. During growth on glucose, the recombinant strain with a transhydrogenase activity of 0.6 μmol min<sup>-1</sup> (mg protein)<sup>-1</sup> formed 18 % more lysine than the parental strain lacking PntAB. Thus, overproduction of PntAB represents a novel metabolic engineering strategy to improve L-lysine production by *C. glutamicum*.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden drei Aspekte des Energie- und Redoxstoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum* untersucht, einem aeroben, Gram-positiven Bodenbakterium, das zur industriellen Aminosäureproduktion, insbesondere dem Geschmacksverstärker L-Glutamat (1,5 Millionen Tonnen pro Jahr) und dem Futtermitteladditiv L-Lysin (0,8 Millionen Tonnen pro Jahr), genutzt wird. Im ersten Teil wurde die Rolle der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase für das Wachstum und die Lysin-Produktion untersucht. Bisherige Untersuchungen deuteten daraufhin, dass im Wildtyp ATCC13032 in erster Linie der Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex den Elektronentransfer zu Sauerstoff katalysiert und die Cytochrom-*bd*-Oxidase von untergeordneter Bedeutung ist. Demgegenüber konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion der *bd*-Oxidase-Gene *cydAB* im Stamm 13032 ab der spätexponentiellen Phase zu einem starken Wachstumsdefekt führte. In den Lysin-Produktionsstämmen MH20-22B und DM1730 hatte die *cydAB*-Deletion keinen großen Einfluss auf das Wachstum, führte aber zu einer Steigerung der Lysinproduktion um etwa 10 %, und zwar vermutlich aufgrund eines reduzierten Glucose-Bedarfs für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Die unterschiedlichen Effekte der *cyd*-Deletion auf das Wachstum der Stämme könnten auf unterschiedlichen Wachstumsraten und dem unterschiedlichen ATP-Bedarf für Biomassebildung und Lysinbildung beruhen. Die Überproduktion einer aktiven Cytochrom-*bd*-Oxidase, die durch einen erhöhten Cytochrom-*d*-Gehalt und erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate verifiziert wurde, hatte in allen o.g. Stämmen einen negativen Einfluss auf die Wachstumsrate und die Biomassebildung, während der Einfluss auf die Lysinbildung stammspezifisch variierte. Das reduzierte Wachstum kann durch eine verstärkte Nutzung des *bd*-Oxidase-Zweigs der Atmungskette und eine damit einhergehende Reduktion des P/O-Quotienten erklärt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Stämme konstruiert und charakterisiert, die aufgrund fehlender  $F_1F_0$ -ATP-Synthase-Gene (*atpBEFHAGDC*) ATP nur noch über Substratstufenphosphorylierung bilden können. Die Stämme zeigten erwartungsgemäß stark reduzierte Wachstumsraten und Zellausbeuten und bildeten z.T. hohe Konzentrationen an Acetat, was auf eine Limitierung des Kohlenstoffflusses durch den Citrat-Zyklus hindeutet. Die Deletion der  $F_0$ -Gene (*atpBEF*) im Stamm DM1730 führte zu einer deutlich reduzierten Lysinbildung, stattdessen wurden aber signifikante Mengen an Alanin gebildet.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht, die für die Lysinbildung kritische NADPH-Verfügbarkeit durch Überproduktion der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB aus *Escherichia coli* in *C. glutamicum* DM1730 zu verbessern. PntAB nutzt das elektrochemische Protonenpotential, um  $\text{NADP}^+$  mit NADH zu reduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Stamm mit einer Transhydrogenase-Aktivität von ca. 0,6

U/mg bei Wachstum auf Glucose 18 % mehr Lysin bildete als der Referenzstamm ohne diese Aktivität. Die PntAB-Überproduktion stellt somit eine neue *metabolic engineering* Strategie zur Verbesserung der L-Lysin Produktion durch *C. glutamicum* dar.



## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1	<b>Atmungskette und oxidative Phosphorylierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>.....</b>	<b>3</b>
2	<b>NADPH-Abhängigkeit der Lysinbiosynthese in <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>7</b>
3	<b>Das Thema der Arbeit .....</b>	<b>10</b>
<b>III</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
1	<b>Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen) .....</b>	<b>11</b>
2	<b>Nährmedien .....</b>	<b>11</b>
3	<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>13</b>
4	<b>Plasmide .....</b>	<b>14</b>
5	<b>Bakterienstämme .....</b>	<b>15</b>
6	<b>Stammhaltung von Bakterienstämmen .....</b>	<b>15</b>
7	<b>Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>.....</b>	<b>16</b>
8	<b>Bestimmung der Zelltrockenmasse .....</b>	<b>16</b>
9	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>17</b>
9.1	DNA-Isolierung.....	17
9.2	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	18
9.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	18
9.4	Rekombinante DNA-Techniken.....	19
9.5	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	20
9.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen .....	21
9.7	Konstruktion von Deletionsmutanten .....	21
9.8	Polymerasekettenreaktion.....	22
9.9	Southern-Blot-Analyse .....	23
9.10	DNA-Sequenzierung .....	24
<b>10</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>24</b>
10.1	Proteinpräparation.....	24
10.2	Präparation von Zellmembranen aus <i>C. glutamicum</i> .....	25
10.3	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	25
10.4	Bestimmung der Transhydrogenaseaktivität.....	26
10.5	Analyse von Cytochromen .....	27
10.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	27
10.7	2-D-Gelelektrophorese .....	27

10.8	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	29
<b>11</b>	<b>Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten.....</b>	<b>30</b>
<b>12</b>	<b>Bestimmung der Glucosekonzentration.....</b>	<b>30</b>
12.1	Enzymatisch-photometrische Glucose - Bestimmung.....	30
12.2	Enzymatisch-amperometrische Glucose - Bestimmung.....	32
<b>13</b>	<b>Chromatographische Methoden .....</b>	<b>33</b>
13.1	Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC .....	33
13.2	Bestimmung organischer Säuren mittels HPLC.....	36
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>1</b>	<b>Rolle der terminalen Cytochrom <i>bd</i> Oxidase für das Wachstum und die Lysinproduktion von <i>Corynebacterium glutamicum</i> Stämmen .....</b>	<b>37</b>
1.1	Deletion der Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase-Gene <i>cydAB</i> in <i>C. glutamicum</i> .....	37
1.2	Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 $\Delta$ <i>cydAB</i> .....	38
1.3	Charakterisierung der Mutante MH20-22B $\Delta$ <i>cydAB</i> .....	40
1.4	Charakterisierung der Mutante DM1730 $\Delta$ <i>cydAB</i> .....	43
1.5	Überexpression der Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase-Gene.....	45
1.6	Überexpression der <i>cydAB</i> -Gene in MH20-22B .....	48
1.7	Überexpression der <i>cydABDC</i> -Gene in ATCC 13032.....	49
1.8	Überexpression der <i>cydABDC</i> -Gene in <i>C. glutamicum</i> -Lysinproduktionsstämmen.....	51
<b>2</b>	<b>Einfluss der Deletion der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase auf das Wachstum und die Lysinproduktion von <i>Corynebacterium glutamicum</i>-Stämmen.....</b>	<b>55</b>
2.1	Konstruktion von $\Delta$ F <sub>0</sub> - und $\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -Mutanten der Stämme 13032 und DM1730.....	55
2.2	Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 $\Delta$ F <sub>0</sub> .....	59
2.3	Charakterisierung der Mutante DM1730 $\Delta$ F <sub>0</sub> .....	62
2.4	Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 $\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> .....	63
2.5	Proteomanalyse von ATCC13032 $\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> .....	64
<b>3</b>	<b>Einfluss einer heterologen Transhydrogenase auf die Aminosäureproduktion .....</b>	<b>68</b>
3.1	Überproduktion der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB von <i>E. coli</i> in <i>C. glutamicum</i> DM1730 .....	68
3.1.1	Konstruktion eines Stammes zur heterologen Überexpression der <i>pntAB</i> -Gene .....	68
3.1.2	Charakterisierung des <i>pntAB</i> -Überexpressionsstammes.....	70

---

V	Diskussion.....	74
1	Rolle der terminalen Cytochrom <i>bd</i> Oxidase für das Wachstum des <i>C. glutamicum</i> Wildtyps.....	74
2	Rolle der terminalen Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase für das Wachstum und die Lysinproduktion von <i>C. glutamicum</i> Stämmen .....	78
3	Einfluss einer F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase-Deletion auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> .....	80
4	Proteomvergleich der Stämme <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und ATCC 13032ΔF <sub>1</sub> F <sub>0</sub> .....	85
5	Einfluss einer F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase Deletion auf die Aminosäureproduktion von <i>C. glutamicum</i> .....	86
6	Veränderungen in der NADPH-Verfügbarkeit und ein damit verbundener Einfluss auf die Aminosäureproduktion von <i>C. glutamicum</i> .....	86
VI	Literaturverzeichnis.....	88
VII	Anhang .....	99
A1	Sequenz der Gene <i>atpBEFHAGDC</i> aus <i>C. glutamicum</i> .....	99
A2	Sequenz der Gene <i>cydA</i> , <i>cydB</i> , <i>cydD</i> und <i>cydC</i> aus <i>C. glutamicum</i> .....	103
A3	Sequenz der Gene <i>pntA</i> und <i>pntB</i> aus <i>E. coli</i> .....	106
A4	Restriktionskarten der konstruierten Plasmide .....	108
A5	MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerprintanalyse.....	112

## Abkürzungen

$\varepsilon$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
$\lambda$	Lambda, Wellenlänge
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ ) oder Wachstumsrate
$\Omega$	Ohm
A	Ampère
ATP/ADP	Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat
Amp <sup>R</sup>	Ampicilinresistenz
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion – Sorbitol
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi ( $10^{-2}$ )
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
F	Farad
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
k	Kilo ( $10^3$ )

---

Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
LB	Luria Bertani
LBHIS	Luria Bertani - Brain Heart Infusion - Sorbitol
LC	Liquid Chromatography
m	milli- ( $10^{-3}$ ) oder Meter
M	molar (mol/l)
max.	maximal(e)
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute(n)
MOPS	3- <i>N</i> -Morpholinopropansulfonsäure
n	nano ( $10^{-9}$ )
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidiert/reduziert
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, oxidiert/reduziert
Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
o.a.	oben aufgeführt
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ODS	Octadecylsilan
orf	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PVP	Polyvinylpyrrolidin
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium Saline Citrate
TAE	Tris base - Acetic acid - EDTA
TBE	Tris base - Boric acid - EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris base - EDTA
TES	Tris base - EDTA - Sodium chlorid
Triton X-100	4-Octylphenolpolyethoxylat

## VI Abkürzungen

---

TZ	Trockenzellen
U	Unit (1 Unit = 1 $\mu$ mol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## I Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden drei Aspekte des Energie- und Redoxstoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum* untersucht, einem aeroben, Gram-positiven Bodenbakterium, das zur industriellen Aminosäureproduktion, insbesondere dem Geschmacksverstärker L-Glutamat (1,5 Millionen Tonnen pro Jahr) und dem Futtermitteladditiv L-Lysin (0,8 Millionen Tonnen pro Jahr), genutzt wird. Im ersten Teil wurde die Rolle der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase für das Wachstum und die Lysin-Produktion untersucht. Bisherige Untersuchungen deuteten daraufhin, dass im Wildtyp ATCC13032 in erster Linie der Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex den Elektronentransfer zu Sauerstoff katalysiert und die Cytochrom-*bd*-Oxidase von untergeordneter Bedeutung ist. Demgegenüber konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion der *bd*-Oxidase-Gene *cydAB* im Stamm 13032 ab der spätexponentiellen Phase zu einem starken Wachstumsdefekt führte. In den Lysin-Produktionsstämmen MH20-22B und DM1730 hatte die *cydAB*-Deletion keinen großen Einfluss auf das Wachstum, führte aber zu einer Steigerung der Lysinproduktion um etwa 10 %, und zwar vermutlich aufgrund eines reduzierten Glucose-Bedarfs für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Die unterschiedlichen Effekte der *cyd*-Deletion auf das Wachstum der Stämme könnten auf unterschiedlichen Wachstumsraten und dem unterschiedlichen ATP-Bedarf für Biomassebildung und Lysinbildung beruhen. Die Überproduktion einer aktiven Cytochrom-*bd*-Oxidase, die durch einen erhöhten Cytochrom-*d*-Gehalt und erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate verifiziert wurde, hatte in allen o.g. Stämmen einen negativen Einfluss auf die Wachstumsrate und die Biomassebildung, während der Einfluss auf die Lysinbildung stammspezifisch variierte. Das reduzierte Wachstum kann durch eine verstärkte Nutzung des *bd*-Oxidase-Zweigs der Atmungskette und eine damit einhergehende Reduktion des P/O-Quotienten erklärt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Stämme konstruiert und charakterisiert, die aufgrund fehlender  $F_1F_0$ -ATP-Synthase-Gene (*atpBEFHAGDC*) ATP nur noch über Substratstufenphosphorylierung bilden können. Die Stämme zeigten erwartungsgemäß stark reduzierte Wachstumsraten und Zellausbeuten und bildeten z.T. hohe Konzentrationen an Acetat, was auf eine Limitierung des Kohlenstoffflusses durch den Citrat-Zyklus hindeutet. Die Deletion der  $F_0$ -Gene (*atpBEF*) im Stamm DM1730 führte zu einer deutlich reduzierten Lysinbildung, stattdessen wurden aber signifikante Mengen an Alanin gebildet.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht, die für die Lysinbildung kritische NADPH-Verfügbarkeit durch Überproduktion der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB aus *Escherichia coli* in *C. glutamicum* DM1730 zu verbessern. PntAB nutzt das elektrochemische Protonenpotential, um  $NADP^+$  mit NADH zu reduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Stamm mit einer Transhydrogenase-Aktivität von ca. 0,6 U/mg bei Wachstum auf Glucose 18 % mehr Lysin bildete als der Referenzstamm ohne

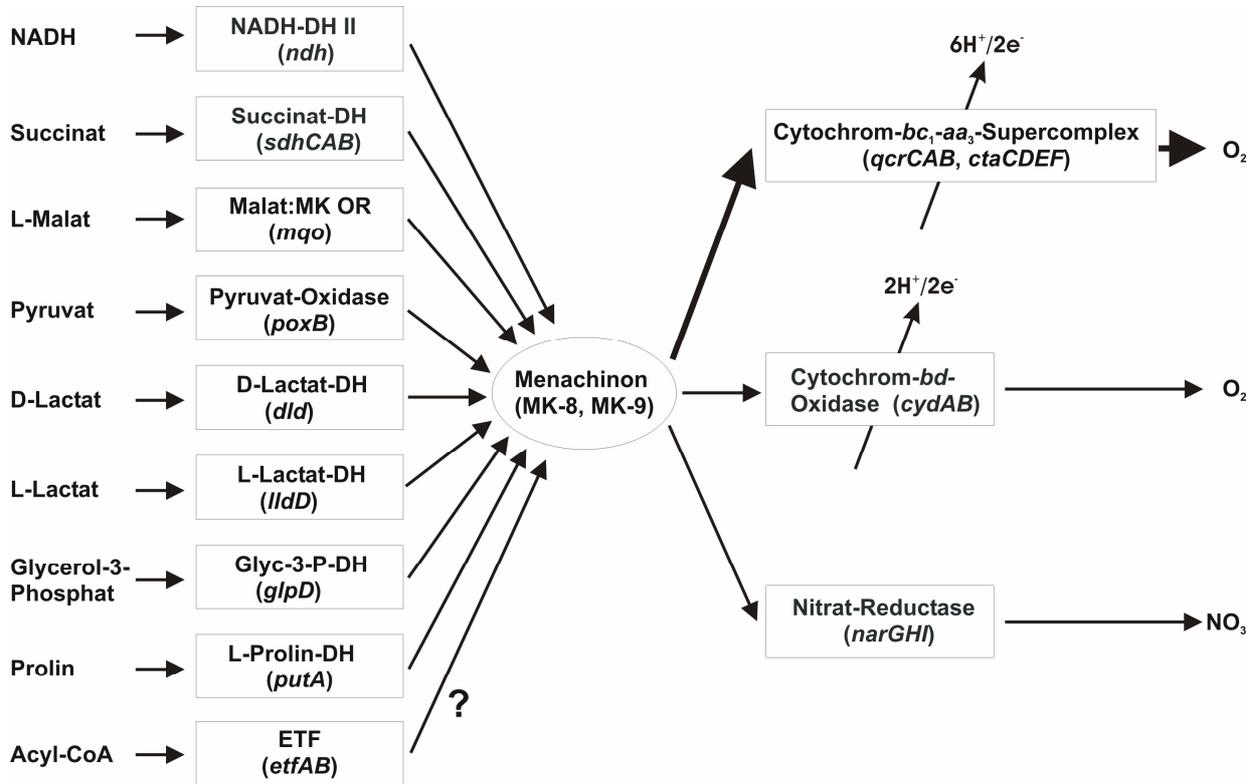
diese Aktivität. Die PntAB-Überproduktion stellt somit eine neue *metabolic engineering* Strategie zur Verbesserung der L-Lysin Produktion durch *C. glutamicum* dar.

## II Einleitung

### 1 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung von *Corynebacterium glutamicum*

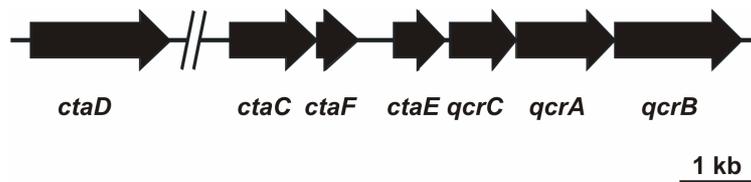
Das Gram-positive aerobe Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* wird im großen Maßstab zur biotechnologischen Aminosäureproduktion verwendet, insbesondere von L-Glutamat (Kimura 2005) und L-Lysin (Hermann 2003; Kelle *et al.* 2005). Studien der letzten Jahre zeigten, dass *C. glutamicum*, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, eine verzweigte Atmungskette besitzt, die zwei terminale Oxidasen enthält (Bott und Niebisch 2003). Beiden Wegen gemeinsam ist der initiale Transfer von Reduktionsäquivalenten auf Menachinon durch verschiedene Dehydrogenasen, wie z.B. der NADH-Dehydrogenase (Typ II), der Succinat-Dehydrogenase oder der Malat:Chinon-Oxidoreduktase. Im Gegensatz zu anderen Organismen, wie z.B. *Escherichia coli*, besitzt *C. glutamicum* keine membranintegrale, protonen-pumpende NADH-Dehydrogenase vom Typ I (Komplex I). Mit Ausnahme der Succinat-Dehydrogenase, die durch das *sdhCAB*-Operon kodiert wird, sind alle anderen Dehydrogenasen in *C. glutamicum* vermutlich membranassoziierte Proteine. Die Reduktion von Menachinon durch die Succinat-Dehydrogenase stellt vermutlich einen revertierten Elektronentransport dar, der durch das elektrochemische Protonenpotential getrieben wird (Schirawski und Unden 1998). Die Reoxidation des Menachinols wird entweder durch den Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex katalysiert, der die Elektronen weiter auf die terminale Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase transferiert, oder alternativ durch die terminale Cytochrom-*bd*-Oxidase. Der Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex wird durch die *qcrCAB*-Gene kodiert und besteht aus Cytochrom *c*<sub>1</sub> (QcrC), dem Rieske Eisen-Schwefel-Protein (QcrA) und Cytochrom *b* (QcrB; Niebisch und Bott 2001). Cytochrom *c*<sub>1</sub> ist ungewöhnlich, da es zwei kovalent gebundene Hämgruppen trägt (Sone *et al.* 2001; Niebisch und Bott 2001) und vermutlich das einzige *c*-Typ-Cytochrom in *C. glutamicum* ist. In Übereinstimmung mit der Annahme, dass die zweite Hämgruppe des Cytochrom *c*<sub>1</sub> die Funktion eines separaten Cytochrom *c* beim Elektronentransfer auf die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase übernimmt, konnte kürzlich gezeigt werden, dass der *bc*<sub>1</sub>-Komplex und die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase einen Superkomplex bilden (Niebisch und Bott 2003), der vermutlich eine hohe Elektronentransferrate zwischen diesen beiden Komplexen erlaubt. Mutanten, in denen durch ortsgerichtete Mutagenese jeweils die zwei Cysteinreste der beiden CXXCH-Bindemotive von QcrC zu Serinresten ausgetauscht wurden, zeigten einen drastischen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp, was darauf hindeutet, dass kein funktioneller *bc*<sub>1</sub>-Komplex mehr assembliert wird. Weiterhin konnte weder durch spezifische Hämfärbung noch durch Differenzspektroskopie von Membranen der o. g. Mutanten ein weiteres *c*-Typ-Cytochrom detektiert werden. Der Elektronentransfer

auf das Cu<sub>A</sub>-Zentrum der aa<sub>3</sub>-Oxidase durch ein weiteres lösliches Cytochrom-c kann somit ausgeschlossen werden.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der verzweigten Atmungskette von *C. glutamicum* (nach Bott and Niebisch 2003).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Cytochrom-aa<sub>3</sub>-Oxidase aus vier Untereinheiten besteht, die von den Genen *ctaD* (Untereinheit I; Niebisch und Bott 2001), *ctaC* (Untereinheit II; Sakamoto *et al.* 2001), *ctaE* (Untereinheit III; Niebisch und Bott 2001) und *ctaF* (Untereinheit IV; Niebisch und Bott 2003) kodiert werden. Aus der Genomsequenz von *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.* 2003) konnte abgeleitet werden, dass die letzten drei Gene unmittelbar stromaufwärts des *qcrCAB*-Genclusters lokalisiert sind, wohingegen *ctaD* 345 kb stromaufwärts von *ctaC* lokalisiert ist (Abb. 2.2).

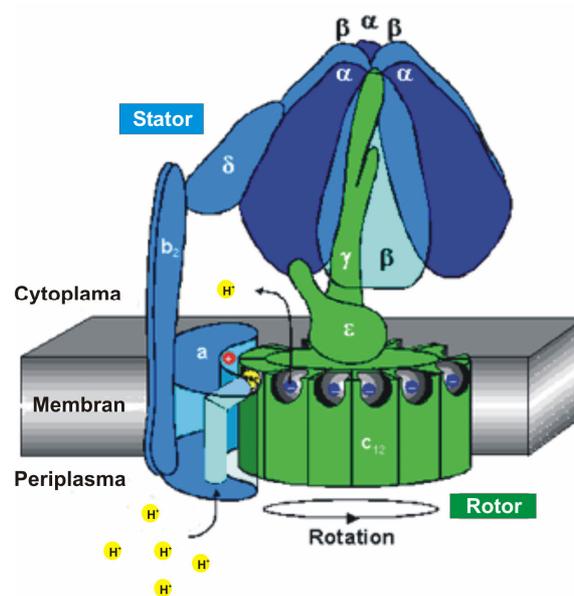


**Abbildung 2.2:** Anordnung der Gene für den Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex (*qcrCAB*) und die Cytochrom-aa<sub>3</sub>-Oxidase (*ctaD*, Untereinheit I; *ctaC*, Untereinheit II; *ctaF*, Untereinheit IV; *ctaE*, Untereinheit III) in *C. glutamicum*.

Die terminale Cytochrom-*bd*-Oxidase wurde eingehender von Kusumoto *et al.* (2000) untersucht und besteht aus zwei Untereinheiten, die durch die Gene *cydA* (Untereinheit I) und *cydB* (Untereinheit II) kodiert werden. Diese Gene liegen unmittelbar stromaufwärts der *cydDC*-Gene für einen ABC-Transporter, der möglicherweise den Export von Cystein (Pittman *et al.* 2002) und Glutathion (Pittman *et al.* 2005) katalysiert.

Die beiden Wege der aeroben Atmungskette von *C. glutamicum* unterscheiden sich in einigen Aspekten. (1) Die Sauerstoffaffinität der Cytochrom-*bd*-Oxidase ist wahrscheinlich viel höher als die der Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase, die bei etwa 50  $\mu\text{M}$  liegt (Matsushita *et al.* 1998). (2) Der  $K_i$  Wert für Cyanid der Cytochrom-*bd*-Oxidase liegt bei 5,3 mM (Kusumoto *et al.* 2000), wohingegen er für die Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase unterhalb von 0,1 mM liegt (Matsushita *et al.* 1998). (3) Beide terminalen Oxidasen enthalten Eisen, aber die Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase benötigt zusätzlich Kupferionen für ihre Aktivität. (4) Mutanten des Stammes ATCC13032, denen die Gene *qcrCAB*, *ctaD* oder *ctaF* fehlen, sind stark in ihrem aeroben Wachstum beeinträchtigt (Niebisch und Bott 2001, 2003), wohingegen Mutanten, denen die *cydAB*-Gene fehlen, auf Komplexmedium-Agarplatten vergleichbar dem Wildtyp wachsen (Bott und Niebisch 2005). (5) Während der Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex vermutlich konstitutiv gebildet wird, scheint die Cytochrom-*bd*-Oxidase ein induzierbares Enzym zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die Cytochrom-*bd*-Oxidase verstärkt unter Kupfermangelbedingungen gebildet wird (Sugiyama *et al.* 1973; Kusumoto *et al.* 2000). Ob auch eine Induktion der Cytochrom-*bd*-Oxidase in der stationären Phase stattfindet und der Elektronentransport dann verstärkt über die *bd*-Oxidase verläuft (Kusumoto *et al.* 2000), wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht. Zusätzlich kann man vermuten, dass die Expression der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Gene wie in *Mycobacterium smegmatis* (Kana *et al.* 2001) unter Sauerstofflimitationsbedingungen induziert wird. (6) Die beiden Atmungskettenwege unterscheiden sich in ihrer bioenergetischen Effizienz. Gemäß den allgemein akzeptierten Werten liegt das  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Verhältnis des *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* Zweiges bei drei (Nicholls und Ferguson, 2002), wohingegen es für den Cytochrom-*bd*-Weg nur eins beträgt (Miller und Gennis, 1985; Puustinen *et al.* 1991). Folglich unterscheidet sich das P/O-Verhältnis um einen Faktor von drei. Der P/O-Quotient gibt die Anzahl der Moleküle ADP an, die zu ATP phosphoryliert werden, wenn  $2\text{e}^-$  von einem Substrat durch eine Atmungskette transportiert werden und ein „O“ ( $= \frac{1}{2} \text{O}_2$ ) zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduzieren. Unter der Annahme, dass für die Synthese eines Moleküls ATP aus ADP und anorganischem Phosphat durch die  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase die Translokation von drei bis vier Protonen von außen durch den  $\text{F}_0$ -Teil der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase ins Cytoplasma nötig sind, würde der Transfer von zwei Elektronen von NADH auf Sauerstoff über den *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Weg in einer Netto-Translokation von sechs Protonen resultieren und die Bildung von 1,5-2,0 ATP-Molekülen ermöglichen. Der Elektronentransfer über den Cytochrom-*bd*-Weg anstelle des *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Weges hingegen würde in einer Netto-

Translokation von zwei Protonen resultieren und die Bildung von nur 0,5-0,7 Molekülen ATP ermöglichen. Diese Werte vorausgesetzt und eine Stöchiometrie von  $3 \text{ H}^+/\text{ATP}$  für die ATP-Synthese durch die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase angenommen, führt die komplette aerobe Oxidation von Glucose über die Glykolyse, den Citrat-Zyklus und den  $bc_1$ - $aa_3$ -Weg zur Bildung von 4 Molekülen ATP durch Substratkettenphosphorylierung und 22,7 ATP durch oxidative Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu führt der Cytochrom- $bd$ -Weg nur zur Bildung von 6,7 Molekülen ATP durch oxidative Phosphorylierung (Bott und Niebisch, 2003). Die für die oxidative Phosphorylierung notwendige  $F_1F_0$ -ATP-Synthase besteht in *C. glutamicum*, wie auch in anderen Bakterien, aus den 8 Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\varepsilon$ , die durch die *atpBEFHAGDC*-Gene kodiert werden (Sekine *et al.* 2001). Die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  bilden den membranintegralen  $F_0$ -Teil und die Untereinheiten  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  und  $\varepsilon$  den löslichen  $F_1$ -Teil (vgl. Abbildung 2.3), für die in *E. coli* ein Molekulargewicht von etwa 160 bzw. 370 kDa und eine Stöchiometrie von  $\alpha\beta_2c_9-12\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$  nachgewiesen wurde (Nicholls und Ferguson 2002). Dem unmittelbar vor den *atpBEFHAGDC*-Genen liegenden *atpI*-Gen, dessen Produkt in *E. coli* mit der Cytoplasmamembran assoziiert ist, konnte bisher keine genaue Funktion zugeordnet werden. Das *atpI*-Gen bildet in *E. coli* zusammen mit den  $F_1F_0$ -ATP-Synthase Strukturgenen *atpBEFHAGDC* ein Operon (Lagoni *et al.* 1993), das *AtpI*-Protein hat aber offensichtlich keinen Einfluss auf die Expression oder die Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase (Hicks *et al.* 2003). Neueste Untersuchungen in unserem Institut mittels transkriptioneller GFP-Fusionen zeigten, dass in *C. glutamicum* die Hauptpromotorregion des ATP-Synthase-Operons vor dem *atpB*-Gen lokalisiert ist und dass die Transkription der *atpBEFHAGDC*-Gene unabhängig von der Transkription des *atpI*-Gens erfolgt.



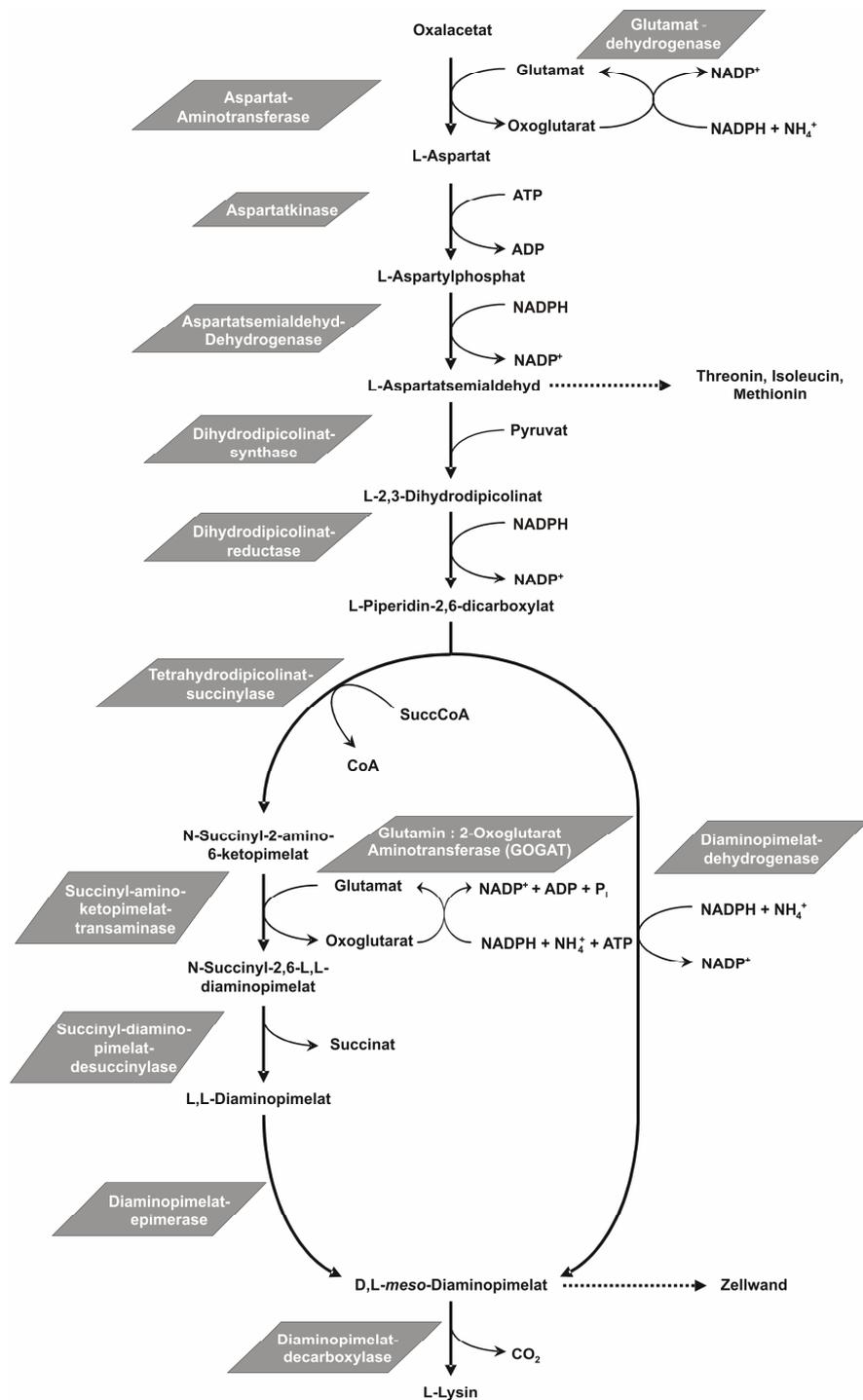
**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung der bakteriellen  $F_1F_0$ -ATP-Synthase.

Darüber hinaus konnte durch Primer-Extension-Analyse der Transkriptionsstartpunkt des *atpB*-Gens bestimmt werden (Degraf 2005). Diese Ergebnisse wurden durch unabhängige Untersuchungen bestätigt, in denen auch der Transkriptionsstartpunkt des *atpI*-Gens identifiziert werden konnte (Barriuso-Iglesias *et al.* 2006). Für *Bacillus pseudofirmus* konnte gezeigt werden, dass *atpI* zusammen mit einem weiteren *atp*-Gen (*atpZ*), das direkt stromaufwärts von *atpI* lokalisiert ist und mit diesem überlappt, ein gemeinsames Operon mit den F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase Strukturgenen *atpBEFHAGDC* bildet. Sowohl das *atpI*- als auch das *atpZ*-Genprodukt sind als Transportproteine an der Magnesiumaufnahme in *B. pseudofirmus* beteiligt, obwohl sie keinerlei Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Magnesiumtransportern aufweisen (Hicks *et al.* 2003).

## 2 NADPH-Abhängigkeit der Lysinbiosynthese in *C. glutamicum*

Die verzweigte Lysinbiosynthese erfolgt in *C. glutamicum* bei Ammonium-Überschuss über die energetisch weniger „kostspielige“ Diaminopimelatdehydrogenase während bei niedriger Ammoniumkonzentration der energetisch „kostspieligere“ Tetrahydrodipicolinatsuccinylase-Weg verwendet wird (Eggeling und Sahm 1999). Unabhängig davon, welcher Biosyntheseweg benutzt wird, werden vier Mol NADPH für die Biosynthese von einem Mol L-Lysin mit Oxalacetat als Vorstufe benötigt (vgl. Abbildung 2.4). Untersuchungen zeigten, dass die Lysinproduktion von *C. glutamicum* mit einer Zunahme der NADPH-Bildung verbunden ist (Marx *et al.* 1996, 1997). NADPH kann in *C. glutamicum* durch die Enzyme des oxidativen Pentosephosphat-Wegs (PPP), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase, sowie durch die Isocitrat-Dehydrogenase und das Malat-Enzym (Malic enzyme) gebildet werden. Kohlenstofffluss-Analysen deuten darauf hin, dass die NADPH-Bildung durch den oxidativen PPP-Weg bei hohen L-Lysin-Produktausbeuten entscheidend ist (Marx *et al.* 1996, Pfefferle *et al.* 2003), wohingegen die Bildung von NADPH durch die Isocitrat-Dehydrogenase und das Malat-Enzym offenbar nur von untergeordneter Bedeutung sind (Marx *et al.* 2003). Der Pentosephosphat-Weg besitzt also eine große Bedeutung für die Lysinbiosynthese (Marx *et al.* 1997). Bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Fructose als einziger Kohlenstoffquelle bzw. auf einem Fructose/Glucose-Gemisch wurde durch Kohlenstoffflussanalysen ein geringer Fluss durch den Pentosephosphat-Weg nachgewiesen (Dominguez *et al.* 1998; Kiefer *et al.* 2004; Pons *et al.* 1996). Für das Wachstum und die Lysinproduktion auf Fructose bzw. einem Fructose/Glucose-Gemisch wurde vorgeschlagen, dass die Malat-Enzym-Aktivität erhöht sein muss, um die NADPH-Bedürfnisse zu erfüllen (Dominguez *et al.* 1998). Fructose wird durch ein PEP-abhängiges Phosphotransferase-System in die Zelle transportiert und dabei

zu Fructose-1-Phosphat phosphoryliert, das nach Phosphorylierung zu Fructose-1,6-bisphosphat in die Glykolyse eintritt (Kotrba *et al.* 2001; Parche *et al.* 2001).

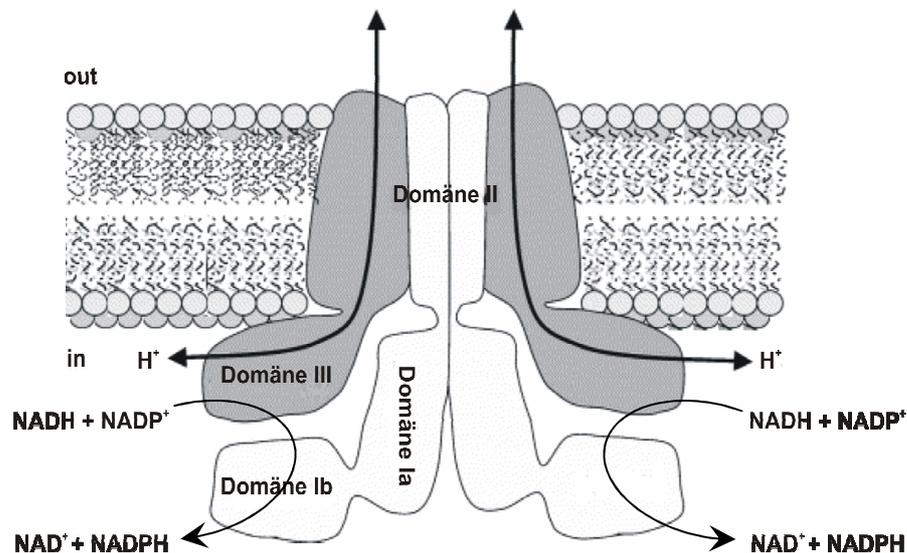


**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung der Lysinbiosynthesewege in *C. glutamicum*.

Daher wurde alternativ die Überexpression des Fructose-1,6-bisphosphatase-Gens *fbp* (Rittmann *et al.* 2003) vorgeschlagen, wodurch sowohl der Fluss durch den Pentosephosphat-Weg als auch die Lysin-Produktion auf Fructose erhöht werden sollte (Kiefer *et al.* 2004; Pons *et al.* 1996). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die

Überexpression von *fbp* nur bei Wachstum auf Saccharose einen positiven Einfluss auf die Lysinbildung hat, bei Wachstum auf Fructose dagegen nicht (Georgi *et al.* 2005).

Alternativ zur Änderung des Kohlenstoffflusses in Richtung PPP oder der Erhöhung von Enzymaktivitäten könnte die Verwendung einer Transhydrogenase in *C. glutamicum* zu einer Erhöhung der NADPH-Syntheserate führen. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *C. glutamicum* weder Gene für eine lösliche noch für eine membrangebundene Transhydrogenase. Somit ist eine direkte Reduktion von NADP<sup>+</sup> durch NADH über eine protonenabhängige Transhydrogenase (Kinoshita und Tanaka 1972) in *C. glutamicum* nicht möglich. Membrangebundene Transhydrogenasen katalysieren, gekoppelt an die protonenmotorische Kraft, den reversiblen Transfer eines Hydridionen-Äquivalents zwischen NAD(H) und NADP(H), wie in Abbildung 2.5 dargestellt.



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung der Transhydrogenase PntAB aus *E. coli* (nach Bizouarn *et al.* 2002). „In“ und „out“ kennzeichnen das Cytoplasma bzw. den extracytoplasmatischen Raum.

Das Verhältnis zwischen transferierten Hydridionen und Protonentranslokation beträgt 1 (Oswald *et al.* 2004). Studien zum Transhydrogenasereaktionsmechanismus zeigten, dass die Redoxreaktion zwischen den beiden Nucleotiden NAD(H) und NADP(H) direkt erfolgt, wobei die Nicotinamid- und Dihyronicotinamid-Gruppen in eine Position gebracht werden, die einen Transfer des Hydridionenäquivalents zwischen den C-4 Positionen der Ringe erlaubt (Singh *et al.* 2003). Das Enzym besteht aus den zwei membrandurchspannenden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die in einer heterotetrameren  $\alpha_2\beta_2$ -Form angeordnet sind. Es können drei funktionell und strukturell getrennte Domänen identifiziert werden, die hydrophile NAD(H) Bindedomäne I, die NADP(H)-Bindedomäne III und die hydrophobe

Membrandomäne II, die den Protonenkanal enthält (Abb. 2.5). Untersuchungen zum katalytischen Mechanismus, einem Mechanismus des Bindungswechsels (binding change), zeigten, dass der Energie-gekoppelte Prozess mehr mit dem der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase als mit denen der Atmungskettenkomplexe gemeinsam hat (Jackson 2003). Zusätzlich zu protonenabhängigen und membrangebundenen AB-spezifischen Transhydrogenasen sind auch protonenunabhängige lösliche BB-spezifische Transhydrogenasen bekannt (Boonstra *et al.* 1999), die die Umkehrreaktion der in Abbildung 2.5 gezeigten Reaktion katalysieren. Mikroorganismen besitzen in der Regel eine der beiden Typen von Transhydrogenasen, oder aber auch keine, wie z.B. *C. glutamicum*. *Enterobacteriaceae* bilden die einzige bekannte Ausnahme, die sowohl eine lösliche als auch eine membrangebundene Transhydrogenase besitzen (Sauer *et al.* 2004). In *E. coli* haben die  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten der membrangebundenen Transhydrogenase, die durch die Gene *pntA* und *pntB* kodiert werden, eine molekulare Masse von 50 bzw. 47 kDa (Clarke und Bragg 1985).

### 3 Das Thema der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu drei verschiedenen Fragestellungen durchgeführt. Im ersten Teil wurde die Rolle der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase für das Wachstum und die Lysinproduktion von *C. glutamicum* analysiert, und zwar mit Hilfe von Stämmen, in denen die Cytochrom-*bd*-Oxidase-Gene entweder deletiert oder plasmidkodiert überexprimiert wurden. Die Deletion der Cytochrom-*bd*-Oxidase sollte dazu führen, dass der Elektronentransfer zu Sauerstoff vollständig über den Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplex verläuft und der P/O-Quotienten daher vergrößert wird. Dies könnte einen positiven Einfluss auf das Wachstum und die Lysinproduktion haben.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der P/O-Quotient minimiert werden, und zwar durch das Ausschalten der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase. Dazu sollten einerseits die *atpBEF*-Gene, die den membrangebundenen  $F_0$ -Teil kodieren, und andererseits das vollständige *atpBEFHAGDC*-Operon im *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm und im Lysinproduzenten DM1730 deletiert werden. Im Anschluss sollten die Deletionsmutanten hinsichtlich Wachstum und Aminosäure-Bildung analysiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollte versucht werden, die NADPH-Synthese in dem Lysinproduzenten *C. glutamicum* DM1730 zu erhöhen, und zwar durch Expression der *pntAB*-Gene für die membrangebundene Transhydrogenase von *E. coli*. Anschließend sollte der Einfluss auf Wachstum und Lysin-Bildung untersucht werden.

### III Material und Methoden

#### 1 Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen)

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt.

Biotin:	100 mg/l (sterilfiltriert), 0,4 mM
Calciumchlorid:	10 g/l (sterilfiltriert), 68 mM
Glucose:	50 % (w/v) (autoklaviert), 2,8 M (550 g/l Glucose · H <sub>2</sub> O)
Kanamycin:	50 mg/ml (sterilfiltriert)
2 x PBS-Puffer:	274 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
SDS:	10 % (w/v)
20 x SSC:	88,23 g/l Na <sub>3</sub> -Citrat · 2H <sub>2</sub> O, 175,32 g/l NaCl, pH 7,0
50 x TAE-Puffer:	37,2 g/l Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O, 242 g/l Tris, mit Eisessig pH 8,5 einstellen
10 x TBE-Puffer:	55 g/l Borsäure, 7,44 g/l Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O, 108 g/l Tris
TE-Puffer:	1,21 g/l Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O, 0,38 g/l Tris, pH 8,0
TES-Puffer	1,88 g/l Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O, 2,92 g/l NaCl, 6 g/l Tris, pH 8,0

#### 2 Nährmedien

SOC-Medium:	20 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 0,6 g/l NaCl (Merck), 0,2 g/l KCl (Merck), nach dem Autoklavieren 1 g/l MgCl <sub>2</sub> (Merck) (sterilfiltriert) und 4 g/l Glucose (Merck) (separat autoklaviert) zugeben
LB-Medium:	10 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 10 g/l NaCl (Merck)
BHI-Medium:	37 g/l BHI (Difco)
BHIS-Medium:	37 g/l BHI (Difco) und 182 g/l Sorbitol (Merck) (separat autoklaviert)
LBHIS-Medium:	10 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 10 g/l NaCl (Merck), 37 g/l BHI (Difco) und 91 g/l Sorbitol (Merck) (separat autoklaviert)

- CGIII-Medium: 2,5 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Pepton (Difco), 10 g/l Hefeextrakt (Difco), pH 7,4, nach dem Autoklavieren 20 g/l Glucose (Merck) (separat autoklaviert) zugeben
- CGXII-Medium: 20 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck), 5 g/l Harnstoff (Merck), 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), 1 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck), 0,25 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 10 mg/l  $\text{CaCl}_2$  (Merck), 42 g/l MOPS (Roth), 0,2 mg/l Biotin (Merck), 1 ml/l Spurensalzlösung, pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l in verd. NaOH gelöst, sterilfiltriert) und 40 g/l Glucose (Merck) zugeben
- CGX-Medium: 40 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck), 0,5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), 0,5 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck), 0,25 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 0,3 g/l Leucin (Sigma), 0,2 mg/l Biotin (Merck), 1 ml/l Spurensalzlösung, nach dem Autoklavieren 100 g/l Glucose (Merck) und 20 g/l  $\text{CaCO}_3$  (Merck) zugeben
- Spurensalzlösung: 10 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 10 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck), 1 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 0,2 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 20 mg/l  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck), zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1)

Für entsprechende Nährböden wurde den Medien 15 g/l Agar-Agar (Difco) zugesetzt. Wenn erforderlich wurde den Nährmedien Kanamycin zu einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (*E. coli*) oder 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (*C. glutamicum*) zugesetzt.

### 3 Oligonukleotide

**Tabelle 3.1:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Komplementäre Sequenzen der „Crossover“-PCR-Oligonukleotide sind fett dargestellt. Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies oder MWG Biotech bezogen. IRD-800 markierte Oligonukleotide wurden ausschließlich von MWG Biotech bezogen.

Name	Sequenz	Restriktionsendonuklease
<b>PCR-Primer</b>		
<i>cydAB</i> -for	5'-GACT <u>GAGCTCA</u> ATGGAAGAGGAAGTGTACCTAGC-3'	SacI
<i>cydAB</i> -rev	5'-GACT <u>GAATTCC</u> CAACTTTAAGCAGACACTGGC-3'	EcoRI
<i>cydABDC</i> -rev	5'-GACT <u>GAATTCC</u> GCAAAATTACCTCACATGCCTC-3'	EcoRI
$\Delta$ <i>cydAB1</i> -for	5'-GAC <u>GAATTC</u> AAGCCCATCGCTGCGAATGCTG-3'	EcoRI
$\Delta$ <i>cydAB4</i> -rev	5'-GTCCT <u>GCAGC</u> CAACCCACCACCGCGAG-3'	PstI
$\Delta$ <i>cydAB</i> -for	5'-TATCACAAGGCTGATGATGTATCC-3'	
$\Delta$ <i>cydAB</i> -rev	5'-GGTCGCTGAGGCGTTGTTCCGG-3'	
$\Delta$ F <sub>0</sub> -1-for	5'-TGACA <u>AAGCTT</u> GAAACAGGGGAGTGGGG-3'	HindIII
$\Delta$ F <sub>0</sub> -2-rev	5'- <b>CCCATCCACTAACTTAACA</b> ACAGGGGACGTGCTCCGCAA-3'	
$\Delta$ F <sub>0</sub> -3-for	5'- <b>TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</b> GTGGCACCGAACGAAAGTAG-3'	
$\Delta$ F <sub>0</sub> -4-rev	5'-TCGACT <u>CTAG</u> AGACCAATAGCCTGCAGTGCGA-3'	XbaI
$\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -3-for	5'- <b>TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</b> CGCAGCAGCGAAGGTCTCTAA-3'	
$\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -4-rev	5'-TCGACT <u>CTAG</u> ACATAAAAACCGCCTCATC-3'	XbaI
$\Delta$ F <sub>0</sub> -for	5'- GACCTTCTACGACAACACCGCC -3'	
$\Delta$ F <sub>0</sub> -rev	5'- GGAGTGGATGCTCATCGCACG -3'	
$\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -rev	5'-CTGGTGCTGCTTCCAACCAGGC-3'	
M13-for	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'	
M13-rev	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	
pEKEx2-for	5'-GATATGACCATGATTACGCCAAGC-3'	
pEKEx2-rev	5'-CGGCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC-3'	
<i>pntAB</i> -for	5'-CAGCT <u>GCAGT</u> CATCAATAAACCG-3'	PstI
<i>pntAB</i> -rev	5'-CGT <u>GAGCTC</u> TTACAGAGCTTTCAG-3'	SacI
<b>Sequenzier-Primer</b> (IRD-800 markiert)		
M13-for	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'	
M13-rev	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	

## 4 Plasmide

**Tabelle 3.2:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
pCR2.1-TOPO	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ; Klonierungsvektor für PCR-Produkte mit 3'-Adenosin-überhängen	Invitrogen
pCR2.1-TOPO- <i>cydAB</i>	pCR2.1-TOPO-Derivat, enthält ein 2578-bp-PCR-Fragment mit den <i>cydAB</i> -Genen aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pCR2.1-TOPO- <i>cydABDC</i>	pCR2.1-TOPO-Derivat, enthält ein 5683-bp-PCR-Fragment mit den <i>cydABDC</i> -Genen aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pCR2.1-TOPO- <i>pntAB</i>	pCR2.1 TOPO-Derivat, enthält ein 2968-bp-PCR-Fragment mit den <i>pntAB</i> -Genen aus <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pEKEx2	Kan <sup>R</sup> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor für die regulierte Genexpression (P <sub>tac</sub> , lac <sup>P</sup> , pBL1 ori <sub>V<sub>C.g.</sub></sub> , pUC18 ori <sub>V<sub>E.c.</sub></sub> ), MCS im Vergleich zum pEKEx1 invertiert	Eikmanns <i>et al.</i> (1991)
pEKEx2- <i>cydAB</i>	Kan <sup>R</sup> ; pEKEx2-Derivat, enthält ein 2578-bp-SacI-EcoRI-Fragment aus pCR2.1-TOPO- <i>cydAB</i> mit den <i>C. glutamicum cydAB</i> -Genen einschließlich der <i>cydA</i> -RBS	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>cydABDC</i>	Kan <sup>R</sup> ; pEKEx2-Derivat, enthält ein 5683 bp-SacI-EcoRI-Fragment aus pCR2.1-TOPO- <i>cydABDC</i> mit den <i>C. glutamicum cydABDC</i> -Genen einschließlich der <i>cydA</i> -RBS	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>pntAB</i>	Kan <sup>R</sup> ; pEKEx2-Derivat, enthält ein 2968-bp-PstI-SacI-Fragment aus pCR2.1-TOPO- <i>pntAB</i> mit den <i>pntAB</i> -Genen aus <i>E. coli</i> einschließlich der <i>pntA</i> -RBS	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan <sup>R</sup> ; mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK19 <i>mobsacB</i> -Δ <i>cydAB</i>	Kan <sup>R</sup> ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1100-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>cydAB</i> flankierenden Bereiche umfasst und mittels der PstI- und EcoRI-Schnittstellen kloniert wurde	Niebisch (2003)
pK19 <i>mobsacB</i> -ΔF <sub>o</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1057-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>atpBEF</i> -flankierenden Bereiche umfasst und mittels der HindIII- und XbaI- Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> -ΔF <sub>1</sub> F <sub>o</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1046-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>atpBEFHAGDC</i> -flankierenden Bereiche umfasst und mittels der HindIII- und XbaI- Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit

## 5 Bakterienstämme

**Tabelle 3.3:** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
<b><i>C. glutamicum</i></b>		
ATCC 13032	Wildtyp-Stamm, Biotin-auxotroph	Abe <i>et al.</i> (1967)
ATCC 13032 $\Delta$ <i>cydAB</i>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion der <i>cydAB</i> gene	Niebisch (2003)
ATCC 13032 $\Delta$ F <sub>o</sub>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion der <i>atpBEF</i> -Gene (kodieren für die Fo-Untereinheiten a, b und c der F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATP-Synthase)	Diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>o</sub>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion des <i>atpBEFHAGDC</i> -Operons (kodiert für die acht Untereinheiten der F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATP-Synthase)	Diese Arbeit
DM1730	<i>pyc</i> <sup>P458S</sup> , <i>hom</i> <sup>V59A</sup> , <i>lysC</i> <sup>T311I</sup> , <i>zwf</i> <sup>A243T</sup> , Derivat von ATCC 13032	B. Bathe, Degussa
DM1730 $\Delta$ <i>cydAB</i>	Derivat von DM1730, „in-frame“-Deletion der <i>cydAB</i> -Gene	Diese Arbeit
DM1730 $\Delta$ F <sub>o</sub>	Derivat von DM1730, „in-frame“-Deletion der <i>atpBEF</i> -Gene	Diese Arbeit
DM1730 $\Delta$ F <sub>1</sub> F <sub>o</sub>	Derivat von DM1730, „in-frame“-Deletion des <i>atpBEFHAGDC</i> -Operons	Diese Arbeit
DM1800	<i>pyc</i> <sup>P458S</sup> , <i>lysC</i> <sup>T311I</sup> , Derivat von ATCC 13032	B. Bathe, Degussa
MH20-22B	Derivat von ATCC 13032, feedback-resistente Aspartat Kinase, Isopropyl-Malate-Dehydratase negativ	Schrumpf <i>et al.</i> (1992)
MH20-22B $\Delta$ <i>cydAB</i>	Derivat von MH20-22B, „in-frame“-Deletion der <i>cydAB</i> -Gene	Diese Arbeit
<b><i>E. coli</i></b>		
MG1655	Wildtyp-Stamm	Blattner <i>et al.</i> (1997)
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>thi-1 endA1 hsdR17 (r, m) supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80<i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15) recA1 gyrA96 relA1</i> ; Stamm für Klonierungen	Bethesda Research Laboratories
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80<i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 deoR recA1 araD139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen

## 6 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Die Kultivierung zur Stammhaltung erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml BHI-Medium, die bei 30 °C (*C. glutamicum*) für 12-15 h mit 170 Upm geschüttelt wurden. Anschliessend wurden die Zellen geerntet, in 1 ml BHI-Medium resuspendiert, mit 1 ml sterilem Glycerin gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde bei -20 °C, das andere bei -75 °C gelagert.

## 7 Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*

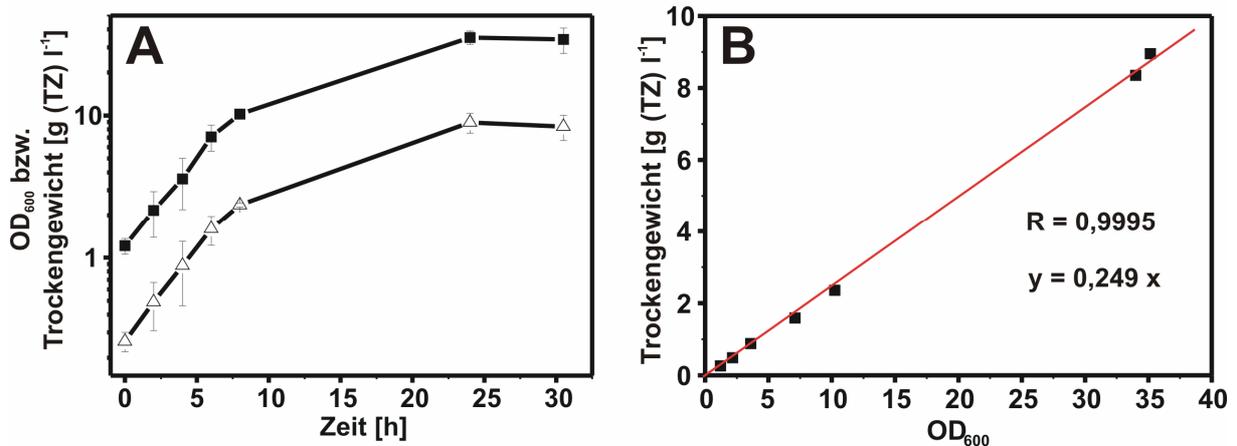
*C. glutamicum* wurde standardmäßig in 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose (222 mM) als Kohlenstoffquelle bei 30 °C mit 150 Upm in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen kultiviert. Zum Animpfen der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als 4 Tage waren. Die Vorkultivierung erfolgte zunächst für 8-10 h in 5 ml BHI-Medium (z. T. mit 2 % Glucose) und anschließend für 12-14 h in 50 ml CGXII-Minimalmedium, bevor die 50-ml-Hauptkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inokuliert wurde. Der Lysinproduktionsstamm MH20-22B wurde zunächst in 50 ml CGIII-Medium für 12 - 14 h bei 30 °C und 130 Upm vorkultiviert und anschließend wurde die Hauptkultur in CGX-Minimalmedium mit 10 % (w/v) Glucose auf eine OD<sub>600</sub> von 2 angeimpft.

## 8 Bestimmung der Zelltrockenmasse

Die Bestimmung der Zelltrockenmasse erfolgte in Anlehnung an die DIN 38 409 H1 (Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtrattrockenrückstandes und des Glührückstandes). Zur Ermittlung der Zelltrockenmasse wurden 10 ml einer *C. glutamicum* ATCC 13032-Kultur bei RT 10 min bei 5525 x g zentrifugiert, die sedimentierten Zellen mit 5 ml bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, die Suspension erneut 10 min bei RT und 5525 x g zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 5 ml bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden in Porzellantiegeln bei 105 °C für 24 h getrocknet. Die Porzellantiegel wurden vorher mit Ethanol gereinigt und gewogen. Nach 24 h Trocknung wurden die Tiegel zunächst für 3 h bei RT gelagert und anschliessend wieder gewogen. Zur Ermittlung der Gewichtskonstanz wurden die Tiegel nach weiteren 3 h nochmals gewogen und aus der Differenz der Tiegel nach und vor Trocknung die Zelltrockenmasse berechnet. Um die Korrelation zwischen Zelltrockenmasse und optischer Dichte zu bestimmen, wurde parallel zur Entnahme von Kulturaliquots für die Trockengewichtsbestimmung auch die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Ultrospec 500 *pro* Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences). Die Proben wurden ggf. so verdünnt, dass die gemessenen Extinktionswerte innerhalb eines Bereichs von 0,1-0,4 lagen, da eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der scheinbar optischen Dichte bis zu einem Extinktionswert von 0,4 gegeben ist.

Ein linearer Zusammenhang zwischen Trockengewicht und optischer Dichte bei 600 nm konnte für den *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm (Abb. 3.1 A) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 35 festgestellt werden (Abb. 3.1 B). Aus dem ermittelten linearen Bereich ergibt sich die

folgende Beziehung zwischen optischer Dichte und Trockengewicht:  $OD_{600} = 1$  entspricht  $0,25 \text{ g (TZ) l}^{-1}$ .



**Abbildung 3.1:** (A) Vergleich der experimentell bestimmten Werte für Trockengewicht und  $OD_{600}$  einer Kultur von *C. glutamicum* 13032 in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose. (B) Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen optischer Dichte und Trockengewicht.

## 9 Molekularbiologische Methoden

### 9.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim und Doly 1979).

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *C. glutamicum* erfolgte ebenfalls mit dem QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen). Aufgrund des im Vergleich zu *E. coli* dickeren Mureinsacculus wurden die *C. glutamicum*-Zellen zunächst 1-2 h mit 15 mg/ml Lysozym im Puffer P1 (Qiagen) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert (Schwarzer und Pühler 1991).

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* wurden die Zellen von 1,5 ml einer Übernachtskultur durch 5 min Zentrifugation bei 16100 x *g* und RT vollständig sedimentiert, in 1 ml TES-Puffer (pH 8,0) gewaschen, erneut sedimentiert und in 800 µl TES-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl 10 % (w/v) SDS wurde der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Phenol (pH 7,5-8,0, Roth) zugegeben, kräftig geschüttelt, 10 min mit 16100 x *g* bei RT zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phenol-Extraktion wurde insgesamt 5 x durchgeführt. Im Anschluss wurden 700 µl der wässrigen Phase mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt, 20 min bei -20 °C gelagert, 15 min mit 16100 x *g* bei RT zentrifugiert, die gefällte DNA mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min mit 16100 x *g* bei RT)

und die DNA abschließend für 10 min bei 60 °C getrocknet. Zum Lösen der DNA wurden 100 µl EB-Puffer (Qiagen, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) zugefügt und der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Ausbeute betrug 0,1 mg chromosomale DNA.

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurden Zellen einer 5-ml-Übernachtskultur vollständig sedimentiert, in 400 µl Lysispuffer (2,42 g/l Tris, 0,74 g/l Na<sub>2</sub>EDTA, 1,2 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0) mit 20 mg/ml Lysozym (frisch zugesetzt) resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 80 µl 10 % (w/v) SDS und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer) zugegeben, kurz gevortext und 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; pH 7,5 - 8,0) und vortexen wurden die Phasen durch 3 min Zentrifugation bei 14000 Upm (Sigma Zentrifuge 2K15) getrennt, die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml eiskaltem abs. Ethanol versetzt, gevortext und 10 min mit 15300 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Sigma Zentrifuge 2K15). Das präzipitierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, das Ethanol vollständig abgenommen, die DNA luftgetrocknet und in 250 µl EB-Puffer (Qiagen, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst. Die Ausbeute nach dieser Methode beträgt ca. 0,5 mg DNA.

## 9.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Der DNA-Gehalt von Lösungen wurde photometrisch (Specord S 100 B, Analytik Jena) bei 260 nm bestimmt. Ein Wert von  $A_{(260\text{ nm})} = 1$  entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde der DNA-Reinheitsgrad durch Messung der Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Bei einem Quotienten von  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  gilt DNA als rein.

## 9.3 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 1 x TAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung zwischen 80 und 120 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch mindestens 10 minütige Inkubation des Gels in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) und anschließendem Waschen in bidest. H<sub>2</sub>O. 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-Längenstandard XIV<sup>1</sup> von Roche Diagnostics oder ein Gemisch aus HindIII- und HindIII/EcoRI-verdauter  $\lambda$ -DNA<sup>2</sup> verwendet.

#### 9.4 Rekombinante DNA-Techniken

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder Roche Diagnostics bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte standardmäßig in 20  $\mu$ l-Ansätzen unter Verwendung eines geeigneten „SuRE/Cut Buffers for Restriction Enzymes“ (Boehringer Mannheim) und 5 U Enzym. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden mindestens 2 h, chromosomale DNA über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für Ligationen wurde in der Regel der „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics) verwendet, insbesondere wenn es sich um Ligationen von „stumpfen“ Enden handelte. Die Ansätze wurden dabei 30 min bei RT inkubiert. Alternativ wurde der „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der im „TOPO TA Cloning Kit“ enthaltene linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO besitzt singuläre 3'-Thymidinüberhänge, deren 3'-Phosphatgruppe kovalent über einen Tyrosylrest mit dem Enzym Topoisomerase I verknüpft ist. PCR-Produkte mit singulären 3'-Adenosinüberhängen, die durch die Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase erzeugt werden, können effektiv mit dem Vektor ligieren. Durch Angriff der 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produktes auf die Phospho-Tyrosyl-Bindung kommt es unter Freisetzung der Topoisomerase I zur Verknüpfung des PCR-Produktes mit dem Vektor (Shuman 1994). Zur Erzeugung singulärer 3'-Adenosinüberhänge an den PCR-Produkten wurden die gereinigten PCR-Fragmente in 20  $\mu$ l-Ansätzen mit *Taq*-Polymerase, dNTP's und geeignetem Puffer 20 min bei 72 °C inkubiert. Dieser Schritt war nötig, da das zur Erzeugung der PCR-Fragmente verwendete Gemisch aus *Taq*- und *Tgo*-DNA-Polymerase keine 3'-Adenosinüberhänge erzeugt. Zur Ligation wurden 4  $\mu$ l des modifizierten PCR-Produktes mit jeweils 1  $\mu$ l Salzlösung (1,2 M NaCl und 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) und pCR2.1-TOPO-Vektor gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Für die Transformation der „One Shot<sup>®</sup> Chemically Competent TOP10“ *E. coli*-Zellen wurden 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes verwendet.

---

<sup>1</sup> mit folgenden Fragmentgrößen: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp, 1300 bp, 1400 bp, 1500 bp und 2642 bp

<sup>2</sup> Der  $\lambda$ -DNA Längenstandard ist ein 1:1 Gemisch der Molecular Weight Marker II und III (beide Roche Diagnostics) mit folgenden Fragmentgrößen: 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1375 bp, 1584 bp, 1904 bp, 2027 bp, 2322 bp, 3530 bp, 4268 bp, 4361 bp, 4973 bp, 5148 bp, 6557 bp, 9416 bp, 21226 bp und 23130 bp

## 9.5 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine  $\text{RbCl}_2$ -Behandlung erhielten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (1983, 1985). Einige 2 - 3 mm große Kolonien wurden von einer frischen LB- oder SOC-Platte in 1 ml SOC resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von  $\sim 0,5$  bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Falcontubes 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 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1/12,5 Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in 50- bzw. 100  $\mu\text{l}$ -Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

### **RF1-Lösung**

$\text{RbCl}_2$	100	mM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50	mM
K-Acetat	30	mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	mM
Glycerin	15	%

mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8

### **RF2-Lösung**

Morpholinopropansulfonsäure	10	mM
$\text{RbCl}_2$	10	mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75	mM
Glycerin	15	%

mit 6 M NaOH auf pH 6,8

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zellen auf Eis mit bis zu 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz für 45 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 440  $\mu\text{l}$  SOC-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Plasmids wurden 20  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  des Ansatzes sowie der auf ca. 100  $\mu\text{l}$  ankonzentrierte Rest auf LB-Platten mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin ausplattiert. Ggf. wurde den Nährböden 40  $\mu\text{l}$  X-Gal (20 mg/ml X-Gal in DMF) pro Platte zugesetzt.

## 9.6 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von superkompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest (1999) (van der Rest *et al.*, 1999). Aus einer Übernachtskultivierung in LB-Medium mit 2 % (w/v) Glucose wurde die Hauptkultur in 200 ml EPO-Medium (2 g Trypton, 2 g NaCl, 1 g Hefeextrakt, in 160 ml H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren, 800 mg Isonicotinsäure-Hydrazid, 5 g Glycin und 0,2 ml Tween 80 in 40 ml H<sub>2</sub>O lösen, steriltfiltrieren und zum Medium geben) auf OD<sub>600</sub> = 0,3 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 18 °C für 28 h. Die Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert, die Zellen anschließend dreimal mit eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen und dann in 2 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert. 200 µl Aliquots wurden bei -75 °C gelagert.

Für die Transformation mit replizierbaren Plasmiden wurden kompetente Zellen alternativ nach einem vereinfachten Verfahren präpariert. Dazu wurden die Zellen für 7 h bei 30 °C in 100 ml BHI-Medium kultiviert, durch Zentrifugation geerntet, viermal in 50 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen und in 1 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert. 100-µl-Aliquots dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -75 °C gelagert.

Die Transformation elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 100 µl elektrokompetente Zellen mit etwa 1 µg Plasmid in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem elektrischen Widerstand von 600 Ω und einer elektrischen Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 800 µl BHIS-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, für 6 min bei 46 °C und abschließend für 1 h bei 30 °C inkubiert. 20 µl und 100 µl des Ansatzes sowie der auf ca. 100 µl ankonzentrierte Rest wurden auf BHIS-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert.

## 9.7 Konstruktion von Deletionsmutanten

Deletionsmutanten wurden durch eine Kombination von „Crossover“-PCR (Link *et al.* 1997) mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.* 1994), der in *C. glutamicum* nicht repliziert, konstruiert. Hierbei wurden in einer ersten PCR zwei etwa 500 bp große Fragmente, die den 5'- und den 3'-flankierenden Bereich des/der zu deletierenden Gens/Gene enthalten, mit den Primern Δ...1-for und Δ...2-rev bzw. Δ...3-for und Δ...4-rev amplifiziert. Die Primer Δ...1-for und Δ...4-rev wurden für die Klonierung in das Plasmid pK19*mobsacB* mit 5'-terminalen Restriktionsschnittstellen ergänzt. Die Primer Δ...2-rev und Δ...3-for besitzen am 5'-Ende eine 21 bp lange komplementäre Sequenz. In einer weiteren Crossover-PCR mit den Primern

$\Delta$ ...1-for und  $\Delta$ ...4-rev sowie den beiden ~500 bp großen Fragmenten der ersten PCR als Matrize konnten die komplementären Sequenzen hybridisieren und verlängert werden. Die so erhaltenen Fusionsprodukte (~ 1 kb) wurden mit HindIII und XbaI ( $F_0$ - und  $F_1F_0$ -Deletion) verdaut, aufgereinigt und in den entsprechend geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Nach Sequenzierung des klonierten Crossover-PCR-Produkts (vgl. Kapitel Sequenzierung) wurden fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation (vgl. Kapitel Transformation) in *C. glutamicum* transferiert und auf LBHIS-Nährböden mit 25 µg/ml 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 entweder über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % (w/v) Glucose inkubiert oder zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % Glucose und 25 µg/ml Kanamycin und anschließend mind. 6 h in 5 ml CGXII-Medium ohne N- und P-Quelle. Anschliessend wurden jeweils 100 µl einer 1:10 und 1:100 Verdünnung der Kulturen auf LBHIS-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 lethal 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 erzeugt werden. Klone, die sowohl saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden zunächst durch Kolonie-PCR analysiert. Klone, die aufgrund der Kolonie-PCR-Analyse die gewünschte Deletion enthielten wurden daraufhin durch PCR mit isolierter chromosomaler DNA sowie den Primern  $\Delta F_0$ -for,  $\Delta F_0$ -rev und  $\Delta F_1F_0$ -rev analysiert oder durch Southern-Blot-Analyse überprüft..

## 9.8 Polymerasekettenreaktion

Die PCR (Mullis und Faloona 1987) wurde sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanten und Deletionsmutanten) als auch präparative Zwecke (in-vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) genutzt. Für präparative PCR-Ansätze wurde der Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics) verwendet, der neben der *Taq*-DNA Polymerase auch eine *Tgo*-DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität beinhaltet. Durch Kombination der beiden Polymerasen und die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der *Tgo*-DNA-Polymerase wird die

Genauigkeit der DNA-Synthese um den Faktor 3 erhöht. Für analytische PCR-Ansätze wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Reaktionen wurden in einem Primus Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden bei Verwendung des Expand High Fidelity Kit entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt gewählt: Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielten 0,1 - 0,75 µg Matrizen-DNA, 300 nM der beiden Primer, 2,6 U *Taq/Tgo*-DNA Polymerase sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C wurden 25 Zyklen mit folgenden Parametern durchlaufen: 95 °C für 30 s;  $T_{(\text{Annealing})}$  für 30 s; 72 °C für  $T_{(\text{Elong})}$ . Die Annealing-Temperatur  $T_{(\text{Annealing})}$  wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer gewählt. Die Schmelztemperatur  $T_m$  der DNA kann mit der Formel  $T_m [^\circ\text{C}] = [(G + C) \cdot 4] + [(A + T) \cdot 2]$  abgeschätzt werden. Als Elongationszeit  $T_{(\text{Elongation})}$  wurde 1 min pro 1,5 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Zur Kontrolle von *C. glutamicum*-Transformanten wurden einzelne Kolonien in je 100 µl H<sub>2</sub>O suspendiert, bei 95 °C für 10 min inkubiert und auf Eis abgekühlt. 5 µl dieser Suspension dienten als Matrize in 20 µl PCR-Ansätzen. Alternativ wurden einzelne Kolonien direkt in die PCR-Ansätze gegeben. Zur Analyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Reinigung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert und gereinigt oder alternativ mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, wenn die Gelelektrophorese keine Nebenprodukte erkennen ließ.

## 9.9 Southern-Blot-Analyse

Bei der Southern-Blot-Analyse (Southern 1975) der  $\Delta F_O$ -Mutanten wurde genomische DNA (~10 µg pro Spur), die mit *ScaI* über Nacht verdaut worden war, über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt und wie im Folgenden beschrieben mittels Vakuumblot auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Nylonmembran, Maske und Agarosegel wurden luftblasenfrei auf der Blotting-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech LKB VacuGene XL) positioniert. Das Gel wurde mit Depurinierungslösung (0,3 N HCl) vollständig beschichtet, und nach Anlegen des Vakuums (etwa 50 mbar; Pumpe: Bromma LKB 2016 Vacugene Vacuum Blotting Pump) wurde der Aufbau auf Dichtigkeit überprüft. Nach etwa 20 min (Farbumschlag nach Gelb) wurde das Gel für weitere 20 min mit Denaturierungslösung (1,5 N NaCl, 0,5 N NaOH) inkubiert (Farbumschlag nach Blau). Im Anschluss erfolgte nochmals 20 min Inkubation mit Neutralisationslösung (1,5 N NaCl, 1M Tris, pH 8,0) und daraufhin 1 h Inkubation mit Transferpuffer (20 x SSC). Abschließend wurden die auf die Nylonmembran transferierten

DNA-Fragmente durch 3 min Bestrahlung mit UV-Licht kovalent an der Membran fixiert. Die Markierung des Standards ( $\lambda$ -DNA-Längenstandard) und des als Sonde eingesetzten „Crossover“-PCR-Fragments mit Digoxigenin sowie Hybridisierung, Waschen und Detektion mit CDP-Star erfolgte mit dem DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers.

## 9.10 DNA-Sequenzierung

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde das „Thermostequequase fluorescent sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) und ein LiCor DNA sequencer 4200 (MWG Biotech) nach Angaben der Hersteller genutzt. Vergleiche der in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen mit DNA-Sequenzen aus Datenbanken wurden mit Hilfe des Programmes „Blast-Blast 2 Sequences“ ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://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).

## 10 Proteinchemische Methoden

### 10.1 Proteinpräparation

Für die Präparation von löslichen und membrangebundenen Proteinen für die 2D-Gelelektrophorese bzw. SDS-PAGE wurden die Zellen aus 50 ml einer *C. glutamicum*-Kultur bei einer  $OD_{600}$  von etwa 5 durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 x *g* geerntet. Die Zellen wurden mit einem Kulturvolumen TE-Puffer gewaschen, in 1 ml TE Puffer + 40  $\mu$ l Complete Proteaseinhibitor (25-fach konzentriert; Roche Diagnostics) resuspendiert und nach Zugabe von 100  $\mu$ l RNase A/DNase I-Lösung (1 mg/ml DNase I, 0,25 mg/ml RNase A in 50 mM  $MgCl_2$ ) mit etwa 1 g Glasperlen ( $\varnothing = 0,1$  mm, Roth) versetzt. Anschließend wurden die Zellen 3 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. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und für 1 h bei 180000 x *g* und 4 °C ultrazentrifugiert (Rotor 70 Ti; Beckmann Ultrazentrifuge L7-55). Proteinkonzentrationen vom Überstand wurden mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt (vgl. Kapitel Proteinkonzentrationsbestimmung). Proteinkonzentrationen der Membranfraktionen wurden

nach der Bradford-Methode oder der Micro-Biuret-Methode (vgl. Kapitel Proteinkonzentrationsbestimmung) bestimmt, da sich Lipide bei der Bestimmung nach der BCA-Methode als störend auswirken indem sie zu hohe Konzentrationswerte vortäuschen.

## 10.2 Präparation von Zellmembranen aus *C. glutamicum*

5 g Zellen (Feuchtmasse) wurden in 7 ml eines Puffers resuspendiert, der 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mg/ml Lysozym enthielt, und 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden eine Spatelspitze DNase I und 1 mM des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid zugegeben und die Zellen durch 5 Passagen bei 207 MPa durch eine French-Press-Zelle (SLM Aminco) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 27000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde für 1,5 bis 2 h bei 150000 x g ultrazentrifugiert. Das Membranpellet wurde einmal mit Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5) gewaschen, die Suspension erneut 1,5 h bei 150000 x g zentrifugiert, die Membranen in x ml Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5) mit 10 % Glycerin suspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

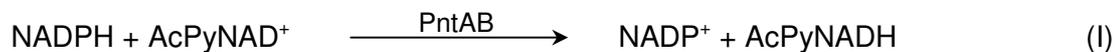
## 10.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Test (Smith *et al.* 1985), mit der Bradford-Methode (Bradford 1976) oder mit der Micro-Biuret Methode (Goa, 1953) bestimmt. In allen Fällen wurde Rinder-Serumalbumin als Standard verwendet. Bei der Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA-Tests wurden 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) versetzt, 30 min bei 56 °C inkubiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 500 pro Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences). Für die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode wurden 50 µl Probe mit 1,5 ml Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) versetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Micro-Biuret-Methode wurden zunächst 1 ml der Proteinlösung mit 100 µl 0,15 % DOC gemischt, 5 min bei RT inkubiert, Proteine durch Zugabe von 100 µl 70 % TCA präzipitiert und im Anschluss durch 5 min Zentrifugation bei 9000 x g und RT sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet in 1 ml 3 % (w/v) NaOH gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Micro-Biuret Reagenz und 10 s mixen wurden die Ansätze für 20 min bei RT inkubiert und abschließend die Extinktion bei 545 nm bestimmt. Zur Herstellung des Micro-Biuret Reagenz werden 173 g Na-Citrat · 2H<sub>2</sub>O und

100 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 600 ml bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst (Lösung 1). Daraufhin werden 17,3 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in 300 ml warmem bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, die Lösung unter Rühren zur Lösung 1 gegeben und zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt. Die dunkelblaue Lösung bleibt unter Lichtausschluss für mehrere Wochen stabil.

#### 10.4 Bestimmung der Transhydrogenaseaktivität

Die Bestimmung der Transhydrogenaseaktivität der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB erfolgte in einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 ml, der 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  NADPH, 1 mM 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid ( $\text{AcPyNAD}^+$ , Sigma) und 25 -100  $\mu\text{l}$  Membranproteinlösung (entspricht etwa 5 – 20  $\mu\text{g}$  Membranprotein) enthielt. Die Reduktion von  $\text{AcPyNAD}^+$  mit NADPH wurde anhand der Extinktionszunahme bei 375 nm mit einem Jasco V560 Spektrophotometer in einem auf 30 °C thermostatisierten Küvettenhalter in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke verfolgt. Der Aktivitätstest beruht auf der Reaktion gemäß Gleichung (I), die entgegengesetzt der *in vivo* katalysierten Reaktion der membrangebundenen Transhydrogenase verläuft, da die Kopplung an den Protonengradienten fehlt.



Die Berechnung der spezifischen Aktivität [ $\text{U} (\text{mg})^{-1}$ ] erfolgte mit Hilfe von Gleichung (II) mit den Parametern  $\Delta A$ , Extinktionsänderung;  $t$ , Zeit [min];  $V$ , Gesamtvolumen [ $\mu\text{l}$ ];  $v$ , Probenvolumen [ $\mu\text{l}$ ];  $d$ , Schichtdicke der Küvette [cm];  $\epsilon$ , molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$$\text{Aktivität} = \frac{\frac{\Delta A}{t} \cdot V}{v \cdot d \cdot \epsilon} \cdot 1000 \quad (\text{II})$$

mit  $\epsilon = 6,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Venning und Jackson, 1999) und anschließender Division durch die Proteinkonzentration.

## 10.5 Analyse von Cytochromen

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 Scangeschwindigkeit, 1 nm Bandbreite und „slow response“. Für Differenzspektren von Membranen wurde zunächst das reduziert-Spektrum nach Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit aufgenommen und anschließend das oxidiert-Spektrum nach Zugabe von festem Kaliumhexacyanoferrat(III). Die Aufnahme von reduziert-Spektren intakter Zellen erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 100 nach Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit.

## 10.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung löslicher und membrangebundener Proteine von *C. glutamicum* nach ihrer Masse wurde SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad) durchgeführt. Es wurden 12 %-ige Trenngele und 4 %-ige Sammelgele genutzt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 6 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, pH 6,8) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Protein Marker Broad Range (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke bei einer Anfangsspannung von 100 V und einer maximalen Spannung von 200 V. Zur Färbung von SDS-Gelen mit kolloidalem Coomassie Blue wurden die Gele dreimal für 15 min mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, mind. 1 h in ca. 20 ml GelCode®Blue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. H<sub>2</sub>O (mindestens 1 h) entfernt.

## 10.7 2-D-Gelelektrophorese

300  $\mu$ g Protein wurden durch Zugabe von 9 Vol. Aceton und Inkubation bei -20 °C (mindestens 2,5 h bzw. über Nacht) gefällt und durch 10 min Zentrifugation bei 18.000 x g und 4 °C sedimentiert. Die präzipitierten Proteine wurden luftgetrocknet, mit 350  $\mu$ l Solubilisierungspuffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) DTT, 1 % Pharmalyte 3-10 NL; alle Reagentien von Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und 1 h bei

Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Für die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung (IEF), wurde die Proteinlösung luftblasenfrei zwischen den Elektroden von Keramikscheffchen verteilt. Die für den entsprechenden pH-Bereich ausgewählten Fertiggele (18 cm Immobiline DryStrip, pH 4-7 oder pH 4,5-5,5, Amersham Pharmacia Biotech) wurden auf die Proteinlösung gelegt und mit ca. 1 ml „Immobiline DryStrip Cover Fluid“ überschichtet. Die Elektrophorese wurde über einen Zeitraum von 36 h mit folgenden Parametern durchgeführt: 5 h 30 V; 5 h 60 V; 1 h 200 V; 1 h 500 V; 1 h 2000 V; linearer Gradient innerhalb 30 min auf 8000 V; 22,5 h 8000 V (IPGphor, Amersham Pharmacia Biotech). Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gele entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Die zweite Dimension (SDS-PAGE) wurde in horizontalen Elektrophoresekammern (Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Zur Vorbereitung der zweiten Dimension wurde etwa 1 ml „Immobiline DryStrip Cover Fluid“ auf den auf 15 °C thermostatisierten Kühlplatten der Elektrophoreseapparatur gleichmäßig verteilt. Die Fertiggele (ExcelGel XL SDS 12-14, Amersham Pharmacia Biotech) wurden mit richtiger Polarität auf die Kühlplatte gelegt und vorhandene Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte entfernt. Nach Entfernen der Schutzfolie wurden die Anoden- und Kathodenpufferstreifen (ExcelGel SDS Buffer Strips, Amersham Pharmacia Biotech) luftblasenfrei an den äußersten Begrenzungen der Gele platziert. Die Gelstreifen der IEF wurden 20 min mit je 10 ml Äquilibriumslösung A (6,05 g/l Tris, 360 g/l Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 g/l DTT, 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v); DTT im Ultraschallbad lösen) inkubiert. Im Anschluss erfolgte 20 min Inkubation mit Äquilibriumslösung B (6,05 g/l Tris, 360 g/l Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 40 g/l Iodacetamid, 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v); Iodacetamid im Ultraschallbad lösen). Die Gelstreifen wurden kurz mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült, überschüssige Flüssigkeit abgetupft und mit der Gelseite nach unten etwa 2 mm vor die Kathodenpufferstreifen auf die Fertiggele gelegt. Luftblasen zwischen Fertiggel und Gelstreifen wurden entfernt, auf gleicher Höhe mit dem Gelstreifen wurde ein feuchtes Filterblättchen platziert und mit 10 µl Protein-Größenstandard (Prestained Protein Marker Broad Range bzw. Protein Marker Broad Range<sup>3</sup> (New England Biolabs) versetzt. Die Elektrodenhalter wurden so positioniert, dass sich die Elektroden genau über der Mitte der Pufferstreifen befanden. Nach dem 45-minütigen Vorlauf (für zwei Gele 40 mA, 100 V, 50 W) wurden Gelstreifen und Filterblättchen entfernt und der Hauptlauf (80 mA, 800 V, 50 W) für 160 min (2 Gele) durchgeführt. Die 2D-Gele wurden anschließend mit colloidalem Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt. Hierzu wurden die Gele 1 h in 300 ml Fixierlösung (17 % (w/v) Ammoniumsulfat, 2 % (v/v) Phosphorsäure, 33 % (v/v) Methanol) geschüttelt, mit

---

<sup>3</sup> mit folgenden apparenten molekularen Massen: 2/3 kDa, 7 kDa, 14 kDa, 20 kDa, 27 kDa, 36 kDa, 43 kDa, 56 kDa, 66 kDa, 97 kDa, 116 kDa, 158 kDa und 212 kDa

1 ml Farbstofflösung (5 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G-250) versetzt, die Färbeschalen mit Parafilm abgedichtet und 8 bis 72 h bei RT leicht geschüttelt. Im weiteren wurden die Gele 3 x 20 min in demineralisiertem Wasser, 1 min in 30 % Methanol und abschließend 15 min in demineralisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

## 10.8 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analysen wurden Gelstückchen aus Proteinbanden in getrockneten Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis und Langen 1997). Hierzu wurden die Gelstückchen nach 2 x 10 min Waschen mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 1 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/µl Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 2 µl 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben bei Raumtemperatur über Nacht verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 6 µl Wasser, 15 min Inkubation bei Raumtemperatur, Zugabe von 5 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und nochmals 10 min Inkubation (Raumtemperatur) eluiert. 0,5 µl der erhaltenen Peptidlösung wurden auf einer Probenplatte mit 0,5 µl einer gesättigten Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in 50 % (v/v) Acetonitril/ 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure gemischt. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des „Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“ (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datendank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der GPMAW-Software 4.0 (Lighthouse Data) oder dem MS-Fit-Programm (Clauser *et al.*, 1999) genutzt. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn mindestens vier der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten, wobei die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 120 ppm betragen durften und die Fehler der einzelnen Peptide einem Muster folgten, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte.

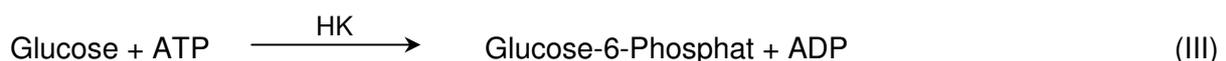
## 11 Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten

Die Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten erfolgte mit *C. glutamicum*-Zellsuspensionen (1 ml Volumen) in einer magnetisch gerührten 2 ml-Kammer mit einer Sauerstoffelektrode vom Clarke-Typ (Rank Brothers, Cambridge, United Kingdom). Die Elektrode wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengesetzt, mit 1 ml 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gefüllt und die Temperatur auf 25 °C thermostatisiert. Zur Kalibrierung der Sauerstoffelektrode wurde Luft durch den Puffer geleitet, bis die Anzeige stabil blieb. Dieser Wert wurde als 100 % Sättigung (258  $\mu\text{M O}_2$  bei 25 °C) genommen. Zur Überprüfung des Nullpunktes wurden einige Kristalle Natriumdithionit zugegeben, wodurch der Sauerstoff vollständig verbraucht wurde. Wenn die Anzeige dabei nicht „Null“ erreichte, wurde sie über die Nullpunktseinstellung des Gerätes eingestellt. In diesem Fall wurde die vorherige Kalibrierung wiederholt. Zur Messung wurde die Kammer mit 940  $\mu\text{l}$  luftgesättigtem 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) und 20  $\mu\text{l}$  Glucose (222 mM) befüllt und der Sauerstoffverbrauch wurde nach Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  einer konzentrierten Zellsuspension (in 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0)) verfolgt. Für Zellen aus der exponentiellen Phase wurde die  $\text{OD}_{600}$  in der Messkammer auf 2 eingestellt, für Zellen aus der stationären Phase auf 5. Eine Linearität zwischen dem gemessenen Sauerstoffverbrauch und der eingesetzten  $\text{OD}_{600}$  wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 8$  festgestellt.

## 12 Bestimmung der Glucosekonzentration

### 12.1 Enzymatisch-photometrische Glucose - Bestimmung

D-Glucose wurde nach einer Methode von Bergmeyer *et al.* (1974) enzymatisch mit Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) bestimmt. Dieser Test beruht auf den in Gleichungen (III) und (IV) dargestellten Reaktionen.



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent und wurde aufgrund der Absorption bei 340 nm (molarer dekadischer Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{340} = 6,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt. Für den Test wurden Mikrotiterplatten für 96

Proben (Wellplates, VWR International, Wien, Österreich) verwendet. Es wurden jeweils 40 µl Probe bzw. Glucose-Standards unterschiedlicher Konzentrationen (0,1- 2,5 mM) in die Probenvertiefungen pipettiert (jeweils Doppelbestimmungen) und 260 µl der Reaktionslösung (siehe unten) zugesetzt. Danach erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Heidolph Polymax 1040). Anschließend wurde die Extinktion bei 340 nm mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (ThermoMax microplate reader, MWG) bestimmt. Die Umrechnung der gemessenen Extinktionen in die Glucosekonzentration erfolgte anhand der mit den Glucose-Standards erstellten Kalibriergeraden.

50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6,8:

Tris		12,1 g
Maleinsäure		11,6 g
NaOH (konz.)		pH 6,8 einstellen
bidest. H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml

100 mM Magnesiumchlorid-Lösung:

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		1,017 g
Tris-Maleat-Puffer	ad	50 ml

NAD/ATP-Mix (24 Ansätze):

ATP		367,5 mg
NAD		477,0 mg
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.		25,0 ml
Tris-Maleat-Puffer	ad	600 ml

Enzym-Lösung.

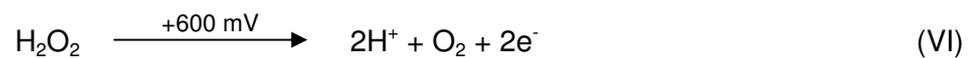
Hexokinase (3000 U/ml)		55 µl
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1000 U/ml)		55 µl
bidest. H <sub>2</sub> O		4290 µl

Reaktionslösung:

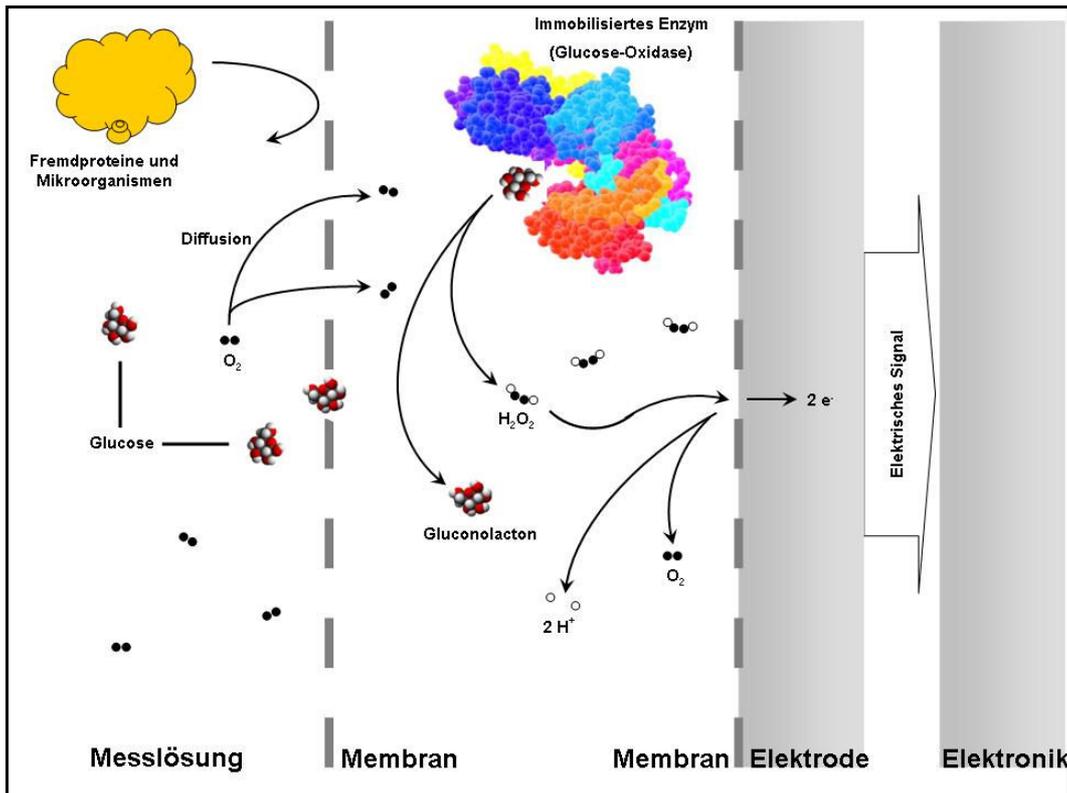
Probe		40 µl
Enzym-Lsg. mit NAD/ATP-Mix		260 µl

## 12.2 Enzymatisch-amperometrische Glucose - Bestimmung

Alternativ zur rein enzymatischen Glucose-Bestimmung wurde Glucose mittels einer Enzymelektrode „EBIO® compact plus“ (Eppendorf) nach einem enzymatisch-amperometrischen Verfahren bestimmt. Hierbei beginnt ein Messzyklus mit dem Eintauchen der Probenkanüle in eine Probe, wodurch die Probenlösung in die Messkammer gesaugt wird. Die bei der Probenahme in die Messkammer gelangte Glucose trifft nach Durchtritt durch die erste Membrangrenzschicht (vgl. Abbildung 3.2) auf die immobilisierte Glucose-Oxidase (GOD) und wird von diesem Enzym gemäß Reaktionsgleichung (V) zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umgesetzt. Nach der Diffusion durch die zweite Membrangrenzschicht wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  an der Platinelektrode gemäß Reaktionsgleichung (VI) bei +600 mV oxidiert.



Das daraus erhaltene Messsignal (Strom-Zeit-Kurve) wird während der Probenahme fortlaufend differenziert. Das Maximum der differenzierten Kurve kennzeichnet den maximalen Anstieg der Strom-Zeit-Kurve. Das hierzu gehörige Messsignal wird in einen Spannungswert umgewandelt. Dieser Messwert ist der Glucosekonzentration proportional. Zur Messung wurden 30  $\mu\text{l}$  Glucose-Standard bzw. Probe zu 1 ml System-Puffer (5 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,15 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 g/l Na-Benzoesäure, 0,5 g/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 2,5 g/l NaCl, pH 7,3) gegeben und analysiert. Die Kalibrierung der Enzymelektrode erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 11,25 - 26 mM Glucose.

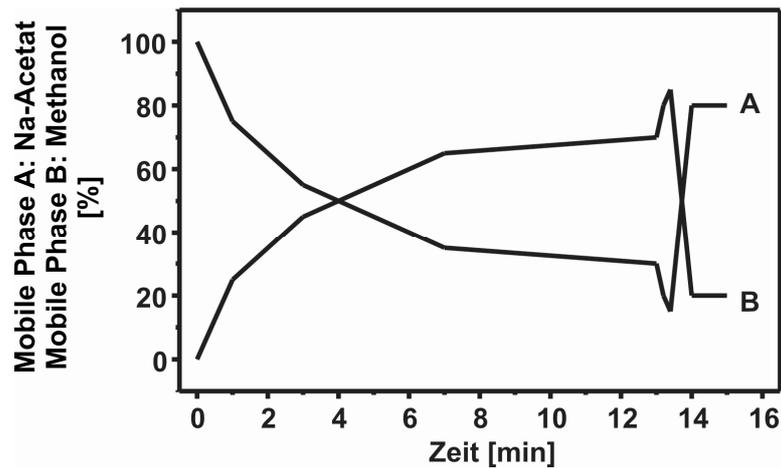


**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung einer Enzymelektrode zur Glucosebestimmung nach dem enzymatisch-amperometrischen Verfahren

## 13 Chromatographische Methoden

### 13.1 Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC

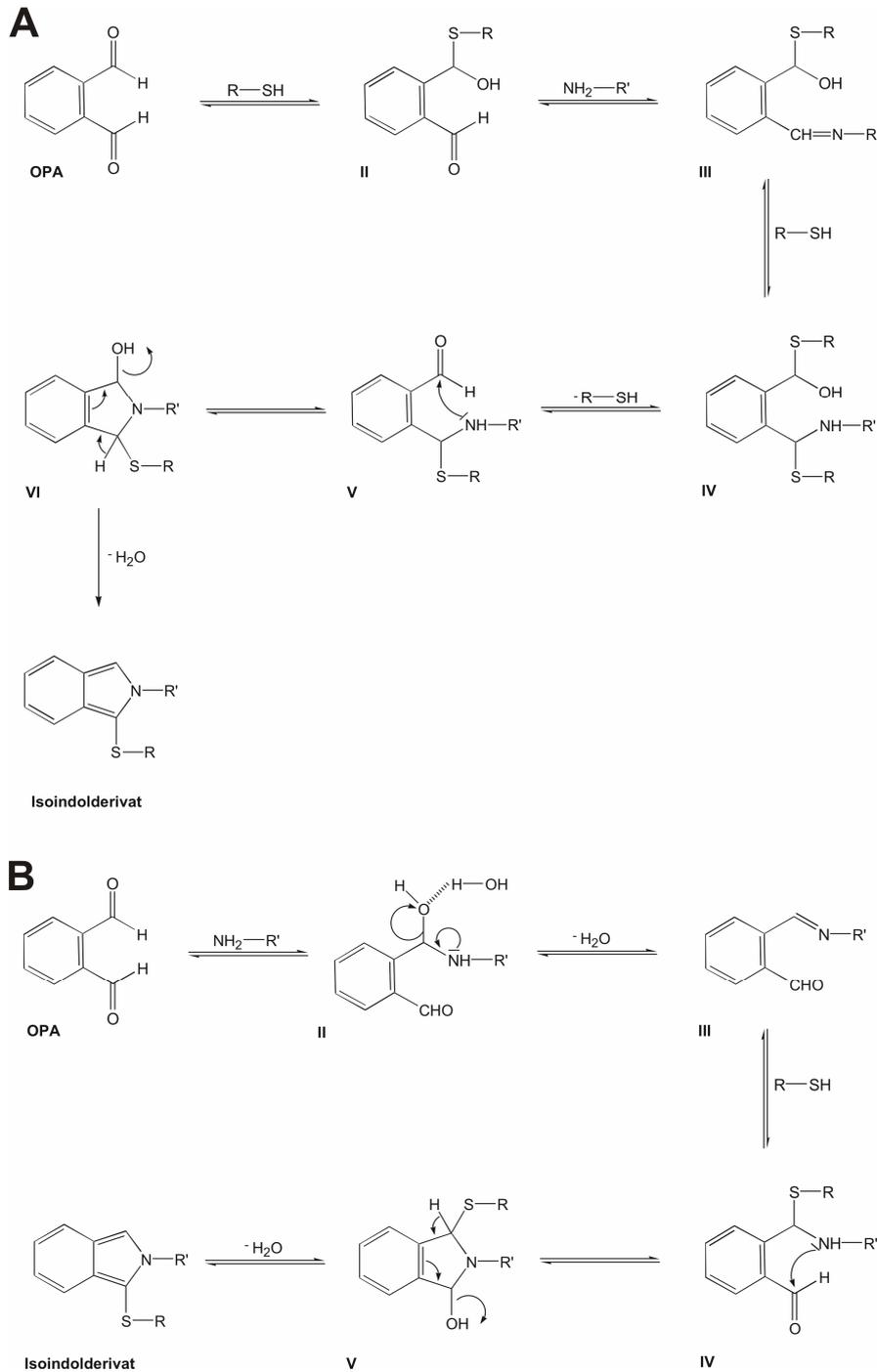
Die quantitative Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand erfolgte durch reversed-phase-HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit einem Gemisch aus *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) nach Lindroth und Mopper (1979) unter Verwendung eines Agilent Technologies 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einer ODS Hypersil 120 x 4 mm Trennsäule (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) mit 5  $\mu$ m Partikelgröße und einer 40 x 4 mm Vorsäule. Jeder Probe wurde 1 mM Ornithin (Endkonzentration) als interner Standard zugesetzt, ausgehend von einer 50 mM Stammlösung in Wasser. Die Substanzen wurden, entsprechend zunehmender Hydrophobizität, mit einer Flussrate von 0,35 ml  $min^{-1}$  innerhalb der ersten Minute und 0,6 ml  $min^{-1}$  innerhalb der folgenden 15 min bei 40 °C mit einem Gradienten (Abb. 3.3) aus 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2) als polarer Phase und Methanol als unpolare Phase eluiert.



**Abbildung 3.3:** Zeitliche Gradientenzusammensetzung, für die Elution von derivatisierten Aminosäuren bei der HPLC-analytischen Bestimmung.

Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Excitation bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Aminosäurekonzentration in der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit Ornithin als internem Standard und einer Kalibriergeraden aus externen Standards berechnet.

Das Verfahren der Derivatisierung beruht auf der Reaktion von OPA, 2-Mercaptoethanol und einer primären Aminogruppe in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert. Für den Verlauf der Reaktion werden unterschiedliche Reaktionsmechanismen diskutiert. Nach Simons und Johnson (1978) reagiert das OPA mit der Thiolgruppe und nachfolgend mit dem Amin (Abb. 3.4 A). OPA und Thiol reagieren zu einem Hemithioacetal (II), das mit dem Amin zu einem Imin (III) umgesetzt wird. Durch den nukleophilen Angriff einer weiteren Thiogruppe entsteht das Hemithioacetal (IV), das sich in das  $\alpha$ -Alkylaminobenzylsulfid (V) umwandelt. Der Isoindolring (VI) wird durch intramolekularen nukleophilen Angriff des sekundärenamins auf die freie Carbonylgruppe gebildet. Nach Dehydratation entsteht das Isoindolderivat.



**Abbildung 3.4:** Vorgeschlagene Reaktionsmechanismen für die Reaktion von OPA und 2-Mercaptoethanol mit einem primären Amin nach (A) Simons und Johnson (1978) und nach (B) Sternson *et al.* (1985). R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; R' = Alkyl- oder Arylrest

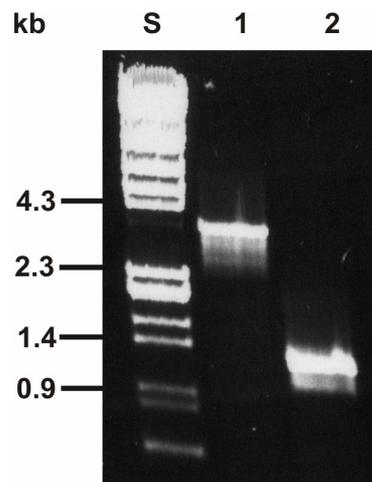
Sternson *et al.* (1985) haben einen alternativen Weg vorgeschlagen (Abb. 3.4 B). OPA reagiert erst mit dem primären Amin zu einem Carbinolamin (II), das im nächsten Schritt zum reaktiven Imin (III) umgewandelt wird. Dieses wird von der Thiolgruppe angegriffen, wobei das  $\alpha$ -Alkylaminobenzylsulfid (IV) entsteht, aus dem sich im weiteren durch intramolekularen nukleophilen Angriff des sekundären Amins auf die freie Carbonylgruppe der Isoindolring (V) bildet. Nach Dehydratation entsteht wiederum das Isoindolderivat.

### **13.2 Bestimmung organischer Säuren mittels HPLC**

Die quantitative Bestimmung organischer Säuren in Kulturüberständen erfolgte durch Ionenausschlusschromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Aminex HPX-87H, 150 x 7,8 mm; Biorad Hersteller) durch isokratische Elution innerhalb von 10 min mit 6 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei einer Flussrate von 0,6 ml min<sup>-1</sup> und einer Temperatur von 65 °C mit Hilfe eines Agilent Technologies 1100 LC Systems. Die eluierten organischen Säuren wurden mit einem Diodenarray-Detektor (DAD G1315B) bei einer Wellenlänge von 215 nm detektiert. Die Quantifizierung der organischen Säuren erfolgte durch Vergleich der Peakflächen mit zuvor erstellten Kalibriergeraden aus externen Standards der entsprechenden Säure.



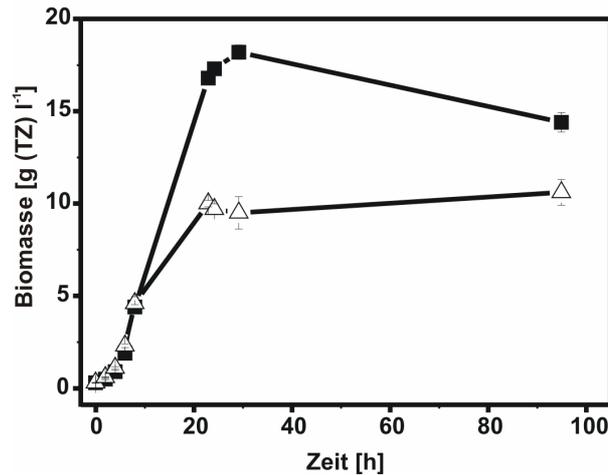
Kolonie-PCR mit den Primern  $\Delta cydAB1$ -for und  $\Delta cydAB4$ -rev überprüft. Von 20 untersuchten Klonen zeigten 7 Klone die Wildtyp-Situation (3,5- kb-Fragment) und 1 Klone die gewünschte *cydAB*-Deletion (1,1-kb-Fragment). Da bei den anderen 12 Klonen keine Banden erhalten wurden ist davon auszugehen, dass bei diesen Kolonien der Zellaufschluss nicht funktioniert hat. Die erfolgreiche Deletion der *cydAB*-Gene in einem dieser Klone wurde weiterhin durch PCR mit chromosomaler DNA und den Primern  $\Delta cydAB$ -for und  $\Delta cydAB$ -rev nachgewiesen, die ausserhalb des deletierten Bereiches binden (Abb. 4.2). Das 1,3-kb-Fragment in Spur 2 entspricht der Größe, die man bei erfolgreicher Deletion erwarten würde. Das 3,8-kb-Fragment in Spur 1 entspricht der Größe, die man für den Wildtyp erwarten würde.



**Abbildung 4.2:** PCR mit isolierter chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Spur 1) und DM1730 $\Delta cydAB$  (Spur 2) und den Primern  $\Delta cydAB$ -for und  $\Delta cydAB$ -rev zur Bestätigung der genomischen Deletion von *cydAB*. S:  $\lambda$ -DNA-Längenstandard

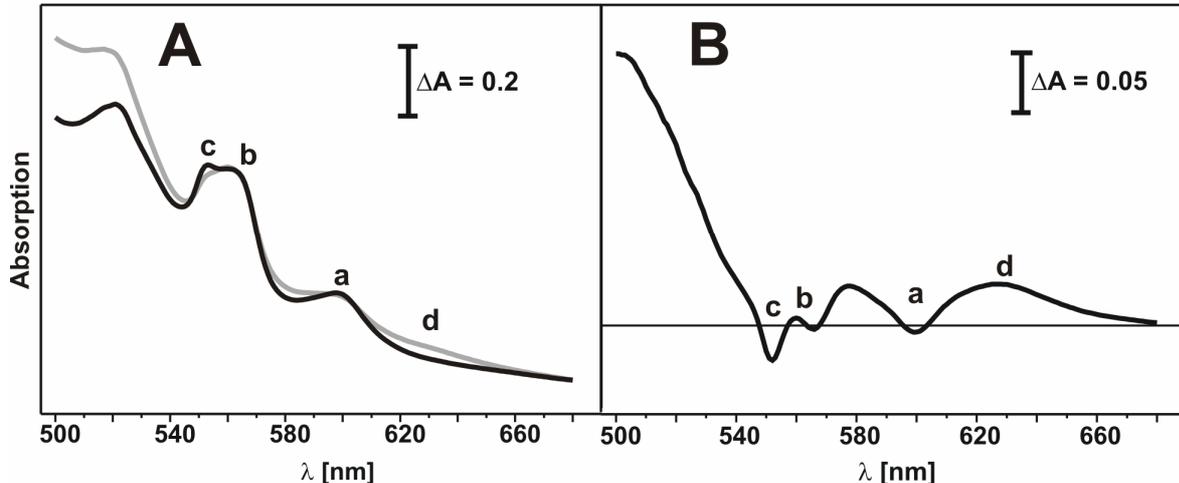
## 1.2 Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 $\Delta cydAB$

Beim Wachstum auf Vollmedium-Agarplatten (BHI mit 0,5 M Sorbitol) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp ATCC 13032 und der Cytochrom-*bd*-Oxidase Deletionsmutante ATCC 13032 $\Delta cydAB$  beobachtet werden (Niebisch 2003). Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass es beim Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4% Glucose deutlich Unterschiede zwischen den beiden Stämmen gibt (Abb. 4.3). Während die Stämme in der exponentiellen Phase nahezu identische Wachstumsraten von  $0,35 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$  (ATCC 13032) und  $0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  (13032 $\Delta cydAB$ ) zeigen, geht die  $\Delta cydAB$ -Mutante bereits viel früher in die stationäre Phase über. Die maximale Biomasse ist mit  $10,6 \pm 0,7 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  für ATCC 13032 $\Delta cydAB$  etwa 42 % geringer als die maximale Biomasse von ATCC 13032 mit  $18,2 \pm 0,39 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Abbildung 4.3:** Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (-■-) und ATCC 13032Δ*cydAB* (-Δ-) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose. Die Biomasse wurde aus der optischen Dichte bei 600 nm berechnet ((0,25 g (TZ) l<sup>-1</sup> pro OD<sub>600</sub> = 1).

Zur weiteren Charakterisierung wurden Veränderungen im Cytochrom-Gehalt untersucht. Hierzu wurden Dithionit-reduziert-Spektren mit intakten Zellen von ATCC 13032 und ATCC 13032Δ*cydAB* aufgenommen, die bis zur stationären Phase in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose kultiviert worden waren (Kultivierungszeit 30 h).



**Abbildung 4.4:** (A) Dithionit-reduziert-Spektren intakter Zellen (OD<sub>600</sub> = 100) von ATCC 13032 (graue Linie) und ATCC 13032Δ*cydAB* (schwarze Linie) nach aerober Kultivierung (30 h) in CGXII-Minimalmedium mit 4% Glucose. Die Spektren wurden in Küvetten mit 0,5 cm Schichtdicke aufgenommen. Absorptionsmaxima bei 552 nm, 562 nm, 600 nm und 630 nm, die charakteristisch sind für Cytochrome des *c*-, *b*-, *a*- und *d*-Typs, sind mit den Buchstaben *c*, *b*, *a* bzw. *d* gekennzeichnet. (B) Differenzspektrum der beiden in A gezeigten Spektren: ATCC 13032 minus ATCC 13032Δ*cydAB*.

Sowohl im Spektrum des Wildtypstamms ATCC 13032 als auch im Spektrum der *cydAB*-Mutante konnten Cytochrome des *a*-, *b*- und *c*-Typs anhand ihrer Absorptionsmaxima bei 600

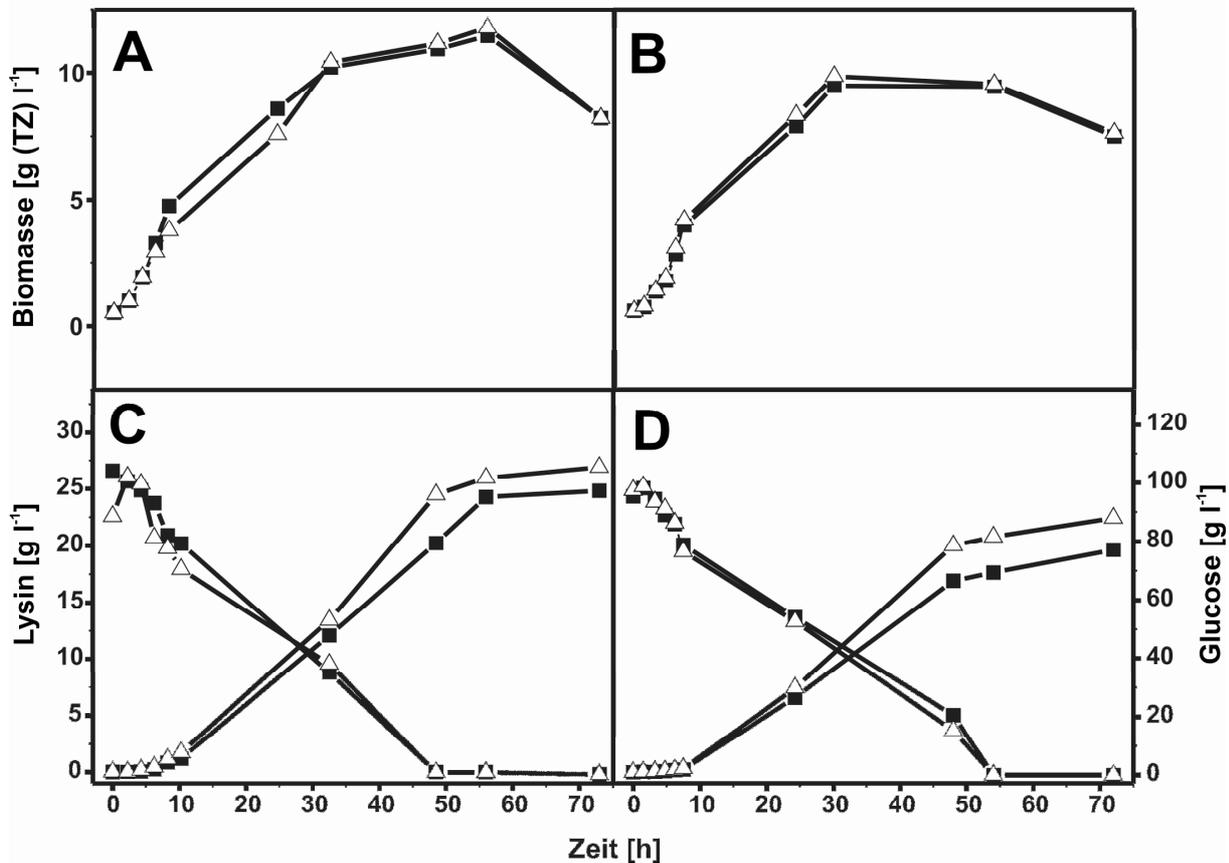
nm, 562 nm und 552 nm nachgewiesen werden (Abb. 4.4 A). Die Konzentrationen von *a*- und *c*-Typ Cytochromen scheinen in der Mutante gegenüber dem Wildtyp erhöht zu sein, was auch durch das Differenzspektrum bestätigt wird (vgl. Abbildung 4.4 B). Ein Cytochrom-*d*-spezifisches Absorptionsmaximum bei 630 nm fehlte erwartungsgemäss in der *cydAB*-Mutante, war allerdings auch beim Wildtyp-Stamm nicht klar erkennbar. Erst das Differenzspektrum von Wildtyp-minus-Mutante deutet darauf hin, dass der Wildtyp Cytochrom-*d* enthält, da es ein deutliches Maximum bei 630 nm zeigt.

Zusammenfassend lassen die oben dargestellten Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Cytochrom-*bd*-Oxidase in *C. glutamicum* ATCC 13032 beim Wachstum in Glucose-Minimalmedium eine wichtige Rolle beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase spielt. Erstaunlich ist dabei, dass im Vergleich zu *a*-, *b*- und *c*-Typ-Cytochromen nur sehr geringe Mengen an Cytochrom-*d* spektroskopisch nachgewiesen werden können.

### 1.3 Charakterisierung der Mutante MH20-22B $\Delta$ *cydAB*

Um zu untersuchen, ob die Deletion der „ineffizienten“ Cytochrom-*bd*-Oxidase in dem Lysinproduktionsstamm MH20-22B zu Wachstumsunterschieden und/oder Veränderungen bei der Lysinproduktion führt, wurden die *C. glutamicum*-Stämme MH20-22B und MH20-22B $\Delta$ *cydAB* (Niebisch 2003) in modifiziertem CGX-Minimalmedium mit 10 % Glucose kultiviert und dabei sowohl die Biomasse- und Lysinbildung als auch der Glucoseverbrauch verfolgt. Der Lysinproduktionsstamm MH20-22B wurde durch Zufallsmutagenese und Selektion auf Aminoethyl-L-Cystein- und L-Threonin-Resistenz konstruiert, die durch eine „feedback“-resistente Aspartat-Kinase verursacht wird. Im Anschluss erfolgte zusätzlich eine Selektion auf Leucin-Auxotrophie, die durch eine defekte Isopropylmalat-Dehydratase verursacht wird (Schrumpf *et al.* 1992). Wie in Abb. 4.5 A und B gezeigt, konnten bei zwei unabhängigen Kultivierungen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum festgestellt werden. Beide Stämme zeigten eine Wachstumsrate von  $\mu = 0,29 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  während der exponentiellen Phase und erreichten eine maximale Biomasse von  $10,5 \pm 1,4 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  (MH20-22B) bzw.  $10,8 \pm 1,4 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  (MH20-22B $\Delta$ *cydAB*). Auch beim Glucoseverbrauch konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.5 C und D). Dagegen war die Lysinbildung im Stamm MH20-22B $\Delta$ *cydAB* erhöht. Die Endkonzentration lag mit  $23 \pm 4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  um etwa 10 % über dem Wert des Parentalstammes MH20-22B ( $21 \pm 5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) (Abb. 4.5 C und D). Die relativ hohen Standardabweichungen resultieren aus den stark unterschiedlichen

Lysinkonzentrationen, die in den Einzelexperimenten gebildet wurden. Insgesamt war aber in allen Vergleichen die Lysinbildung und die Lysin-Ausbeute (0,28 mol-C/mol-C<sup>4</sup>) von MH20-22B $\Delta$ *cydAB* deutlich gegenüber der von MH20-22B (0,26 mol-C/mol-C<sup>1</sup>) erhöht.

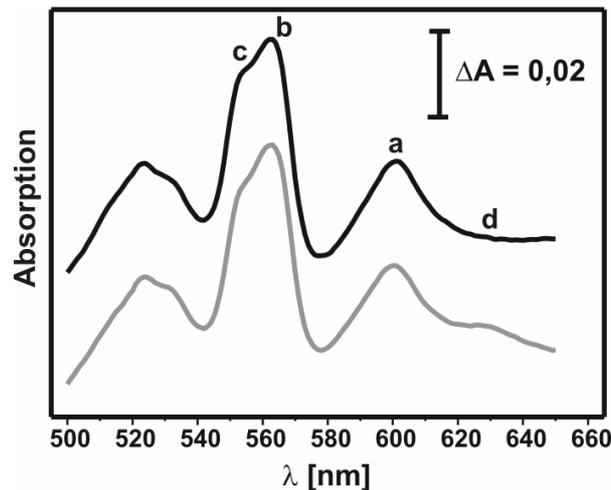


**Abbildung 4.5:** Biomassebildung (A, B), Lysinbildung und Glucoseverbrauch (C, D) von zwei unabhängigen Kultivierungen von MH20-22B (-■-) und MH20-22B $\Delta$ *cydAB* (-Δ-) in modifiziertem CGX-Minimalmedium mit 10 % (w/v) Glucose. Die Biomasse wurde aus der optischen Dichte bei 600 nm errechnet.

Veränderungen im Cytochrom-Gehalt wurden durch reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektren von isolierten Membranen von Zellen aus der stationären Phase untersucht (Abb. 4.6). Dabei konnten wiederum Cytochrome des *a*-, *b*- und *c*-Typs in beiden Stämmen nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte im Stamm MH20-22B ein Absorptionsmaximum bei etwa 630 nm detektiert werden, das auf die Anwesenheit der Cytochrom-*bd*-Oxidase hindeutet (vgl. Abb. 4.6). Der im Vergleich zu ATCC 13032 höhere Häm-*d*-Gehalt von MH20-22B korreliert mit erhöhten Konzentrationen von *cydABDC*-mRNA in MH20-22B im Vergleich zu 13032 (Sindelar 2003). In Membranen von MH20-22B $\Delta$ *cydAB* fehlte das Maximum bei 630 nm erwartungsgemäß.

<sup>4</sup> Die molare Ausbeute ist angegeben als gebildetes mol-C (Lysin) pro verbrauchtes mol-C (Glucose).

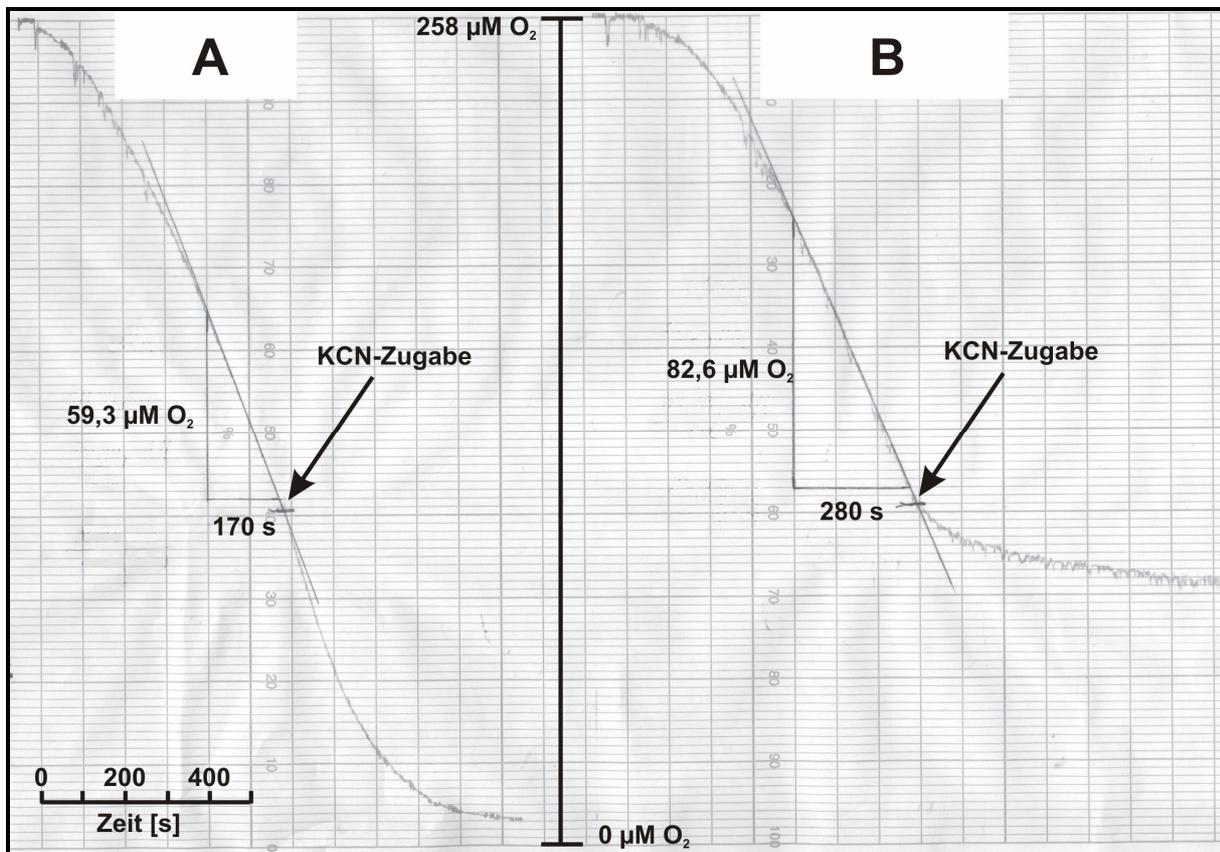
Die Anwesenheit der Cytochrom-*bd*-Oxidase im Stamm MH20-22B wurde weiterhin durch Sauerstoffverbrauchsmessungen bestätigt. Dazu wurden die Stämme MH20-22B und MH20-22B $\Delta$ *cydAB* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose bis zur stationären Phase kultiviert und anschließend der Sauerstoffverbrauch in einem luftgesättigtem Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 4,4 mM Glucose) mit einer Elektrode vom Clarke-Typ bestimmt (Abb. 4.7).



**Abbildung 4.6:** Redox-Differenzspektren (Dithionit-reduziert minus Ferricyanid-oxidiert) von Membranen (6 mg Membranprotein ml<sup>-1</sup>) aus *C. glutamicum* MH20-22B (graue Linie) und MH20-22B $\Delta$ *cydAB* (schwarze Linie) nach aerober Kultivierung (30 h) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Die Spektren wurden in Küvetten mit 0,5 cm Schichtdicke aufgenommen. Absorptionsmaxima bei 552 nm, 562 nm, 600 nm und 630 nm, die charakteristisch sind für Cytochrome des *c*-, *b*-, *a*- und *d*-Typs, sind mit den Buchstaben c, b, a bzw. d gekennzeichnet.

Der Stamm MH20-22B zeigte mit 0,99 mmol · h<sup>-1</sup> · g (TZ)<sup>-1</sup> eine um etwa 20% höhere Atmungsrate als der Stamm MH20-22B $\Delta$ *cydAB* mit 0,79 mmol · h<sup>-1</sup> · g (TZ)<sup>-1</sup>. Dies deutet daraufhin, dass ein Teil des Elektronenflusses zu Sauerstoff im Stamm MH20-22B über die Cytochrom-*bd*-Oxidase verläuft. Die Zugabe von 10 mM KCN während der Sauerstoffmessungen, führte zu einer nahezu vollständigen Hemmung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs durch den Stamm MH20-22B $\Delta$ *cydAB*, hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Sauerstoffverbrauchsrate des Parentalstammes MH20-22B. Durch KCN sollte bevorzugt die terminale *aa*<sub>3</sub>-Oxidase gehemmt werden ( $K_i = 0,5 \mu\text{M}$ ; Kusumoto *et al.* 2000). Die Cytochrom-*bd*-Oxidase hingegen sollte bei der eingesetzten Konzentration nicht vollständig gehemmt werden ( $K_i = 3,2 \text{ mM}$ ; Kusumoto *et al.* 2000). Die fehlende Hemmung bei MH20-22B war überraschend, da dieser Stamm ja Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase besitzt und daher zumindest eine partielle Reduktion der O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate durch KCN erwartet worden war. Der Befund, dass eine solche partielle Hemmung nicht auftrat, deutet darauf hin, dass in diesem Stamm bei einer

Hemmung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase durch KCN der Elektronenfluss zu Sauerstoff vollständig durch die Cytochrom-*bd*-Oxidase erfolgen kann.

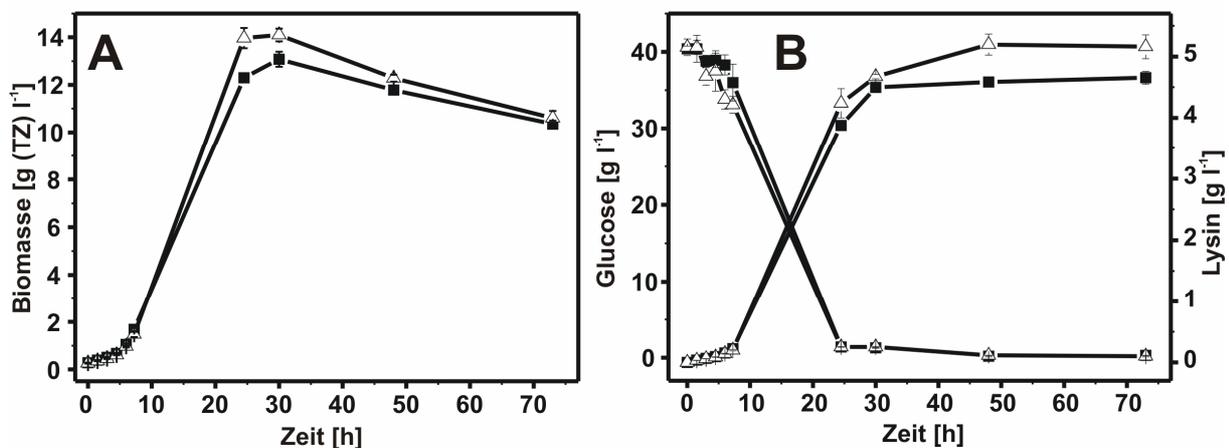


**Abbildung 4.7:** Sauerstoffverbrauch durch Zellen aus der stationären Phase von (A) MH20-22B und (B) MH20-22B $\Delta\text{cydAB}$ , die in sauerstoffgesättigtem Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0 und 4,4 mM Glucose) zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 5 resuspendiert wurden. Der Zeitpunkt der KCN-Zugabe (Endkonzentration 10 mM) zur Inhibition der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase ist markiert. Die Messungen wurden in einer 1 ml Messkammer mit einer Sauerstoffelektrode vom Clarke-Typ bei 25 °C durchgeführt. Die dargestellten Sauerstoffverbrauchsmessungen sind ein Auszug aus jeweils zwei unabhängigen Messungen.

#### 1.4 Charakterisierung der Mutante DM1730 $\Delta\text{cydAB}$

Um zu untersuchen, ob der positive Effekt einer Cytochrom-*bd*-Oxidase-Deletion auf die Lysinproduktion, der bei MH20-22B beobachtet wurde, stammspezifisch ist oder auch bei anders konstruierten Lysinproduktionsstämmen auftritt, wurden Wachstum und Lysin-Produktion des Stammes DM1730 und der davon abgeleiteten *cydAB*-Deletionsmutante analysiert. Der Stamm DM1730 wurde im Gegensatz zu MH20-22B durch genom-basierte Stammentwicklung (Ohnishi *et al.* 2002) erhalten. Bei dieser Methode werden Mutationen, die bekanntermaßen einen positiven Einfluss auf die Synthese des gewünschten Produktes haben,

gezielt in einen Wildtyp-Stamm eingeführt. Der Stamm DM1730 enthält die folgenden vier Punktmutationen: *pyc*<sup>P458S</sup>, diese führt zu einer erhöhten Pyruvat-Carboxylase-Aktivität; *hom*<sup>V59A</sup>, diese führt zu einer verringerten Synthese von L-Isoleucin und L-Methionin; *lysC*<sup>T311I</sup>, diese resultiert in einer „feedback“-resistenten Aspartat-Kinase; *zwf*<sup>A243T</sup>, diese erhöht die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität und damit die NADPH-Bildung im oxidativen Pentosephosphat-Weg. Bei Kultivierung der Stämme DM1730 und DM1730Δ*cydAB* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose konnten nur geringe Unterschiede beim Wachstum beobachtet werden (Abb. 4.8 A). Die Wachstumsraten in der exponentiellen Phase lagen bei  $\mu = 0,24 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$  (DM1730) und  $\mu = 0,24 \pm 0,013 \text{ h}^{-1}$  (DM1730Δ*cydAB*), die maximale Biomasse von DM1730Δ*cydAB* lag mit  $14,1 \pm 0,27 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  geringfügig höher als die von DM1730 mit  $13,1 \pm 0,32 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ . Auch beim Glucoseverbrauch gab es nur geringfügige Unterschiede. Von beiden Stämmen wird die Glucose innerhalb von 24 h vollständig verbraucht (Abb. 4.8 B). Bei der Lysinbildung konnte wie schon bei *C. glutamicum* MH20-22B ein positiver Effekt der *cydAB*-Deletion beobachtet werden. Die maximale Lysinkonzentration von DM1730Δ*cydAB* war mit  $5,2 \pm 0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  um 11% höher als die des Parentalstammes DM1730 ( $4,7 \pm 0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Die Lysinausbeute war mit  $0,16 \text{ mol-C/mol-C}^1$  für DM1730Δ*cydAB* ebenfalls um etwa 7 % erhöht im Vergleich zu DM1730 ( $0,15 \text{ mol-C/mol-C}^1$ ).

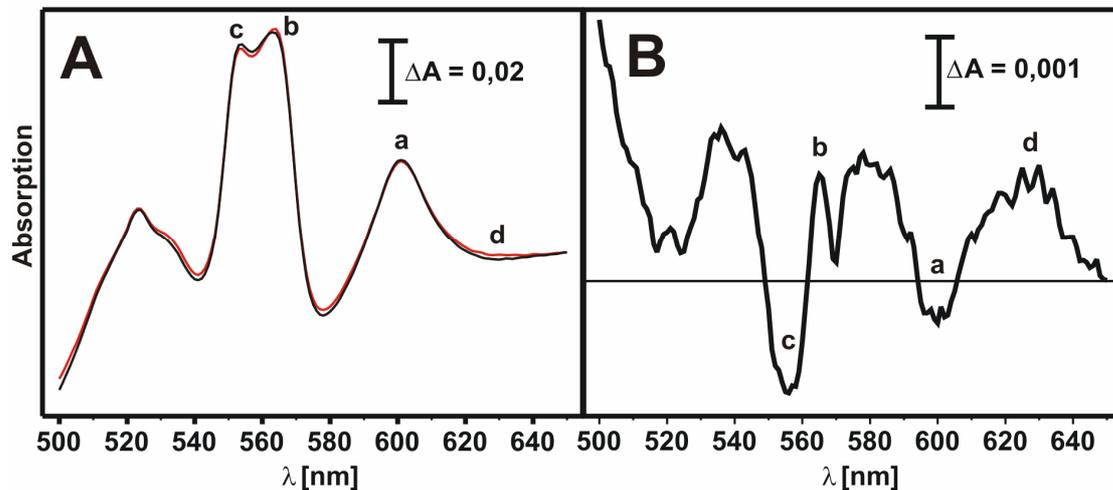


**Abbildung 4.8:** Biomassebildung (A), Lysinbildung und Glucoseverbrauch (B) von *C. glutamicum* DM1730 (-■-) und DM1730Δ*cydAB* (-Δ-) bei aerober Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Die Biomasse wurde aus der optischen Dichte bei 600 nm errechnet. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Kulturen sowie die Standardabweichungen sind dargestellt.

Um Veränderungen im Cytochrom-Muster zu untersuchen, wurden reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektren von Membranen aufgenommen, die von Zellen aus der stationären Phase isoliert worden waren (Abb. 4.9). Wie in den bereits zuvor untersuchten Stämmen konnten auch für DM1730 und DM1730Δ*cydAB* Cytochrome des *a*-, *b*- und *c*-Typ nachgewiesen werden. Ein

<sup>1</sup> Die molare Ausbeute ist angegeben als gebildetes mol-C (Lysin) pro verbrauchtes mol-C (Glucose).

für *d*-Typ-Cytochrome typisches Absorptionsmaximum bei 630 nm konnte weder in DM1730 $\Delta$ *cydAB* noch in DM1730 detektiert werden. Allerdings zeigte das Differenzspektrum DM1730 minus DM1730 $\Delta$ *cydAB* ein Absorptionsmaximum bei 630 nm, was auf die Anwesenheit geringer Mengen der Cytochrom-*bd*-Oxidase in DM1730 hindeutet.

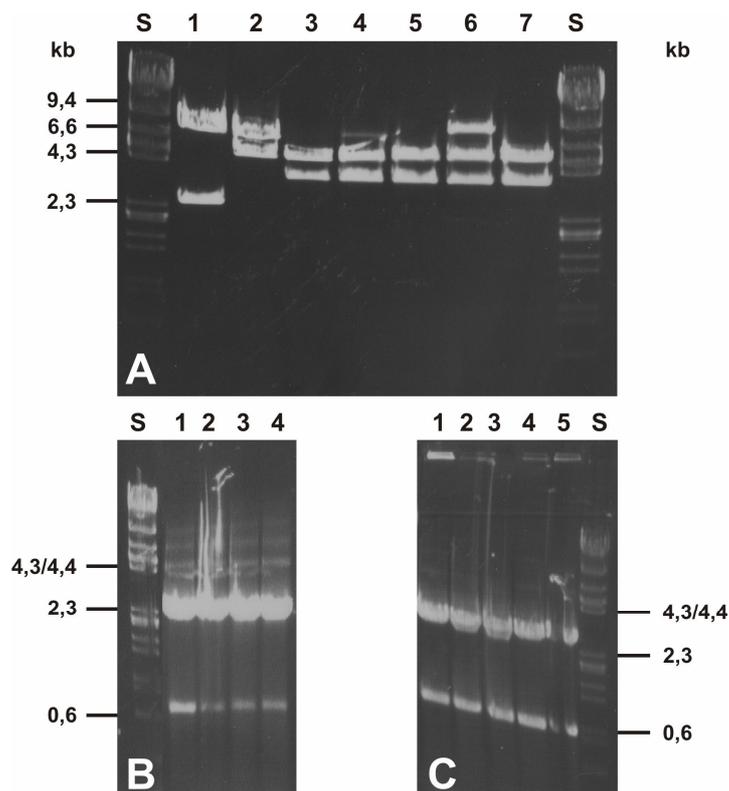


**Abbildung 4.9:** (A) Redox-Differenzspektren (Dithionit-reduziert minus Ferricyanid-oxidiert) von Membranen ( $4 \text{ mg Membranprotein ml}^{-1}$ ) aus den Stämmen DM1730 (rote Linie) und DM1730 $\Delta$ *cydAB* (schwarze Linie) nach aerober Kultivierung (30 h) in CGXII-Minimalmedium mit 4% Glucose. Die Spektren wurden in Küvetten mit 0,5 cm Schichtdicke aufgenommen. Die Buchstaben c, b, a und d zeigen die charakteristischen Absorptionsmaxima für Cytochrome des c-, b-, a- und d-Typs bei 552 nm, 562 nm, 600 nm und 630 nm an. (B) Differenzspektrum: DM1730 minus DM1730 $\Delta$ *cydAB* der Abbildung A.

## 1.5 Überexpression der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Gene

Die Versuche mit den verschiedenen *cydAB*-Deletionsstämmen zeigten, dass die Cytochrom-*bd*-Oxidase, obwohl spektroskopisch schwer nachweisbar, in allen untersuchten Stämmen eine Rolle spielt. Ihre Deletion hemmte das Wachstum des Wildtyps, nicht aber der Lysinproduktionsstämme MH20-22B und DM1730, und hatte einen positiven Einfluss auf die Lysinproduktion der beiden letztgenannten Stämme. In einem komplementären Ansatz sollte im folgenden der Einfluss einer *cydAB*-Überexpression auf das Wachstum und die Lysinproduktion der drei Stämme getestet werden. Aufgrund der geringeren Effizienz der Cytochrom-*bd*-Oxidase beim Aufbau des elektrochemischen Protonenpotentials sollte ein verstärkter Elektronenfluss über dieses Enzym zu einer geringeren ATP-Ausbeute (Mol ATP gebildet pro Mol verbrauchter Glucose) führen. Zur Überproduktion der Cytochrom-*bd*-Oxidase wurden zunächst die *cydAB*-Gene für die Untereinheiten I und II einschliesslich der Ribosomenbindungsstelle von *cydA* mit den Primern *cydAB*-for und *cydAB*-rev amplifiziert, das 2578 bp große Fragment aufgereinigt,

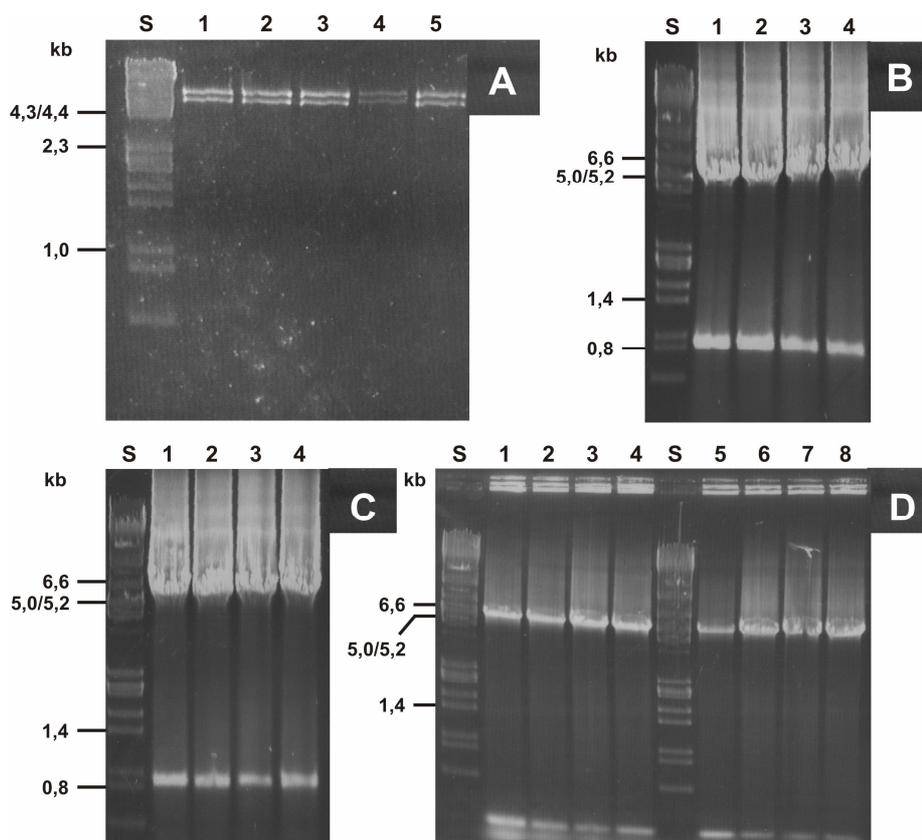
und zunächst in den Vektor pCR2.1-TOPO (vgl. Anhang A4, Abbildung A1) kloniert. Von den transformierten kanamycinresistenten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Klonen wurden Plasmide präpariert, das *cydAB*-Fragment nach Verdau mit *SacI* und *EcoRI* daraus isoliert und mit entsprechend geschnittenem pEKEx2-Vektor ligiert (vgl. Anhang A4, Abbildung A4). Mit dem Ligationsansatz wurde wiederum *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, aus kanamycinresistenten Klonen erneut Plasmide präpariert und durch Restriktion mit *SacI* und *EcoRI* auf die richtige Insert-Größe überprüft. Dabei sollten Fragmente von 8159 bp und 2578 bp erhalten werden. Plasmide, die das gewünschte Insert trugen (Abb. 4.10 A, Spur 1), wurden in *C. glutamicum* MH20-22B (Abb. 4.10 B) und DM1730 (Abb. 4.10 C) transferiert und kanamycinresistente Transformanten wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern pEKEx2-for und pEKEx2-rev überprüft. Hierbei sollten Klone, die das gewünschte Plasmid beinhalten, ein Fragment von 2826 bp liefern. Alle untersuchten Klone zeigten eine dominante Bande mit einer Größe von etwa 2,8 kb, die recht gut der erwarteten Größe von 2826 bp entspricht. Ausserdem gab es ein PCR-Produkt von ca. 0,6 kb, dessen Herkunft unbekannt ist.



**Abbildung 4.10:** Analyse von *cydAB*-Überexpressionsstämmen. (A) Restriktionsanalyse mit *SacI* und *EcoRI* der Plasmide pEKEx2-*cydAB* (Spur 1) und pEKEx2-*cydABDC* (Spuren 2-7). Kolonie-PCR von MH20-22B/pEKEx2-*cydAB* (B) und DM1730/pEKEx2-*cydAB* (C) mit den Primern pEKEX2-for und pEKEX2-rev. S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard

Parallel zur Klonierung der *cydAB*-Gene in den Vektor pEKEx2 wurde auch das *cydABDC*-Operon, das neben den beiden Cytochrom-*bd*-Oxidase-Untereinheiten auch einen putativen

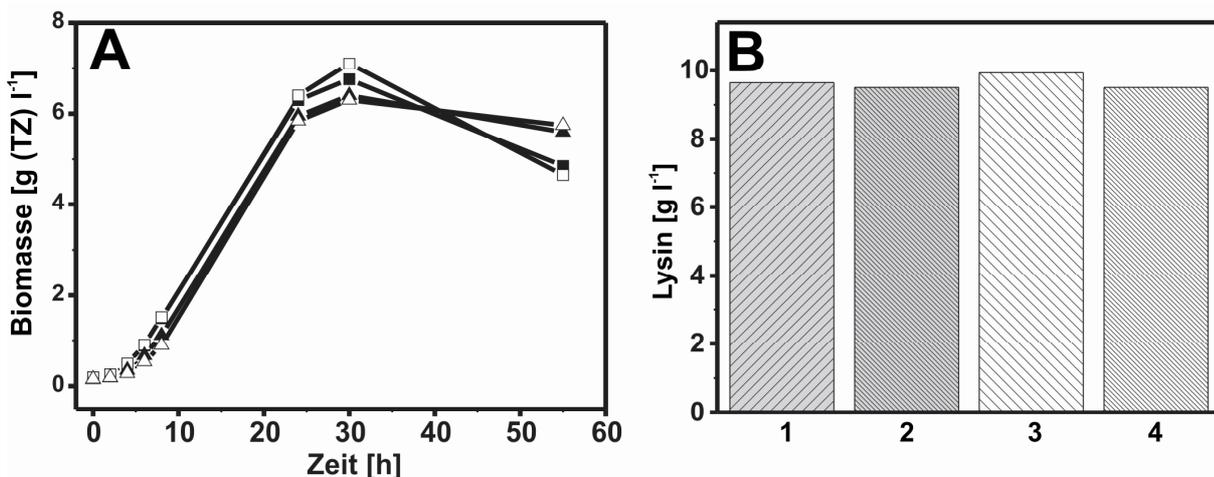
ABC-Transporter kodiert, mit der oben dargestellten Strategie in den pEKEx2-Vektor kloniert (vgl. Anhang A4, Abb. A2 und Abb. A5). pEKEx2-*cydABDC*-Plasmide aus kanamycinresistenten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Klonen sollten nach Restriktion mit *SacI* und *EcoRI* Fragmente von 5683 bp und 8159 bp ergeben. Die Größe der erhaltenen Banden stimmten damit überein (Abb. 4.10 A, Spuren 2-7). Korrekte Plasmide (Spur 2 der Abbildung 4.10 A) wurden mittels Elektroporation in *C. glutamicum* ATCC 13032, MH20-22B, DM1730 und DM1800 transferiert. Aus kanamycinresistenten Transformanten des Wiltyps ATCC 13032 wurden die Plasmide präpariert und durch Restriktion mit *SacI* und *EcoRI* analysiert. Hierbei sollten wiederum Fragmente von 5683 bp und 8159 bp erhalten werden. Die Fragmente der untersuchten Klone (Abb. 4.11 A) entsprechen trotz der schlechten Auflösung des DNA-Längenstandards recht gut den erwarteten Größen. Die kanamycinresistenten Klone der Stämme MH20-22B und DM1730 wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern pEKEx2-for und pEKEx2-rev analysiert. In allen untersuchten Klonen (Abb. 4.11 B – D) konnte ein Fragment von etwa 5,9 kb detektiert werden. Die kleinere Bande von etwa 0,9 kb kann auf Verunreinigungen in der Primer-Stammlösung zurückgeführt werden. Sie tritt bei der Kolonie-PCR des Stammes DM1800/pEKEx2-*cydABDC*, für die neu synthetisierte Primer verwendet wurden, nicht mehr auf.



**Abbildung 4.11:** Analyse von *cydABDC*-Überexpressionsstämmen. (A) Restriktionsanalyse des Plasmids pEKEx2-*cydABDC* isoliert aus *C. glutamicum* ATCC 13032, geschnitten mit *SacI* und *EcoRI*. Kolonie-PCR von *C. glutamicum* MH20-22B/pEKEx2-*cydABDC* (B), DM1730/pEKEx2-*cydABDC* (C) und DM1800/pEKEx2-*cydABDC* (D) mit den Primern pEKEx2-for und pEKEx2-rev. S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard

## 1.6 Überexpression der *cydAB*-Gene in MH20-22B

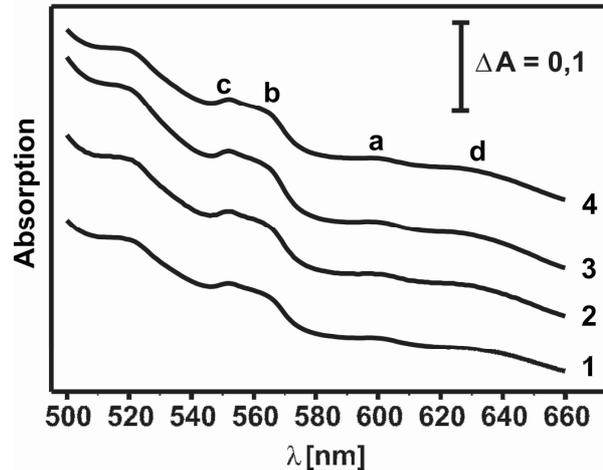
Zur Analyse des Einflusses der *cydAB*-Überexpression auf Wachstum und Lysinbildung wurden die Stämme MH20-22B/pEKEEx2 und MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert. IPTG wurde den Kulturen ggf. zu einer Endkonzentration von 1 mM zu Beginn der Kultivierung zugesetzt. Die untersuchten Stämme MH20-22B/pEKEEx2, MH20-22B/pEKEEx2 + IPTG und MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* und MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* +IPTG zeigten mit einer maximalen Differenz von 13 % nur geringfügige Unterschiede in der Wachstumsrate während der exponentiellen Phase (vgl. Abb. 4.12 A und Tabelle 4.1 am Ende von Kapitel IV.1). Die maximale Biomassebildung unterschied sich um maximal 11 % zwischen MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* und den Vergleichsstämmen (Abb. 4.12 A und Tabelle 4.1 am Ende von Kapitel IV.1). Auffällig war die stärkere Abnahme der Biomasse im Zeitraum von 30 h bis 55 h bei den Stämmen, die nur den Leervektor enthielten. Bei der Lysinbildung konnten nach 55 h Kultivierungszeit keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4.12 B und Tabelle 4.1 am Ende von Kapitel IV.1).



**Abbildung 4.12:** (A) Biomassebildung der Stämme MH20-22B/pEKEEx2 (-■-), MH20-22B/pEKEEx2 +IPTG (-□-), MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* (-▲-) und MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* +IPTG (-△-) bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin. (B) Lysinkonzentration in Kulturüberständen der Stämme MH20-22B/pEKEEx2 (1), MH20-22B/pEKEEx2 +IPTG (2), MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* (3) und MH20-22B/pEKEEx2-*cydAB* +IPTG (4) nach 55 h Kultivierungszeit.

Aufgrund der geringen Effekte auf Wachstum und Lysinbildung wurde getestet, ob die *cydAB*-Überexpression zur verstärkten Bildung von Cytochrom-*bd*-Oxidase führt. Dazu wurde wiederum der Cytochrom-Gehalt durch Reduziert-Spektren intakter Zellen analysiert (Abb. 4.13). Dabei konnten keine Unterschiede im Cytochrom-Muster, insbesondere keine verstärkten Absorptionsmaxima von *b*- und *d*-Typ-Cytochromen in den Stämmen mit pEKEEx2-*cydAB*

beobachtet werden. Auch bei Überexpression der *cydAB*-Gene im Stamm DM1730 konnten keine signifikanten Unterschiede beim Wachstum und der Lysinbildung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

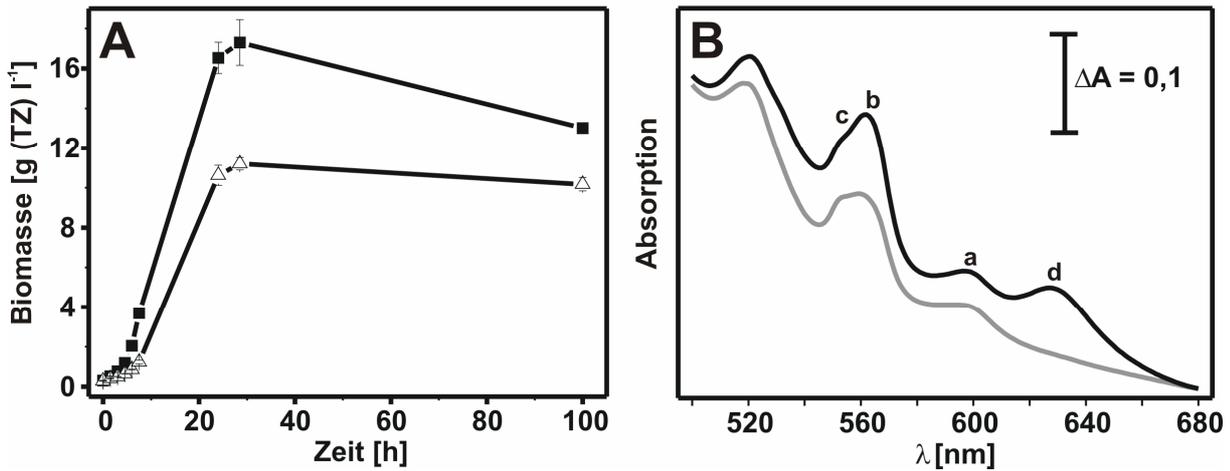


**Abbildung 4.13:** Dithionit-reduziert Spektren von intakten Zellen der Stämme MH2-22B/pEKEx2 (1), MH2-22B/pEKEx2 +IPTG (2), MH2-22B/pEKEx2-*cydAB* (3) und MH2-22B/pEKEx2-*cydAB* +IPTG (4) nach 30 h Kultivierungszeit in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin.

## 1.7 Überexpression der *cydABDC*-Gene in ATCC 13032

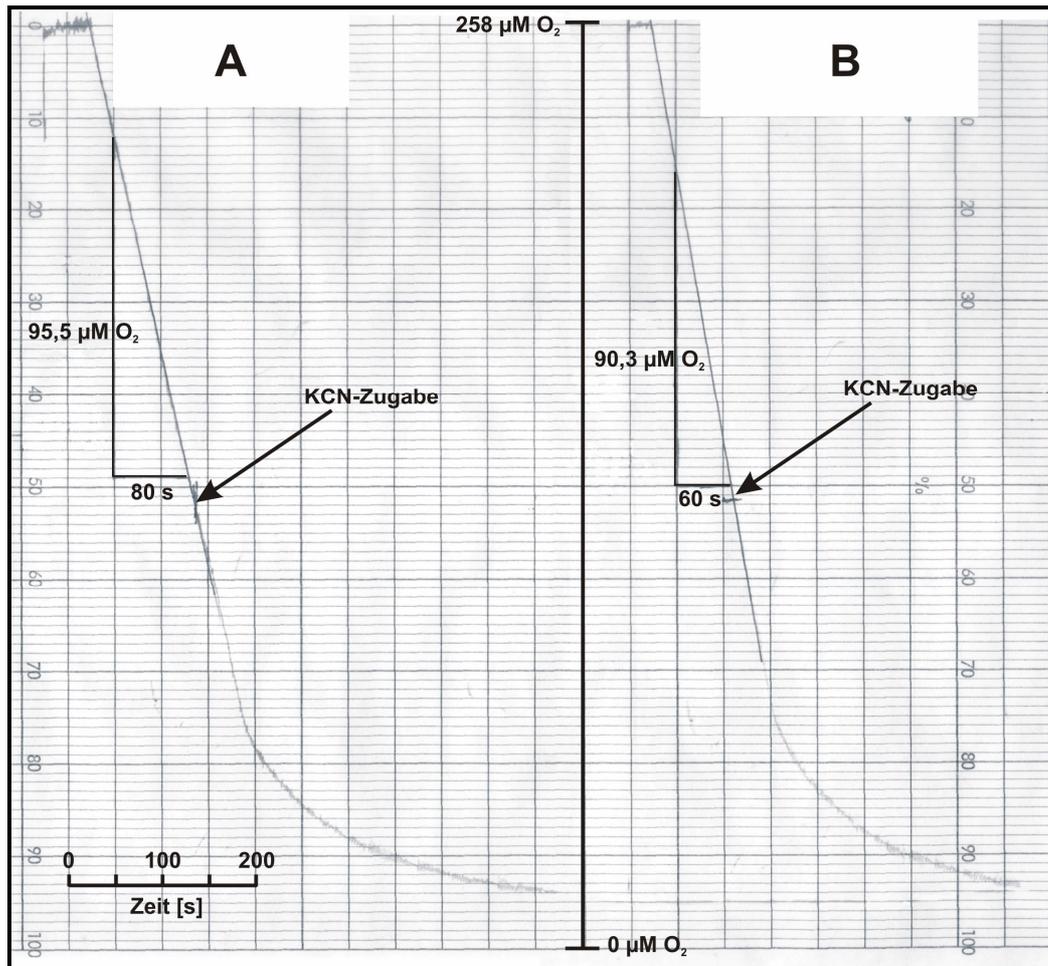
Die oben dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression der Gene *cydAB* alleine nicht ausreichend ist zur Überproduktion von Cytochrom-*bd*-Oxidase. Basierend auf Erkenntnissen aus anderen Bakterien wurde daher in einem nächsten Schritt der gesamte *cydABDC*-Gencluster überexprimiert (Winstedt *et al.* 1998).

Zur Analyse des Einflusses der Überexpression von *cydABDC* auf das Wachstum des Wildtyps wurden die Stämme 13032/pEKEx2 und 13032/pEKEx2-*cydABDC* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG kultiviert. Wie in Abb. 4.14A gezeigt, führte die Überexpression der vier Gene zu einer fast zweifachen Reduktion der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase ( $\mu = 0,18 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$  vs.  $\mu = 0,33 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ ) und zu einer 35%igen Reduktion der maximal erreichten Biomasse ( $11,2 \pm 0,31 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  vs.  $17,3 \pm 1,14 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Die spektroskopische Analyse von Cytochromen mit intakten Zellen aus der stationären Phase zeigte eindeutig, dass die Überexpression von *cydABDC* zur Bildung von Cytochrom-*d* und erhöhten Konzentrationen von Cytochrom-*b* führte und somit vermutlich zur Synthese von Cytochrom-*bd*-Oxidase (Abb. 4.14B). Um weiterhin nachzuweisen, dass die verstärkt gebildete Cytochrom-*bd*-Oxidase in aktiver Form vorliegt, wurden Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Zellen aus der stationären Phase durchgeführt.



**Abbildung 4.14:** Wachstum (A) und spektroskopische Analyse von Cytochromen (B) der Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032/pEKEEx2 (-■- bzw. graue Linie) und ATCC 13032/pEKEEx2-*cydABDC* (-Δ- bzw. schwarze Linie) bei aerober Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG. Die Biomasse wurde aus der optischen Dichte bei 600 berechnet. In (A) sind die Mittelwerte aus drei Kultivierungen und die Standardabweichung dargestellt. In (B) sind Dithionit-reduzierte Spektren intakter Zellen ( $OD_{600} = 100$ ) gezeigt. Die Spektren wurden in Küvetten mit 0,5 cm Schichtdicke aufgenommen. Die Buchstaben c, b, a und d zeigen die charakteristischen Absorptionsmaxima für Cytochrome des c-, b-, a- und d-Typs bei 552 nm, 562 nm, 600 nm und 630 nm an.

Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben 30 h kultiviert und anschliessend der Sauerstoffverbrauch in einem luftgesättigtem Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0 und 4,4 mM Glucose) mit einer Elektrode vom Clarke-Typ bestimmt. Zellsuspensionen des Stammes 13032/pEKEEx2-*cydABDC* zeigten mit  $4,3 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g (TZ)}^{-1}$  eine um etwa 27 % höhere Atmungsrate als Zellen des Stammes 13032/pEKEEx2 mit  $3,4 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g (TZ)}^{-1}$ . Dies deutet darauf hin, dass unter den beschriebenen Bedingungen die Aktivität der terminalen Oxidasen die Rate des Katabolismus limitiert. Die Zugabe von KCN zur Inhibition der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase zeigte weder auf die Sauerstoffverbrauchsrate von 13032/pEKEEx2 noch auf die von 13032/pEKEEx2-*cydABDC* einen Einfluss (Abb. 4.15). Dies deutet daraufhin, dass auch ohne *cydABDC*-Überexpression der Elektronenfluss vollständig über die Cytochrom-*bd*-Oxidase verlaufen kann.

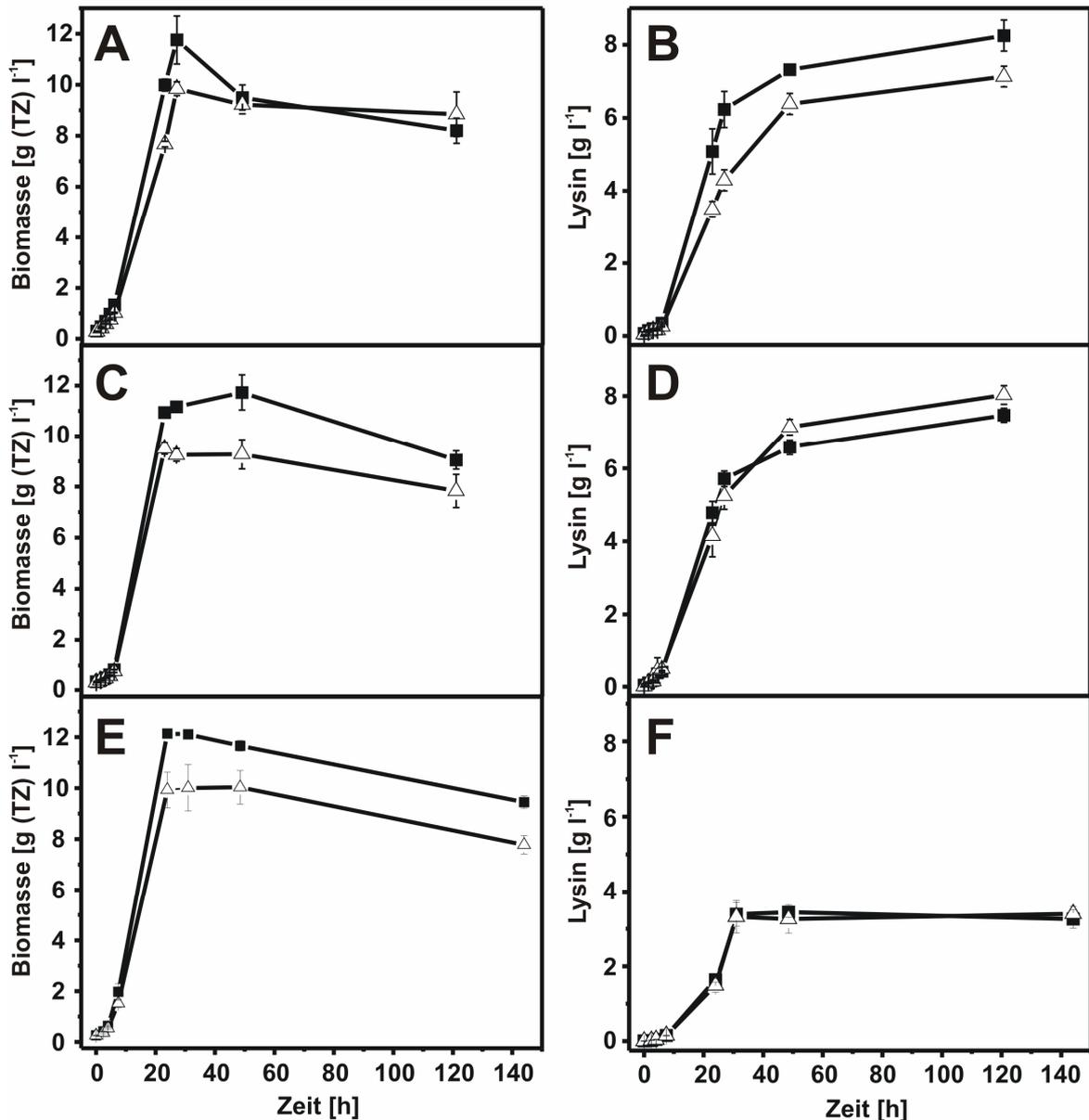


**Abbildung 4.15:** Sauerstoffmessungen mit Zellen der stationären Phase von (A) 13032/pEKEx2 und (B) 13032/pEKEx2-*cydABDC* in sauerstoffgesättigtem 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) und 4,4 mM Glucose. Der Zeitpunkt der KCN-Zugabe (Endkonzentration 10 mM) zur Inhibition der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase ist markiert. Die Messungen wurden in einer 1 ml Messkammer mit einer Sauerstoffelektrode vom Clarke-Typ bei 25 °C durchgeführt. Die Zellen wurden zu einer  $OD_{600} = 5$  in die Messkammer eingesetzt.

## 1.8 Überexpression der *cydABDC*-Gene in *C. glutamicum*-Lysinproduktionsstämmen

Zur Analyse des Einflusses der *cydABDC*-Überexpression auf Wachstum und Lysinbildung von unterschiedlichen Lysinproduktionsstämmen wurden die *cydABDC*-Gene in den Stämmen MH20-22B, DM1730 und DM1800 überexprimiert. Der Stamm DM1800 wurde auf die gleiche Weise konstruiert wie der Stamm DM1730, er enthält allerdings nur zwei der vier in DM1730 eingeführten Punktmutationen, nämlich *pyc*<sup>P458S</sup> und *lysC*<sup>T311I</sup>. Dieser Stamm sollte dabei helfen mögliche Unterschiede im Wachstum und in der Lysinproduktion der MH20-22B- und DM1730-*cydABDC*-Überexpressionsstämme als stammspezifische Ursachen zu identifizieren. Die Stämme MH20-22B/pEKEx2-*cydAB*, DM1730/pEKEx2-*cydAB*, DM1800/pEKEx2-*cydAB* und die entsprechenden Vergleichsstämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG kultiviert.

In allen *cydABDC*-Überexpressionsstämmen waren sowohl die Wachstumsraten als auch die maximal gebildeten Biomassen gegenüber den Vergleichsstämmen reduziert. Der Stamm MH20-22B/pEKEx2-*cydABDC* zeigte mit einer Verringerung von 12 % in der Wachstumsrate während der exponentiellen Phase und einer Differenz von 16 % in der maximal gebildeten Biomasse ein leicht reduziertes Wachstum gegenüber dem Vergleichsstamm MH20-22B/pEKEx2 (vgl. Abbildung 4.16 A und Tabelle 4.1).

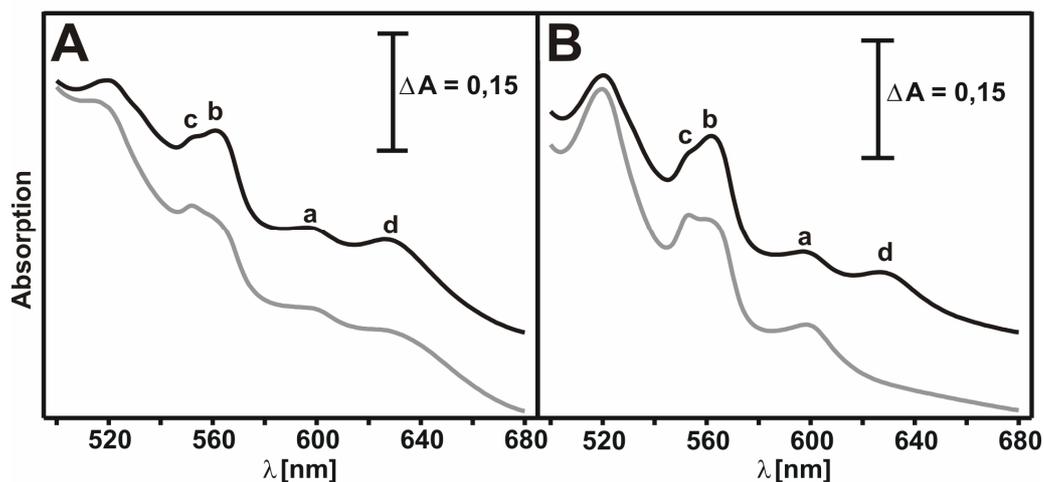


**Abbildung 4.16:** Wachstum und Lysinbildung von *cydABDC*-Überexpressionsstämmen bei aerober Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen und die Standardabweichung sind dargestellt. Die Biomasse wurde aus der optischen Dichte bei 600 nm berechnet. Wachstum (A) und Lysinbildung (B) von MH20-22B/pEKEx2 (-■-) und MH20-22B/pEKEx2-*cydABDC* (-△-). Wachstum (C) und Lysinbildung (D) von DM1730/pEKEx2 (-■-) und DM1730/pEKEx2-*cydABDC* (-△-). Wachstum (E) und Lysinbildung (F) von DM1800/pEKEx2 (-■-) und DM1800/pEKEx2-*cydABDC* (-△-).

Die Überexpression der *cydABDC*-Gene im Stamm DM1730 führte zu einer um 11 % reduzierten Wachstumsrate während der exponentiellen Wachstumsphase und einer um 19 % reduzierten maximalen Biomassebildung (Abb. 4.16 C und Tabelle 4.1). Die Wachstumsrate und maximale Biomassebildung des Stammes DM1800/pEKEEx2-*cydABDC* war mit einer Verringerung um 11 % bzw. 17 % gegenüber dem Vergleichsstamm DM1800/pEKEEx2 reduziert (Abb. 4.16 E und Tabelle 4.1). Der negative Effekt der *cydABDC*-Überexpression auf das Wachstum war in allen untersuchten Lysinproduzenten somit deutlich weniger stark ausgeprägt als im Wildtyp 13032.

Die maximal erreichte Lysinkonzentration sowie die Lysin-Ausbeute von MH20-22B/pEKEEx2-*cydABDC* waren gegenüber der von MH20-22B/pEKEEx2 um 14% reduziert (Abb. 4.16 B und Tabelle 4.1). Dagegen waren die maximal erreichte Lysinkonzentration und die Lysinausbeute von DM1730/pEKEEx2-*cydABDC* gegenüber der von DM1730/pEKEEx2 um 8 % erhöht. Während der exponentiellen Wachstumsphase war die Lysinkonzentration noch leicht reduziert und die Zunahme gegenüber dem Referenzstamm trat erst beim Übergang in die stationäre Phase auf (Abb. 4.16 D und Tabelle 4.1). Bei der Lysinbildung und der Lysinausbeute im Stamm DM1800/pEKEEx2-*cydABDC* konnte keine Unterschiede zum Vergleichsstamm DM1800/pEKEEx2 festgestellt werden (Abb. 4.16 F und Tabelle 4.1).

Die spektroskopische Analyse von Cytochromen mit intakten Zellen der *cydABDC*-Überexpressionsstämme MH20-22B und DM1730 aus der stationären Phase zeigte auch hier eindeutig, dass die Überexpression der *cydABDC*-Gene zu einer erhöhten Konzentrationen an Cytochrom-*b* und *d* führte (Abb. 4.17 A und B). Im Gegensatz zu MH20-22B besass DM1730 ohne *cydABDC*-Überexpression kein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 630 nm.



**Abbildung 4.17:** Spektroskopische Analyse von Cytochromen. Dithionit-reduziert-Spektren intakter Zellen ( $OD_{600} = 100$ ) von (A) MH20-22B/pEKEEx2 (graue Linie) und MH20-22B/pEKEEx2-*cydABDC* (schwarze Linie) und (B) DM1730/pEKEEx2 (graue Linie) und DM1730/pEKEEx2-*cydABDC* (schwarze Linie). Die Spektren wurden in Küvetten mit 0,5 cm Schichtdicke aufgenommen. Die Buchstaben c, b, a und d zeigen die charakteristischen Absorptionsmaxima für Cytochrome des c-, b-, a- und d-Typs bei 552 nm, 562 nm, 600 nm und 630 nm an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Überexpression der *cydABDC*-Gene zur Bildung einer aktiven Cytochrom-*bd*-Oxidase führt, die einen durchweg negativen Einfluss auf das Wachstum hat. Die unterschiedlichen Einflüsse dieser Überexpression auf die Lysinbildung sind aber offensichtlich auf stammspezifische Aspekte zurückzuführen.

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer Cytochrom-*bd*-Oxidase-Deletion bzw. -Überproduktion auf die Parameter Wachstumsrate, maximal gebildete Biomasse, maximal gebildete Lysinkonzentration und die Lysinausbeute von unterschiedlichen *C. glutamicum*-Stämmen.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	IPTG	Wachstumsrate $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	Biomasse <sub>max.</sub> [g l <sup>-1</sup> ]	Lysin <sub>max.</sub> [g l <sup>-1</sup> ]	Ausbeute <sup>a</sup>
ATCC 13032		0,35 ± 0,002	18,2 ± 0,39	k. A. <sup>b</sup>	k. A.
ATCC 13032Δ <i>cydAB</i>		0,34 ± 0,010	10,6 ± 0,70	k. A.	k. A.
MH20-22B		0,29 ± 0,030	10,5 ± 1,41	21 ± 5,0	0,26
MH20-22BΔ <i>cydAB</i>		0,29 ± 0,030	10,8 ± 1,37	23 ± 4,0	0,28
DM1730		0,24 ± 0,007	13,1 ± 0,32	4,7 ± 0,1	0,15
DM1730Δ <i>cydAB</i>		0,24 ± 0,013	14,1 ± 0,27	5,2 ± 0,2	0,16
MH20-22B/pEKEEx2	-	0,30	6,8	9,6	0,30
MH20-22B/pEKEEx2	+	0,30	7,1	9,5	0,29
MH20-22B/pEKEEx2- <i>cydAB</i>	-	0,30	6,4	9,9	0,31
MH20-22B/pEKEEx2- <i>cydAB</i>	+	0,26	6,3	9,5	0,29
ATCC 13032/pEKEEx2		0,33 ± 0,006	17,3 ± 1,14	k. A.	k. A.
ATCC 13032/pEKEEx2- <i>cydABDC</i>		0,18 ± 0,006	11,2 ± 0,31	k. A.	k. A.
MH20-22B/pEKEEx2		0,25 ± 0,003	11,8 ± 0,94	8,25 ± 0,43	0,29
MH20-22B/pEKEEx2- <i>cydABDC</i>		0,22 ± 0,001	9,9 ± 0,27	7,13 ± 0,28	0,25
DM1730/pEKEEx2		0,18 ± 0,005	11,7 ± 0,69	7,47 ± 0,19	0,26
DM1730/pEKEEx2- <i>cydABDC</i>		0,16 ± 0,005	9,5 ± 0,23	8,03 ± 0,26	0,28
DM1800/pEKEEx2		0,27 ± 0,028	12,1 ± 0,18	3,44 ± 0,13	0,12
DM1800/pEKEEx2- <i>cydABDC</i>		0,24 ± 0,025	10,0 ± 0,66	3,40 ± 0,20	0,12

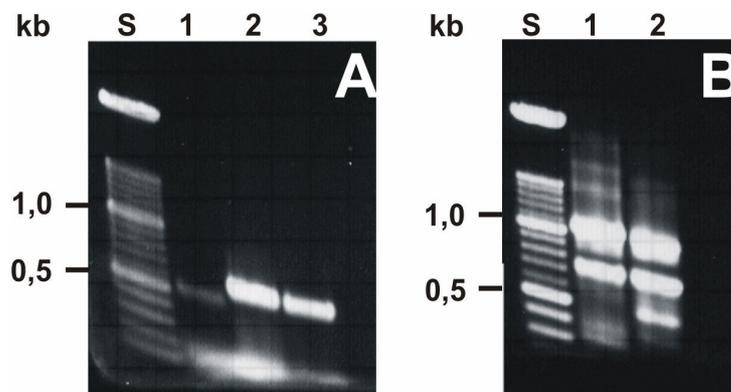
<sup>a</sup> Die molare Ausbeute ist angegeben als gebildetes mol-C (Lysin) pro verbrauchtes mol-C (Glucose)

<sup>b</sup> keine Angabe möglich



A, Spuren 1 und 2) und die resultierenden ca. 500-bp großen Fragmente nach Aufreinigung als Template für eine Crossover-PCR mit dem Primerpaar  $\Delta F_0$ -1-for/ $\Delta F_0$ -4-rev eingesetzt. Das resultierende, ca. 1-kb große Fusionsprodukt (Abb. 4.19 B, Spur 1) wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt, mit HindIII und XbaI geschnitten, mit entsprechend geschnittenem pK19*mobsacB*-Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transferiert. Aus fünf kanamycinresistenten und durch „Blau-Weiß-Screening“ selektierten Klonen wurden die Plasmide isoliert und das klonierte PCR-Fragment durch Sequenzierung auf Fehlerfreiheit überprüft. Die drei korrekten Plasmide wurden als pK19*mobsacB*- $\Delta F_0$  (vgl. Anhang A4, Abb. A7) bezeichnet.

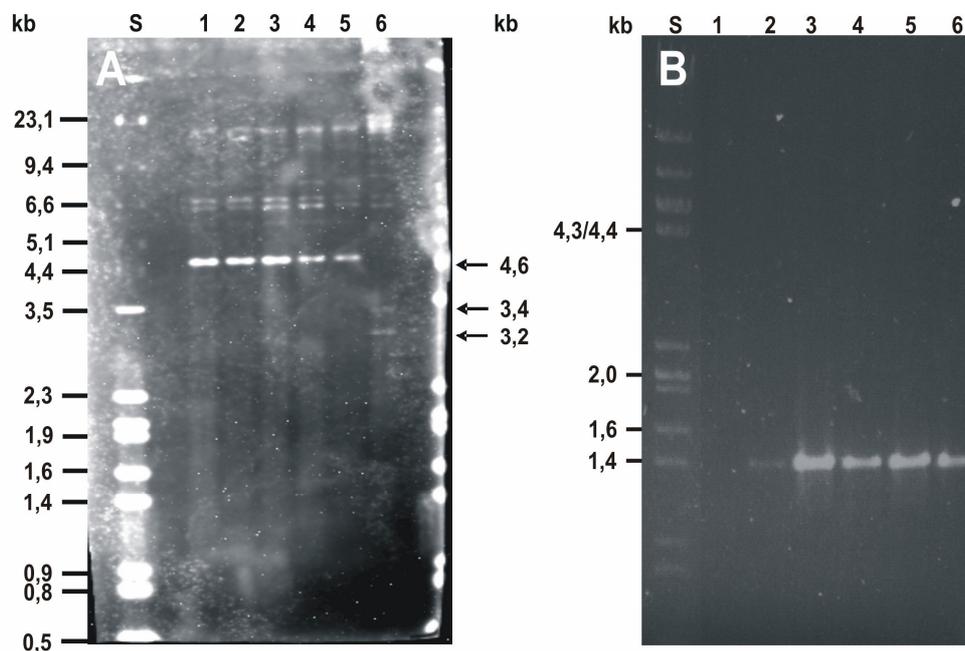
Zur Deletion der vollständigen  $F_1F_0$ -ATP-Synthase wurden die Gene *atpBEFHAGDC* durch eine 21 bp-Sequenz ersetzt (siehe Material und Methoden). Nur die sechs 5'-terminalen Codons von *atpB* sowie die sieben 3'-terminalen Codons von *atpC* blieben dabei im Chromosom erhalten. Die Konstruktion des Plasmids pK19*mobsacB*- $\Delta F_1F_0$  (vgl. Anhang 4, Abb. A8) erfolgte nach der oben beschriebenen Methode, wobei für die Amplifizierung des 3'-flankierenden Bereichs des *atpC*-Gens (vgl. Abbildung 4.19A Spur 3) das Primerpaar  $\Delta F_1F_0$ -3-for/ $\Delta F_1F_0$ -4-rev verwendet wurde und die Crossover-PCR (Abb. 4.19B Spur 2) mit dem Primerpaar  $\Delta F_0$ -1-for/ $\Delta F_1F_0$ -4-rev erfolgte. Das klonierte Crossover-PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung überprüft und die zwei korrekten Plasmide für die weitere Mutantenkonstruktion verwendet.



**Abbildung 4.19:** (A) Analyse der amplifizierten Fragmente des 5'- bzw. 3'-flankierenden Bereichs der ATP-Synthase  $F_0$ -Gene bzw. der  $F_1F_0$ -Gene. Spur 1, PCR-Produkt des 5'-flankierenden Bereichs von *atpB* erzeugt mit dem Primerpaar  $\Delta F_0$ -1-for/ $\Delta F_0$ -2-rev; Spur 2, PCR-Produkt des 3'-flankierenden Bereichs von *atpF* erzeugt mit dem Primerpaar  $\Delta F_0$ -3-for/ $\Delta F_0$ -4-rev; Spur 3, PCR-Produkt des 3'-flankierenden Bereichs von *atpC* erzeugt mit dem Primerpaar  $\Delta F_1F_0$ -3-for/ $\Delta F_1F_0$ -4-rev; S, DNA Längenstandard XIV (ohne Herstellerangabe sagt Längenstandard XIV nicht aus). (B) Analyse der „Crossover“-PCR-Produkte. Spur 1, Fusionsprodukt ( $\Delta F_0$ ) aus dem 5'-flankierenden Bereich von *atpB* und dem 3'-flankierenden Bereich von *atpF* erzeugt mit dem Primerpaar  $\Delta F_0$ -1-for und  $\Delta F_0$ -4-rev; Spur 2, Fusionsprodukt ( $\Delta F_1F_0$ ) aus dem 5'-flankierenden Bereich von *atpB* und dem 3'-flankierenden Bereich von *atpC* erzeugt mit dem Primerpaar  $\Delta F_0$ -1-for/ $\Delta F_1F_0$ -4-rev; S, DNA Längenstandard XIV.

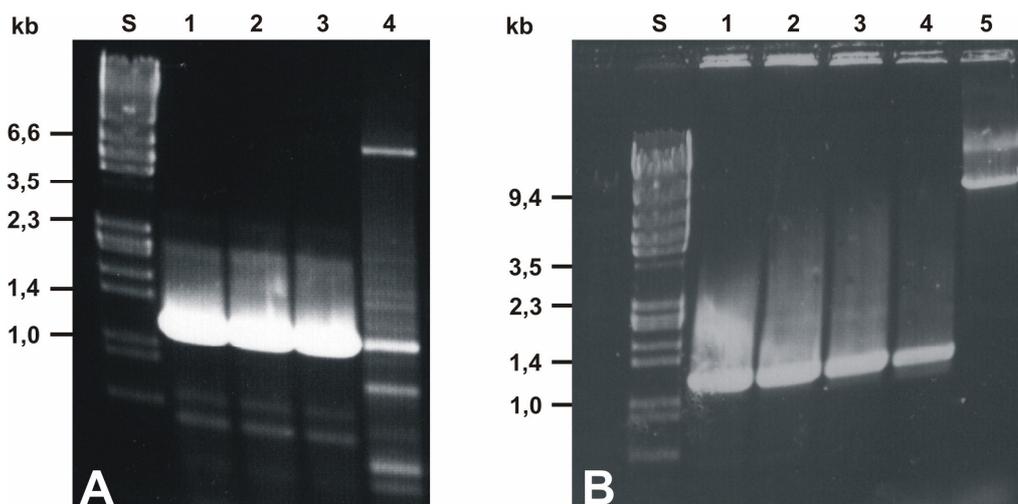
Zur Konstruktion von Deletionsmutanten wurden die Plasmide pK19*mobsacB*- $\Delta F_0$  bzw. pK19*mobsacB*- $\Delta F_1F_0$  mittels Elektroporation in die Stämme 13032 und DM1730 transferiert. Kanamycinresistente Klone, die das Plasmid durch homologe Rekombination ins Genom

integriert haben sollten, wurden zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis auf BHIS-Agarplatten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Klone, die sowohl saccharose-resistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden zunächst durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar  $\Delta F_O$ -1-for/ $\Delta F_O$ -4-rev daraufhin untersucht, ob es sich um die gewünschte Deletionsmutante oder um den Wildtyp handelte. In ausgewählten Klonen des Stammes 13032 $\Delta F_O$  wurde die Deletion weiterhin durch Southern-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 4.20 A). Mit dem DIG-markierten Insert aus pK19*mobsacB*- $\Delta F_O$  (entspricht dem Produkt der Crossover-PCR mit dem Primerpaar  $\Delta F_O$ -1-for/ $\Delta F_O$ -4-rev) als Sonde wurden in *Scal*-verdauter chromosomaler DNA des Wildtyps zwei Fragmente mit 3,2 kb und 3,3 kb detektiert. In der Deletionsmutante wurde dagegen nur ein Fragment von 4,5 kb nachgewiesen, da durch die Deletion der Gene *atpBEF* eine *Scal*-Schnittstelle entfernt worden war. Diese Größen stimmen gut mit den aufgrund der Genomsequenz erwarteten Fragmentgrößen überein, insbesondere entspricht die Differenz aus der Summe der beiden WT Fragmente und dem  $\Delta F_O$ -Fragment mit 2 kb gut dem deletierten Bereich von 1942 bp. Bei den Banden größer 5,1 kb der Abbildung 4.20A handelt es sich vermutlich um unspezifische Hybridisierungen der Sonde mit chromosomaler DNA, da sie sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta F_O$ -Mutante auftreten.



**Abbildung 4.20:** Analyse von *C. glutamicum*- $\Delta F_O$ -Mutanten. (A) Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus 13032 (Spur 6) und fünf Klonen von 13032 $\Delta F_O$  (Spuren 1-5). Die DNA wurde mit *Scal* geschnitten und nach Agarosegelelektrophorese und Blotten mit dem DIG-markierten  $\Delta F_O$ -Insert aus pK19*mobsacB* $\Delta F_O$  hybridisiert. S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard. (B) PCR-Analyse von chromosomaler DNA aus DM1730 (Spur 1) und fünf Klonen von DM1730 $\Delta F_O$  (Spuren 2-6) mit dem Primerpaar  $\Delta F_O$ -for/ $\Delta F_O$ -rev. S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard.

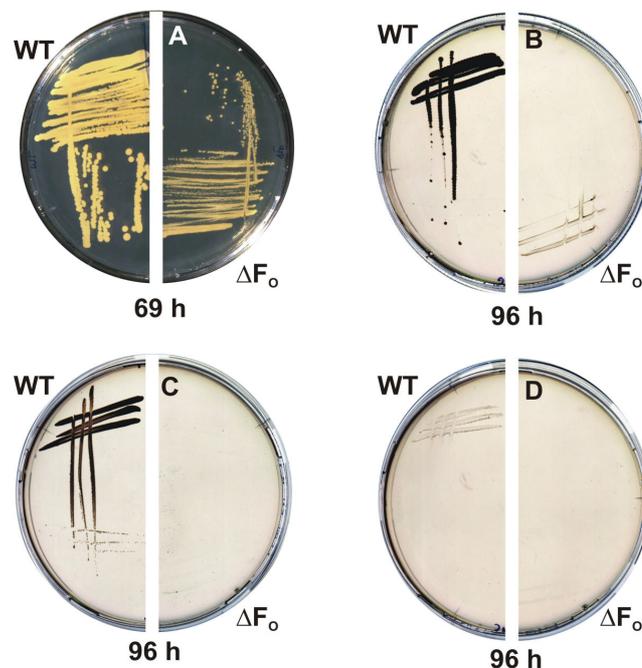
Klone des Stammes DM1730 $\Delta F_O$  wurden zum Nachweis der *atpBEF*-Deletion durch PCR mit chromosomaler DNA und dem Primerpaar  $\Delta F_O$ -for/ $\Delta F_O$ -rev untersucht (Abb. 4.20 B). Die verwendeten Primer binden etwa 40 bp und 90 bp stromaufwärts bzw. stromabwärts der Bereiche, die zur Herstellung des Crossover-PCR-Produktes amplifiziert wurden. In den Deletionsmutanten (Spuren 2-6) wurde erwartungsgemäß nur ein Fragment von etwa 1,4 kb erhalten, dessen Größe gut der theoretisch erwarteten Größe von 1366 bp entspricht. Mit der Wildtyp-DNA (Spur 1) wurde das erwartete Fragment von 3082 bp nicht erhalten, möglicherweise weil die Elongationszeit während der PCR mit 2,5 min zu kurz gewählt wurde. Die Konstruktion der Stämme 13032 $\Delta F_1F_O$  und DM1730 $\Delta F_1F_O$ , bei denen das gesamte *atp*-Operon deletiert ist, erfolgte mit dem Plasmid pK19*mobsacB*- $\Delta F_1F_O$  analog zur Konstruktion der  $F_O$ -Deletionsmutanten. Der Nachweis der erfolgreichen Deletion der *atpBEFHAGDC*-Gene in den o. g. Stämmen erfolgte durch PCR mit chromosomaler DNA und dem Primerpaar  $\Delta F_O$ -for/ $\Delta F_1F_O$ -rev (Abb. 4.21). Für die  $\Delta F_1F_O$ -Mutanten von 13032 (Abb. 4.21 A, Spuren 1-3) und DM1730 (Abb. 4.21 B, Spuren 1-4) wurde ein Fragment von ca. 1,2 kb erhalten, dessen Größe gut mit der theoretisch erwarteten Größe von 1271 bp übereinstimmt. Mit chromosomaler DNA der Parentalstämmen 13032 (Abb. 4.21 A, Spur 4) und DM1730 (Abb. 4.21 B, Spur 5) sollte ein Fragment von 8570 bp erhalten werden. Im Fall von DM1730 stimmt die Größe des erhaltenen PCR-Produkts gut mit der erwarteten Größe überein, im Fall von 13032 gibt es neben kleineren PCR-Produkten auch eines, dessen Größe im Bereich von 8.5 kb liegt. Da für beide Stämme das gleiche Primerpaar eingesetzt wurde, ist die Herkunft der kleineren Banden bei 13032 unklar.



**Abbildung 4.21:** Analyse von *C. glutamicum*- $\Delta F_1F_O$ -Mutanten. (A) PCR-Analyse von chromosomaler DNA aus ATCC 13032 (Spur 4) und ATCC 13032 $\Delta F_1F_O$  (Spuren 1-3) mit den Primern  $\Delta F_O$ -for und  $\Delta F_1F_O$ -rev. S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard. (B) PCR-Analyse von chromosomaler DNA aus DM1730 (Spur 5) und DM1730 $\Delta F_1F_O$  (Spuren 1-4) mit den Primern  $\Delta F_O$ -for und  $\Delta F_1F_O$ -rev. S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard.

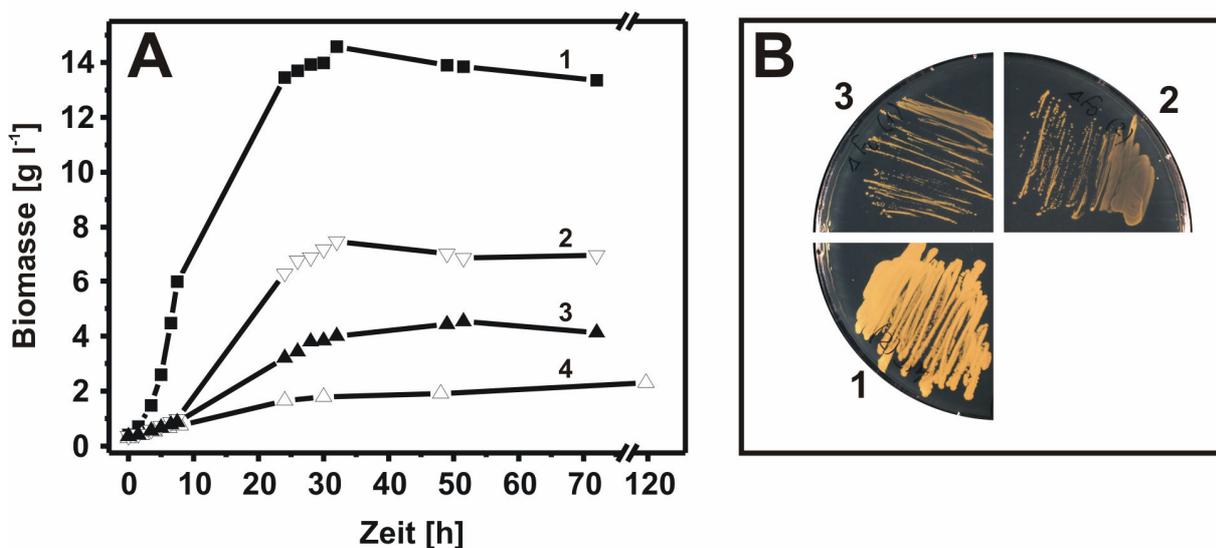
## 2.2 Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 $\Delta F_o$

Zu einer ersten phänotypischen Charakterisierung der Mutante 13032 $\Delta F_o$ , die ATP nur noch über Substratkettenphosphorylierung (SSP), nicht aber über oxidative Phosphorylierung synthetisieren kann, wurde das Wachstum auf Komplex- und Minimalmedium-Agarplatten mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen untersucht. Die Abbildungen 4.22 A und B zeigen, dass die  $\Delta F_o$ -Mutante von 13032 in der Lage ist, sowohl auf Komplexmedium mit 111 mM Glucose als auch auf Minimalmedium mit 50 mM Glucose zu wachsen, allerdings drastisch schlechter als der Wildtyp (insbesondere auf Minimalmedium). Auf Minimalmedium mit 50 mM Acetat als Kohlenstoffquelle zeigt die  $\Delta F_o$ -Mutante dagegen kein Wachstum (Abb. 4.22 C). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da Acetat keine Nettosynthese von ATP über SSP ermöglicht: für die Aktivierung zu Acetyl-CoA mittels Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase wird ein 1 mol ATP/mol Acetat verbraucht, bei der Oxidation von Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus wird ein 1 mol ATP/mol Acetat im Zuge der Umsetzung von Succinyl-CoA zu Succinat gebildet. Da allerdings ein Teil des Acetats auch über den Glyoxylat-Zyklus als anaplerotischer Reaktion verstoffwechselt werden muss und dabei keine ATP-Synthese stattfindet, ist die Netto-Bilanz für ATP-Synthese über SSP sogar negativ. Auf Minimalmedium mit Citrat als Kohlenstoffquelle zeigte die  $\Delta F_o$ -Mutante ebenfalls kein Wachstum (Abb. 4.22 D). Da aber auch der Wildtyp nur sehr schlecht wuchs, ist unklar, ob die  $\Delta F_o$ -Mutante grundsätzlich nicht in der Lage ist, mit Citrat zu wachsen.



**Abbildung 4.22:** Wachstum von *C. glutamicum* 13032 (WT) und 13032 $\Delta F_o$  auf BHI-Vollmedium-Agarplatten mit 2 % (w/v) Glucose nach 69 h (A), auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten mit 50 mM Glucose (B), 50 mM Acetat (C) oder 50 mM Citrat (D) nach 96 h Inkubation. Alle Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

Zur weiteren Charakterisierung wurden der Stamm 13032 und drei unabhängige Kulturen des Stammes 13032 $\Delta F_O$  in CGXII-Flüssigmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert (Abb. 4.23 A). Für die Kultur des Wildtyps wurde eine maximale Wachstumsrate von  $\mu = 0,36 \text{ h}^{-1}$  bestimmt, für die drei Kulturen der  $\Delta F_O$ -Mutante hingegen nur von  $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,09 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,12 \text{ h}^{-1}$ . Auch die maximale Biomassebildung war in den Deletionsstämmen ( $7,5 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $4,6 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $2,1 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ ) deutlich gegenüber der des Wildtyps ( $14,6 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ ) reduziert (Tabelle 4.2). Unabhängig von den Ergebnissen dieser Kultivierung konnten auch in Wiederholungsexperimenten verschiedene Typen der 13032 $\Delta F_O$ -Mutante identifiziert werden.

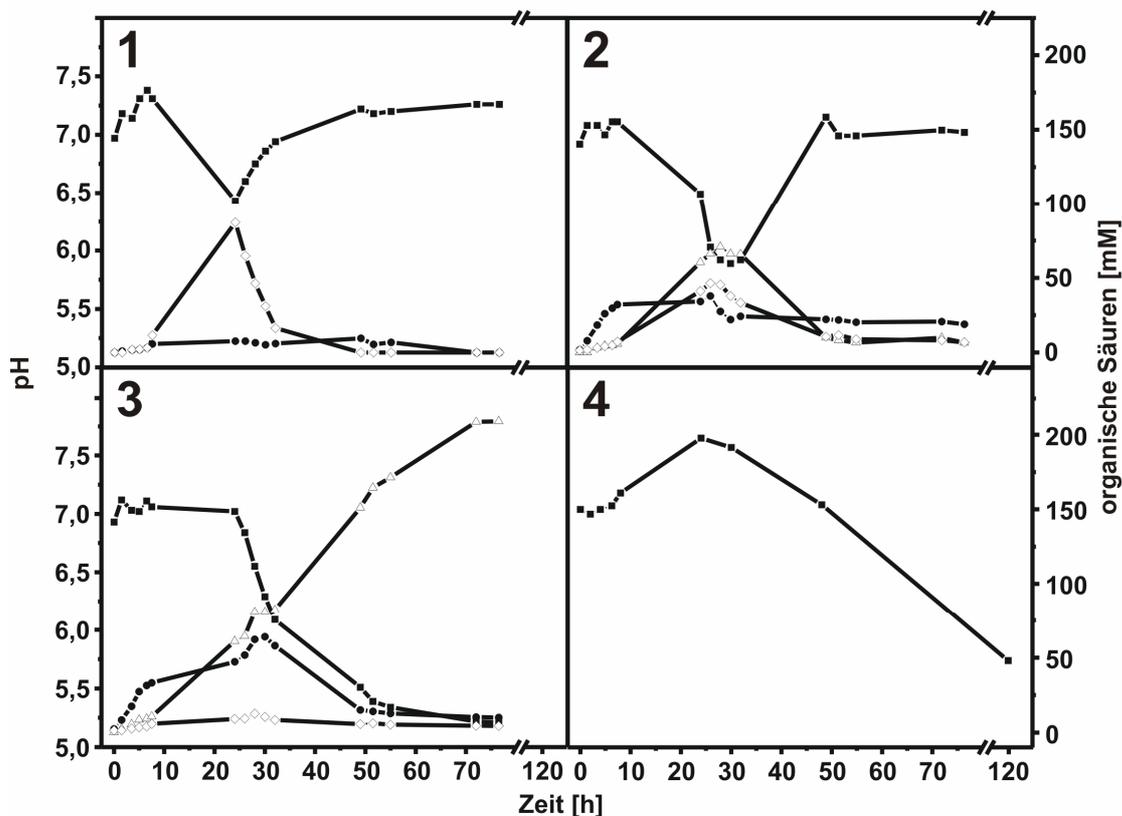


**Abbildung 4.23:** (A) Wachstum der Stämme 13032 (-■-) und 13032 $\Delta F_O$  (-▲-, -△- und -□-) bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Dargestellt sind drei unabhängige Kulturen von 13032 $\Delta F_O$ . (B) Kontrollausstriche von Aliquots der in (A) gezeigten Kulturen  $\Delta F_O$  (2) und  $\Delta F_O$  (3) sowie des Wildtyps (1) am Ende des Wachstums auf BHI-Agarplatten mit 2 % (w/v) Glucose. Die Platten wurden 55 h (13032, Ausstrich 1) bzw. 77 h (13032 $\Delta F_O$ , Ausstriche 2 und 3) bei 30 °C inkubiert.

Um Kontaminationen während der Kultivierung in den Kulturen 13032 $\Delta F_O$  (2) und (3) auszuschliessen, wurden am Ende Aliquots der Kulturen auf BHI/2 % (w/v) Glucose-Agarplatten ausgestrichen (Abb. 4.23 B). Aufgrund des schlechten Wachstums konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Kulturen 2 und 3 um die  $\Delta F_O$ -Mutanten handelte. Um auszuschließen, dass sich durch Deletion der *atpBEF*-Gene die Morphologie der Zellen und dadurch auch die Beziehung zwischen optischer Dichte und Trockengewicht verändert hat, wurde das Trockengewicht von 13032 $\Delta F_O$  nach 6,25 h und 24 h Kultivierung in CGXII-Medium mit 4 % Glucose bestimmt. Die aus dem experimentell bestimmten Trockengewicht von  $0,6 \text{ g l}^{-1}$  bzw.  $1,7 \text{ g l}^{-1}$  und der Beziehung  $\text{OD}_{600} = 1$  entspricht  $0,25 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  (vgl. Abb. 3.1, Material und Methoden) errechneten  $\text{OD}_{600}$ -Werte von 2,4 bzw. 6,8 stimmten gut mit den experimentell bestimmten

OD<sub>600</sub>-Werten von 2,6 und 6,6 überein, so dass die für die  $\Delta F_O$ -Mutante aus der OD<sub>600</sub> berechneten Trockengewichtsangaben korrekt sind.

Parallel zu der Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurden für die in Abb. 4.23 dargestellten Kulturen der pH-Verlauf und die Bildung organischer Säuren verfolgt (Abb. 4.24 und Tabelle 4.2). Hierbei wurde deutlich, dass es im Wildtyp nach einem anfänglichen Anstieg des pH-Wertes auf etwa 7,5 (verursacht durch die Spaltung von Harnstoff mittels Urease) zu einem temporären Abfall auf pH 6,0-6,4 kommt, der mit der Bildung von Pyruvat (10 - 13 mM) und Lactat (83 - 87 mM) korreliert (Abb. 4.24-1 sowie Tabelle 4.2). Typ 1 der  $\Delta F_O$ -Mutanten (Abb. 4.24-2) zeigte einen ähnlichen pH-Verlauf wie der Wildtyp und ebenfalls nur temporär die Bildung von Acetat (71 mM), Pyruvat (38 mM) und Lactat (46 mM). Am Ende der Kultivierung konnten nur noch geringe Mengen dieser organischen Säuren nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4.2). Typ 2 der  $\Delta F_O$ -Mutanten (Abb. 4.24-3) hingegen zeigte mit einem permanenten pH-Abfall auf 5,2 einen deutlichen Unterschied zu den anderen Stämmen. Mit diesem pH-Abfall einher ging die temporäre Bildung von Pyruvat (64 mM) und Lactat (12 mM) sowie die permanente Bildung hoher Konzentrationen (209 mM) Acetat (vgl. Tabelle 4.2). Typ 3 der  $\Delta F_O$ -Mutanten (Abb. 4.24-4) zeigte wie bereits Typ 2 einen permanenten pH-Abfall auf 5,4 (vgl. Tabelle 4.2).



**Abbildung 4.24:** pH-Werte und organische Säuren bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose von ATCC 13032 (1) und ATCC 13032 $\Delta F_O$  (2, 3 und 4). pH-Wert (-■-); Acetat (-△-); Pyruvat(-●-); Lactat(-□-). Die Nummerierung bezieht sich auf die entsprechenden Stämme der Abbildung 4.23 A.

Auffällig ist jedoch der gegenüber der Typ-2- $\Delta F_O$ -Mutante (Abb. 4.24-3) zeitlich stark verzögerte pH-Abfall für den es bisher keine Erklärung gibt. Der Anteil von temporär bzw. permanent gebildeten organischen Säuren wurde in diesem Stamm nicht bestimmt.

Anhand der Abb. 4.23 und 4.24 ist klar zu erkennen, dass es drei unterschiedliche Typen von  $\Delta F_O$ -Mutanten gibt, die im folgenden als Typ I, Typ II und Typ III bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich in erster Linie darin, dass Typ III Acetat nur temporär bildet und dann wieder verstoffwechselt, während Typ II, sowie vermutlich auch Typ I, anscheinend nicht in der Lage ist, Acetat zu verstoffwechseln und kontinuierlich im Medium akkumuliert. Dies führt zu einer permanenten Ansäuerung des Mediums und zu einem Verlust von Kohlenstoff für die Biomasse-Bildung. Beide Faktoren sind vermutlich dafür verantwortlich, dass die Biomassen der Typ I- und Typ II- $\Delta F_O$ -Kultur geringer sind als die der Typ III- $\Delta F_O$ -Kultur.

**Tabelle 4.2:** Wachstumsparameter, pH-Wert am Ende der Kultivierung sowie Konzentration an organischen Säuren im Medium bei Kultivierung von 13032 (Kultur 1) und 13032 $\Delta F_O$  (Kulturen 2, 3 und 4) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Die Nummerierung entspricht den jeweiligen Stämmen der Abbildungen 4.23 A und 4.24

Stamm	Wachstumsrate $\mu$ [ $h^{-1}$ ]	Biomasse <sup>a</sup> [g (TZ) $l^{-1}$ ]	pH <sup>b</sup>	Organische Säuren <sup>c</sup> [mM]			Organische Säuren <sup>d</sup> [mM]		
				Acetat	Pyruvat	Lactat	Acetat	Pyruvat	Lactat
1	0,36	14,6	7,3	-	10	87	-	0	0
2	0,12	7,5	7,0	71	38	46	7	19	7
3	0,09	4,6	5,2	209	64	12	209	10	4
4	0,07	2,1	5,4	n. b. <sup>e</sup>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.

<sup>a</sup> Zur Berechnung der Biomasse wurde ein experimentell bestimmter Faktor von  $0,25 \text{ g} \cdot l^{-1} / OD_{600} = 1$  verwendet. Angegeben ist die maximal gebildete Biomasse

<sup>b</sup> Angegeben ist der pH-Wert am Ende der Kultivierung nach 77 h

<sup>c</sup> Angegeben ist die maximal gebildete Menge organischer Säuren während der Kultivierung

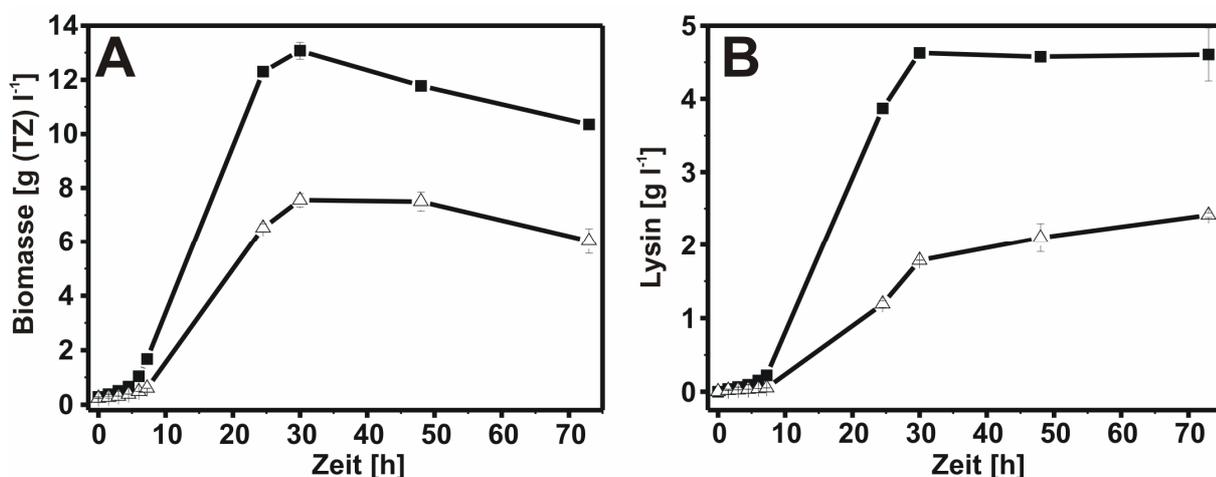
<sup>d</sup> Angegeben ist die Menge organischer Säuren nach 77 h am Ende der Kultivierung

<sup>e</sup> n. b.: nicht bestimmt

### 2.3 Charakterisierung der Mutante DM1730 $\Delta F_O$

Zur Charakterisierung der Mutante DM1730 $\Delta F_O$  hinsichtlich Wachstum und Lysinproduktion wurden die Mutante und der Kontrollstamm DM1730 in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert (Abb. 4.25 A). Wie erwartet zeigte die  $\Delta F_O$ -Mutante mit einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,13 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$  und einer maximalen Biomasse von  $7,6 \pm 0,25 \text{ g (TZ)} \cdot l^{-1}$  ein deutlich reduziertes Wachstum gegenüber dem Stamm DM1730, für den eine Wachstumsrate von 0,24

$\pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  und eine maximale Biomasse von  $13,1 \pm 0,32 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  ermittelt werden konnte. Die von der  $\Delta F_{\text{O}}$ -Mutante erreichte Lysinproduktion war mit  $2,41 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  etwa 50 % geringer als die des Kontrollstammes ( $4,63 \pm 0,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) (Abb. 4.25 B). Im Zuge der Aminosäure-Analyse mittels HPLC (siehe Material und Methoden) konnte im Kulturüberstand der  $\Delta F_{\text{O}}$ -Mutante  $1,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Alanin detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Pyruvat zurückzuführen, das durch eine Transaminase zu L-Alanin umgesetzt wird (Marienhagen *et al.* 2005). Ob das reduzierte Wachstum der  $\text{DM1730}\Delta F_{\text{O}}$ -Mutante möglicherweise wie in  $13032\Delta F_{\text{O}}$ -Mutanten auf die permanente Bildung organischer Säuren zurückzuführen ist, muss in weiteren Experimenten ermittelt werden.

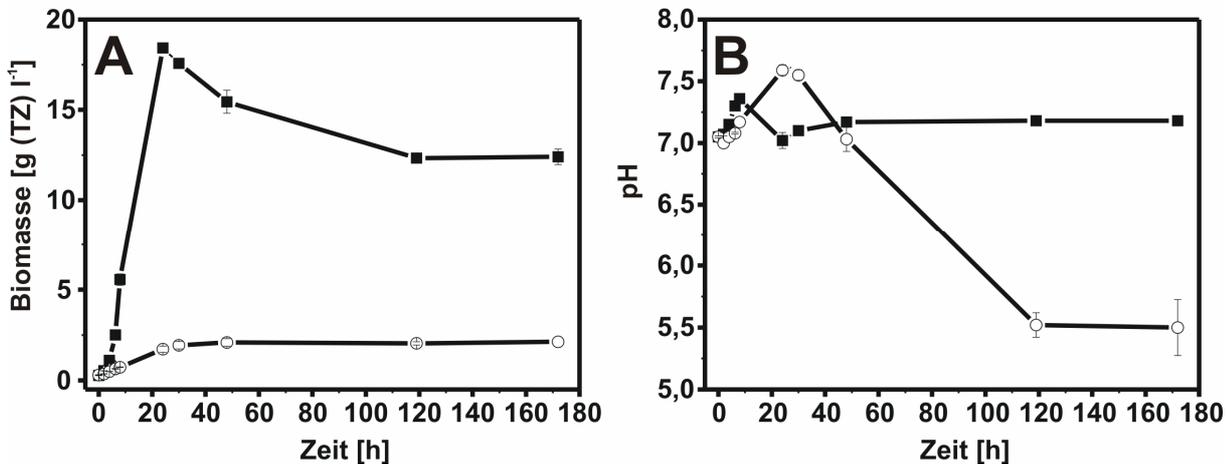


**Abbildung 4.25:** Wachstum (A) und Lysinproduktion (B) von DM1730 (-■-) und DM1730 $\Delta F_{\text{O}}$  (-Δ-) bei aerober Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Kulturen dargestellt.

## 2.4 Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 $\Delta F_1 F_{\text{O}}$

Zu einer ersten phänotypischen Charakterisierung des Stammes  $13032\Delta F_1 F_{\text{O}}$  wurde das Wachstum (Abb. 4.26 A) sowie der pH-Verlauf (Abb. 4.26 B) bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose untersucht. Das Wachstum von  $13032\Delta F_1 F_{\text{O}}$  war mit einer maximalen Wachstumsrate von  $\mu = 0,07 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  und einer maximalen Biomasse von  $2,13 \pm 0 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  deutlich gegenüber dem Wildtyp mit  $\mu = 0,37 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$  und einer maximalen Biomasse von  $18,4 \pm 0,18 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  reduziert. Wie bei den Typen I und II der  $13032\Delta F_{\text{O}}$ -Mutanten war auch für  $13032\Delta F_1 F_{\text{O}}$  war eine starke Ansäuerung des Kulturmediums auf einen pH-Wert von  $5,5 \pm 0,23$  zu beobachten (Abb. 4.26 B), die vermutlich wiederum auf die Akkumulation organischer Säuren zurückzuführen ist. Der Wildtyp zeigte mit einem pH-Wert von  $7,18 \pm 0,01$  am Ende der Kultivierung einen normalen Verlauf. Sowohl die Biomassebildung

als auch der pH-Verlauf des Stammes 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> entsprechen dem Typ I der 13032 $\Delta$ F<sub>0</sub>-Mutanten (vgl. Kapitel IV.2.2.). Auch für die  $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Mutante war ein zeitlich stark verzögerter pH-Abfall, wie er bereits bei dem Typ I der  $\Delta$ F<sub>0</sub>-Mutanten festgestellt wurde, gegenüber dem Typ II der  $\Delta$ F<sub>0</sub>-Mutante zu beobachten (Abb. 4.24 und 4.26).

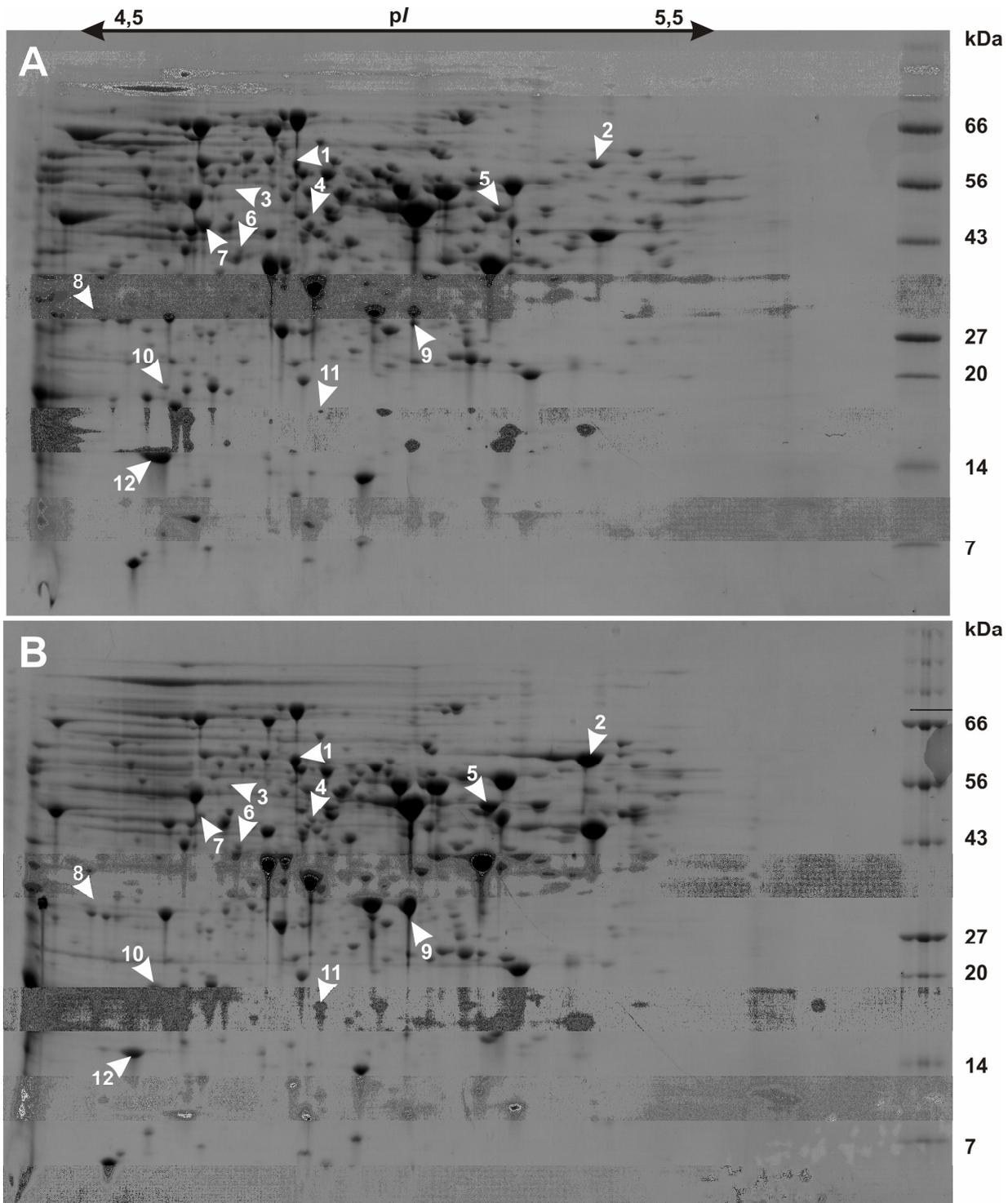


**Abbildung 4.26:** Wachstum (A) und pH-Verlauf (B) der Stämme 13032 (-■-) und 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> (-○-) bei aerober Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Bei den Messwerten von 13032 und 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> handelt es sich den Mittelwert von zwei unabhängigen Kulturen.

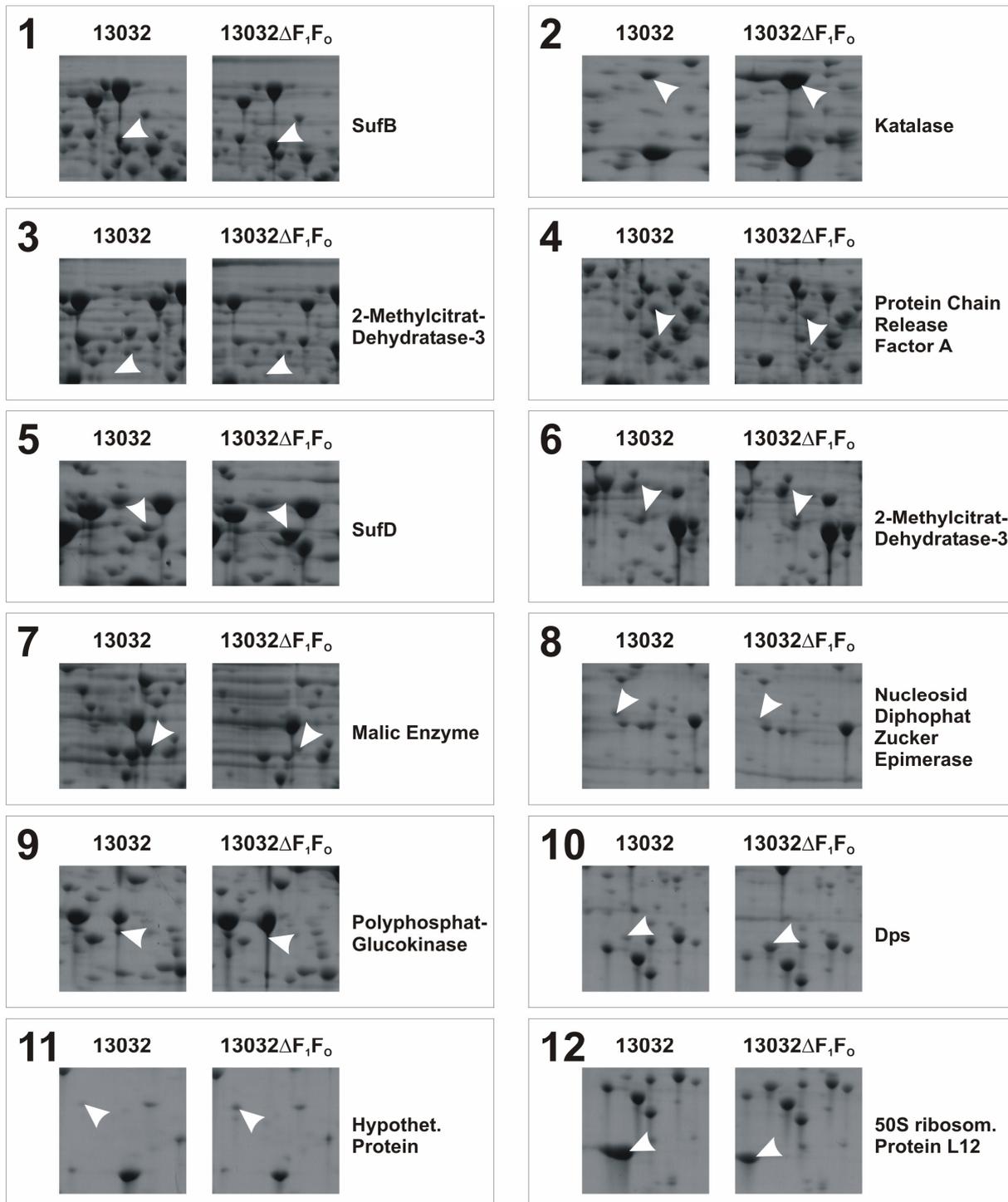
## 2.5 Proteomanalyse von ATCC13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>

Die Deletion des *atp*-Operons und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung stellen einen drastischen Eingriff in den Stoffwechsel von *C. glutamicum* dar. Um zu analysieren, wie sich dieser Eingriff auf das Proteinmuster der Zellen auswirkt, wurden Zellextrakte der Stämme 13032 und 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> durch zweidimensionale Gelelektrophorese miteinander verglichen (Schaffer *et al.* 2001). Die Stämme wurden dazu in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 11 (entspricht 2,75 g (TZ) l<sup>-1</sup>) bei 30 °C kultiviert und im Anschluss der Zellextrakt präpariert (siehe Material und Methoden), von dem je 300  $\mu$ g Protein pro 2D-Gel eingesetzt wurden. Für die isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) wurden pH-Gradienten von 4-7 und von 4,5-5,5 ausgewählt. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse erfolgte in 12-14 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen, anschließend wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie gefärbt. In den Abb. 4.27 und 4.28 sind die Gele für den pH-Bereich 4,5-5,5 dargestellt. Unterschiede im Proteinmuster der beiden Stämme wurden mit Hilfe der Analyse-Software „Proteomweaver“ identifiziert. Hierbei ist zu beachten, dass einige deutliche Intensitätsunterschiede in den Proteinspots von der Analyse-Software offensichtlich nicht erkannt wurden. Proteinspots, deren relative Intensitäten sich in beiden

Stämmen unterschieden, wurden ausgeschnitten und durch Peptidmassen-Fingerprint-Analyse identifiziert. Das Ergebnis dieser Analysen für den pH-Bereich von 4,5-5,5 ist in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Da es sich bei der bisherigen Proteomanalyse um ein Einzelexperiment handelt, müssen die Ergebnisse durch weitere unabhängige Analysen bestätigt werden.



**Abbildung 4.27:** Coomassie-gefärbte 2D-Gele (pH 4,5 - 5,5) von Zellextrakten des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 (A) und der Mutante *C. glutamicum* 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>O</sub> (B). Die Nummern identifizieren Proteinspots mit unterschiedlicher Intensität in den beiden Gelen.



**Abbildung 4.28:** Ausschnitte der in Abb. 4.27 gezeigten 2D-Gele (vgl. Abbildung 4.27) mit den Spots, die unterschiedliche Intensitäten zeigten. Der relevante Spot ist jeweils mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Die Identifizierung ist anhand der Funktion des Proteins angegeben. Die Nummerierung 1 – 12 bezieht sich auf die entsprechende Nummerierung der Abbildung 4.27.

**Tabelle 4.3** Peptidmassen-Fingerprint-Analyse der Proteine, die in den 2D-Gelen (pH 4,5-5,5) von *C. glutamicum* 13032 und 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> unterschiedliche Konzentrationen zeigten. Die Nummerierung bezieht sich auf die Proteinspots in den Abbildungen 4.27 und 4.28. Mit Ausnahme von Nr. 7, 8, 9 und 12 zeigten alle Proteine in der  $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Mutante eine erhöhte Konzentration.

Protein-spot Nr.	Protein (Gen)	NCgl-Nr.	MM <sub>Exper.</sub> [kDa]	pI <sub>Exper.</sub>	Zugeordnete Peptide	Sequenz- abdeckung [%]
1	SufB ( <i>sufB</i> )	1503	53,5	4,85	10	31
2	Katalase ( <i>kataA</i> )	0251	58,4	5,18	22	47
3	2-Methylcitrat- Dehydratase-3 ( <i>prpD3</i> )	2450	49,3	4,77	4	12
4	Protein chain release factor A	1153	39,7	4,78	7	24
5	SufD ( <i>sufD</i> )	1502	42,3	5,15	16	62
6	2-Methylcitrat- Dehydratase-3 ( <i>prpD3</i> )	2450	49,3	4,77	4	12
7	Malat-Enzym ( <i>malE</i> )	2904	40,9	4,74	14	67
8	Mögliche Nucleosid- Diphosphat Zucker Epimerase	1485	23,8	4,55	5	27
9	Polyphosphat- Glucokinase ( <i>ppgK</i> )	1835	26,7	4,97	6	33
10	Dps ( <i>dps</i> )	2897	18,4	4,69	11	73
11	Hypothetisches Protein	1197	23,7	4,37	4	19
12	50 S ribosomales Protein L12	0469	13,3	4,55	3	28

In den 2D-Gelen von pH von 4,5-5,5 ebenso wie in denen von pH 4-7 (nicht gezeigt) fielen vier Proteinspots auf, die in *C. glutamicum* 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> deutlich stärker ausgeprägt waren als im Wildtyp. Sie konnten anhand ihres Peptidmassen-Fingerprints (siehe Tabelle 4.3) als SufB (Spot 1), SufD (Spot 5), Katalase (Spot 2) und Dps-Protein (Spot 10) identifiziert werden. Alle vier Proteine sind alle am Schutz der Zelle vor oxidativem Stress beteiligt. Katalase disproportioniert Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff und verhindert damit die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion. Das Dps-Protein („DNA protection during starvation“) kann durch unspezifische Bindung an DNA und die Oxidation von Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup> und Speicherung von Fe<sup>3+</sup> die DNA vor oxidativer Zerstörung schützen. Die Proteine SufB und SufD sind in *C. glutamicum* vermutlich sowohl für die Bildung als auch für die

Reparatur von FeS-Clustern in Proteinen verantwortlich (Takahashi und Tokumoto 2002; Wennerhold and Bott, 2006). Reparaturen werden insbesondere auch wiederum bei oxidativem Stress notwendig, für den bestimmte FeS-Cluster sehr empfindlich sind.

Vier Proteinspots zeigten eine nur geringfügig erhöhte Intensität in der  $\Delta F_1F_0$ -Mutante. Sie wurden als 2-Methylcitrat-Dehydratase-3 (Spots 3 und 6), Protein chain release factor (Spot 4) und das hypothetische Protein NCgl1197 (Spot 11) identifiziert werden. Einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und oxidativem Stress gibt es bisher nicht.

Im Wildtyp konnten vier Proteinspots mit erhöhter Konzentration im Vergleich zur  $\Delta F_1F_0$ -Mutante als Malat-Enzym (Spot 7), putative Nucleosid-Diphosphat-Zucker-Epimerase (Spot 8), Polyphosphat-Glucokinase (Spot 9) und ribosomales Protein L12 (Spot 12) identifiziert werden.

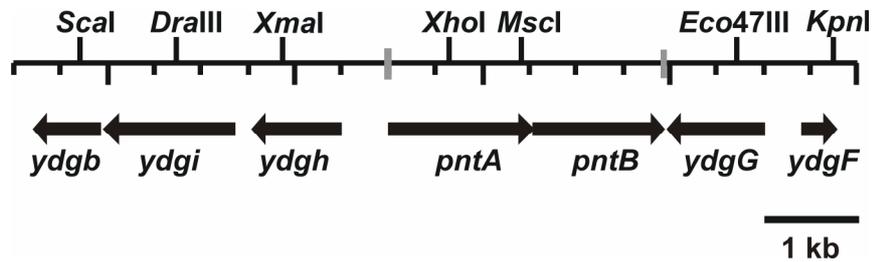
### **3 Einfluss einer heterologen Transhydrogenase auf die Aminosäureproduktion**

#### **3.1 Überproduktion der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB von *E. coli* in *C. glutamicum* DM1730**

##### **3.1.1 Konstruktion eines Stammes zur heterologen Überexpression der *pntAB*-Gene**

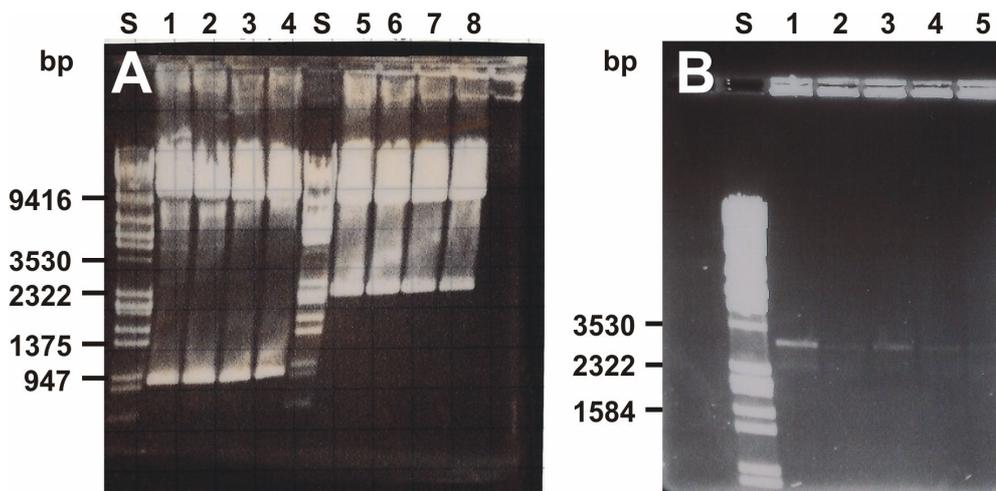
Die Verfügbarkeit von NADPH ist ein wichtiger Faktor bei der Biosynthese von Lysin durch *C. glutamicum*. Das Genom von *C. glutamicum* enthält keine Gene, die signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Transhydrogenase-Genen besitzen, so dass diese Spezies vermutlich keine Transhydrogenaseaktivität besitzt, um NADPH aus NADH zu generieren. Daher sollte die membrangebundene Transhydrogenase PntAB aus *E. coli* heterolog in *C. glutamicum* überproduziert werden. Hierzu wurden die direkt benachbarten Gene *pntA* und *pntB* (Abb. 4.29), die vermutlich ein Operon bilden, ausgehend von chromosomaler DNA aus *E. coli* MG1655 durch PCR mit den Primern *pntAB-for* and *pntAB-rev* inkl. der putativen Ribosomenbindestelle amplifiziert. Das resultierende 2968 bp-Fragment wurde aufgereinigt, über singuläre A-Überhänge zunächst ungerichtet in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert (vgl. Anhang A4, Abb. A3) und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transferiert. Von kanamycinresistenten Klonen wurden Plasmide präpariert und mit PstI/SacI verdaut. Nach Agarosegelelektrophorese wurde das 3-kb-Fragment mit den *pntAB*-Genen mit dem QIAEXII Gel Extraction Kit aufgereinigt, in PstI/SacI-geschnittenen pEKEx2-Vektor ligiert (vgl. Anhang A4, Abb. A6) und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transferiert. Erneut wurden aus kanamycin-resistenten Klonen die Plasmide präpariert und mit

Sall/PstI und Sall/SacI verdaut. Plasmide, die das *pntAB*-Fragment enthalten, sollten dabei Fragmente von 875 bp und 10221 bp (*Sall/PstI*) bzw. 2093 bp und 9003 bp (*Sall/SacI*) liefern.



**Abbildung 4.29:** Physikalische Karte des Genbereichs von *pntAB* in *E. coli* MG1655. Die Bindungsstellen der Primer *pntAB*-for und *pntAB*-rev, die zur Amplifizierung der *pntAB*-Gene verwendet wurden, sind grau markiert. *ydgb*, FixR-Protein; *ydgi*, Arginin/Ornithin-Antiporter; *ydgh*, Protein YDGH Vorläufer; *pntA*, NAD(P) Transhydrogenase  $\alpha$  Untereinheit; *pntB*, NAD(P) Transhydrogenase  $\beta$  Untereinheit; *ydgG*, hypothetisches Membranprotein; *ydgF*, quarternäres Ammoniumkomponenten Resistenzprotein.

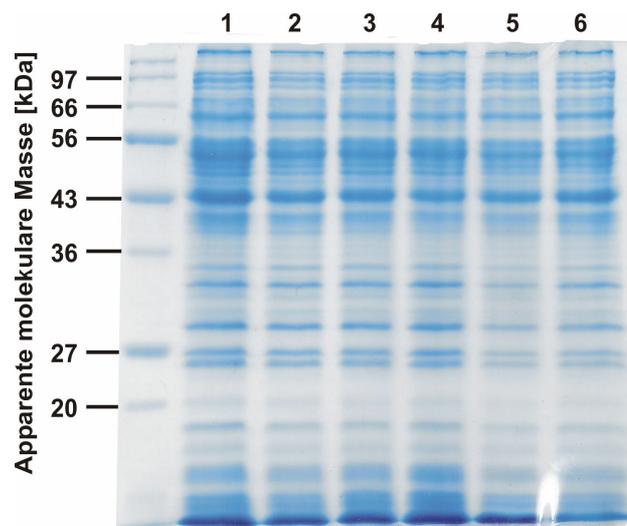
In allen vier analysierten Plasmiden entsprachen die erhaltenen Fragmentgrößen von etwa 0,9 kb und 10 kb (*Sall/PstI*, Spuren 1-4) bzw. etwa 2,1 kb und 9 kb (*Sall/SacI*, Spuren 5-8) den Erwartungen (Abb. 4.30 A). Korrekte Plasmide wurden mittels Elektroporation in *C. glutamicum* DM1730 transferiert und kanamycinresistente Klone durch Kolonie-PCR mit den Primern *pEKEx2*-for und *pEKEx2*-rev auf die Anwesenheit des Plasmids *pEKEx2-pntAB* hin untersucht. Wie erwartet konnte in allen fünf untersuchten Klonen ein Fragment von 3.2 kb erhalten werden (Abb. 4.30 B). Für die weitere Charakterisierung wurde Klon 1 verwendet.



**Abbildung 4.30:** (A) Restriktionsanalyse von *pEKEx2-pntAB*-Plasmiden aus vier Klonen. Die Restriktionsansätze wurden 3 h bei 37 °C inkubiert und über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt. Spuren 1-4: *Sall/PstI*-Verdau; Spuren 5-8: *Sall/SacI*-Verdau; S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard. (B) Kolonie-PCR von fünf DM1730/*pEKEx2-pntAB*-Klonen mit den Primern *pEKEx2*-for und *pEKEx2*-rev; S,  $\lambda$ -DNA Längenstandard.

### 3.1.2 Charakterisierung des *pntAB*-Überexpressionsstammes

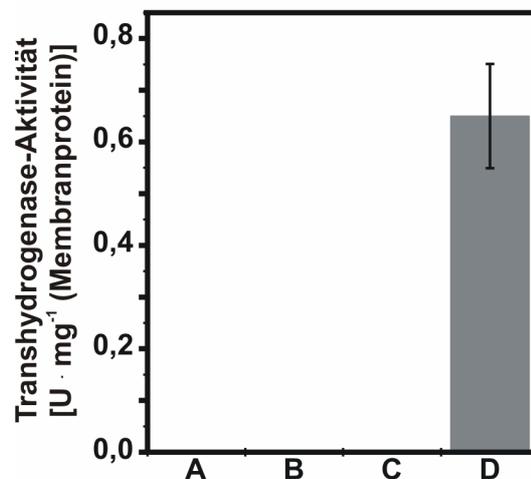
Um zu untersuchen, ob nach Überexpression der *pntAB*-Gene in *C. glutamicum* die entsprechenden Proteine in der Membranproteinfraktion nach Auftrennung in einem SDS-Gel und Coomassie-Färbung nachweisbar sind, wurden die Stämme DM1730, DM1730/pEKEEx2 und DM1730/pEKEEx2-*pntAB* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin sowohl mit als auch ohne IPTG (Endkonzentration 1 mM) kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  etwa 5) geerntet. Die Zellen wurden mittels French-Press aufgeschlossen und Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt. Der zellfreie Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation in lösliche Fraktion und Membranfraktion getrennt und jeweils 40 µg Protein der Membranfraktion wurden 10 min bei 95 °C in SDS-Ladepuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung des Gels (Abb. 4.31) konnten jedoch keine Unterschiede im Proteinmuster der drei Stämme detektiert werden. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten PntAB-Transhydrogenase-Komplexes haben Massen 50 kDa bzw. 47 kDa. Anscheinend ist die Konzentration der Proteine nicht gross genug, um sie mit der gewählten Analysemethode nachweisen zu können.



**Abbildung 4.31:** SDS-PAGE-Analyse der Membranproteine der Stämme DM1730, DM1730/pEKEEx2 und DM1730/pEKEEx2-*pntAB*. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, 25 µg/ml Kanamycin und ggf. 1 mM IPTG bis zu einer  $OD_{600} = 5$  kultiviert, mittels French-Press aufgeschlossen, von Zelltrümmern befreit und durch Ultrazentrifugation in lösliche- und Membranfraktion getrennt. Je 40 µg Protein der Membranfraktionen wurden über ein 12 %iges Trenngel separiert. 1, DM1730; 2, DM1730 + IPTG; 3, DM1730/pEKEEx2; 4, DM1730/pEKEEx2 + IPTG; 5, DM1730/pEKEEx2-*pntAB*; 6, DM1730/pEKEEx2-*pntAB* + IPTG.

Um zu testen, ob bei der heterologen Überexpression der *pntAB*-Gene ein aktiver Transhydrogenase-Komplex gebildet wird, wurde die Transhydrogenase-Aktivität von Membranen bestimmt. Dazu wurden die Stämme DM1730/pEKEEx2 und DM1730/pEKEEx2-*pntAB* in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin sowohl mit als

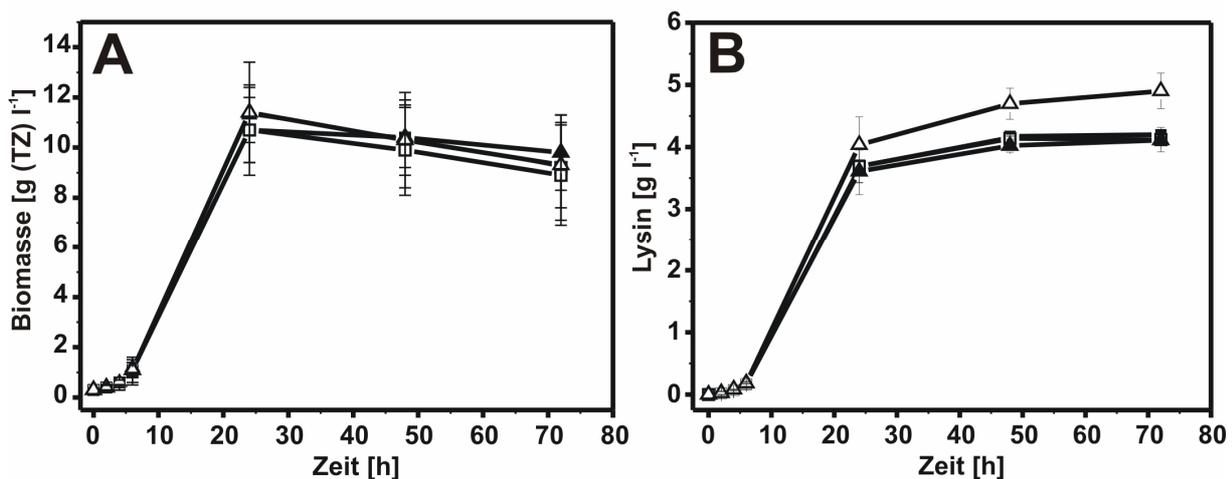
auch ohne IPTG bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 5 kultiviert und Membranen präpariert. Zur Bestimmung der Transhydrogenase-Aktivität wurden zwischen 5 und 20  $\mu\text{g}$  Protein der Membranlösung in den Test eingesetzt. Der Test beruht auf der Umkehrreaktion der *in vivo* Reaktion, also der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  mit NADPH, da im Testansatz die Kopplung der Reaktion an den Protonengradienten fehlt. Anstelle von  $\text{NAD}^+$  wird im Testansatz das Analogon 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid ( $\text{AcPyNAD}^+$ ) verwendet, dessen Absorptions-maximum im Gegensatz zu dem von NADH und NADPH (340 nm) bei 375 nm liegt. Die Reduktion von  $\text{AcPyNAD}^+$  kann also anhand der Absorptionzunahme bei 375 nm verfolgt werden. Wie in Abb. 4.32 dargestellt, zeigten nur für Membranen, die aus dem mit IPTG induzierten Stamm DM1730/pEKEEx2-*pntAB* präpariert wurden, eine messbare Transhydrogenase-Aktivität von  $0,65 \pm 0,1 \text{ U} \cdot \text{mg} (\text{Membranprotein})^{-1}$ . Bei den Membranen des Kontrollstammes DM1730/pEKEEx2 sowie des Stammes DM1730/pEKEEx2-*pntAB*, der ohne IPTG kultiviert worden war, lag die Transhydrogenase-Aktivität unterhalb der Bestimmungsgrenze. Der berechnete Aktivitätswert der induzierten Kultur ( $0,65 \text{ U mg}$ ) ist vergleichbar mit den Werten, die bei Überexpression der *pntAB*-Gene in *Saccharomyces cerevisiae* für Vektoren mit hoher ( $1,51 \text{ U} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ ) und niedriger Kopienzahl ( $0,115 \text{ U} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ ) bestimmt wurden (Anderlund *et al.* 1999).



**Abbildung 4.32:** Spezifische Transhydrogenase-Aktivität von Membranen aus *C. glutamicum* DM1730-Stämmen. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose und 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin kultiviert, die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet ( $OD_{600} \approx 5$ ), aufgeschlossen und Membranen durch Ultrazentrifugation von der löslichen Fraktion abgetrennt. Wenn nötig wurde dem Medium IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt. Der Enzymtest wurde bei 30°C durchgeführt. A, DM1730/pEKEEx2; B, DM1730/pEKEEx2 + IPTG; C, DM1730/pEKEEx2-*pntAB*; D, DM1730/pEKEEx2-*pntAB* + IPTG. Die Werte stellen Mittelwerte von Membranen aus zwei unabhängigen Kultivierungen dar und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

Nachdem gezeigt worden war, dass die Überexpression der *pntAB*-Gene zur Bildung einer aktiven, membrangebundenen Transhydrogenase-Aktivität führt, wurde als nächstes der Einfluss dieser Aktivität auf das Wachstum und insbesondere auf die Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1730 untersucht. Die Kultivierung der Stämme DM1730/pEKEEx2 und

DM1730/pEKEx2-*pntAB* erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin. Wenn nötig, wurde dem Medium zu Beginn der Kultivierung IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Während der Kultivierung wurden der Kultur Aliquots zur OD<sub>600</sub>- und Lysin-Bestimmung entnommen. Bezüglich der Biomassebildung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen festgestellt werden (Abb. 4.33 A). Mit den vorhandenen Messpunkten zeigten sowohl die Wachstumsraten während der exponentiellen Wachstumsphase als auch die maximalen Biomassen der untersuchten Stämme im Mittel nur geringfügige Abweichungen zueinander (vgl. Tabelle 4.4). Bei der Lysinbildung hingegen konnte eine deutliche Erhöhung für den in Gegenwart von IPTG kultivierten Stamm DM1730/pEKEx2-*pntAB* gegenüber den Vergleichstämmen beobachtet werden (Abb. 4.33 B). Die maximale Lysin-Konzentration war mit 4,9 g·l<sup>-1</sup> in diesem Stamm etwa 17 % höher als in den Kontrollstämmen mit nur etwa 4,2 g·l<sup>-1</sup> (vgl. Tabelle 4.4). Dies deutet darauf hin, dass die Synthese eines aktiven Transhydrogenase-Komplexes tatsächlich zur einer verbesserten NADPH-Bereitsstellung und in Folge auch zu einer verbesserten Lysin-Bildung führt.



**Abbildung 4.33:** Wachstum (A) und Lysinbildung (B) von *C. glutamicum* DM1730-Stämmen bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 25 µg/ml Kanamycin. Gegebenenfalls wurde dem Medium IPTG (Endkonzentration 1 mM) zu Beginn der Kultivierung zugesetzt. DM1730/pEKEx2 (-■-); DM1730/pEKEx2 + IPTG (-□-); DM1730/pEKEx2-*pntAB* (-▲-); DM1730/pEKEx2-*pntAB* + IPTG (-Δ-). Die Biomasse wurde aus der optischen Dichte bei 600 nm berechnet. Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 4.4:** Wachstumsraten, maximale Biomasse- und Lysinbildung von *C. glutamicum* DM1730/pEKEEx2 und DM1730/pEKEEx2-*pntAB* bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 50 µg/ml Kanamycin. Die Werte der wurden den in Abb. 4.33 dargestellten Kultivierungen ermittelt und stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Kultivierungen sowie die Standardabweichung dar.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	IPTG	Wachstumsrate $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	Biomasse <sub>max.</sub> [g (TZ)·l <sup>-1</sup> ]	Lysin <sub>max.</sub> [g·l <sup>-1</sup> ]
DM1730/pEKEEx2	-	0,22 ± 0,03	10,7 ± 1,3	4,2 ± 0,08
DM1730/pEKEEx2	+	0,23 ± 0,01	10,7 ± 1,8	4,1 ± 0,20
DM1730/pEKEEx2- <i>pntAB</i>	-	0,25 ± 0,01	11,3 ± 1,1	4,1 ± 0,01
DM1730/pEKEEx2- <i>pntAB</i>	+	0,21 ± 0,01	11,4 ± 2,0	4,9 ± 0,28

## V Diskussion

### 1 Rolle der terminalen Cytochrom *bd* Oxidase für das Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps

Die terminale Cytochrom-*bd*-Oxidase der Atmungskette von *C. glutamicum* ist am Aufbau des elektrochemischen Protonenpotentials über der Cytoplasmamembran beteiligt. Die Effizienz, mit der Protonen auf der Membranaußenseite freigesetzt werden, liegt bei der Cytochrom-*bd*-Oxidase um den Faktor drei niedriger als beim Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex. So werden pro 2 e<sup>-</sup>, die über den Cytochrom-*bc<sub>1</sub>*-Komplex und die Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff übertragen werden, 6 H<sup>+</sup> auf der Membranaußenseite freigesetzt, wohingegen es bei der Cytochrom-*bd*-Oxidase nur 2 H<sup>+</sup> sind. Falls ein signifikanter Anteil des Elektronentransports zu O<sub>2</sub> über die Cytochrom-*bd*-Oxidase verläuft, sollte das Ausschalten dieser terminalen Oxidase dazu führen, dass ausschließlich der Weg über den Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex verwendet wird. Dies sollte zu einer Steigerung des P/O-Quotienten führen und ggf. einen positiven Einfluss auf das Wachstum und auf die Lysin-Produktion haben. Die Deletion der Cytochrom-*bd*-Oxidase führte im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 bei Wachstum auf Komplexmedium-Agarplatten zu keinem signifikanten Wachstumsunterschied (Bott und Niebisch 2005). Bei Kultivierung in Glucose-Minimalmedium zeigte sich in dieser Arbeit, dass die  $\Delta$ *cydAB*-Mutante in der exponentiellen Phase wie der Wildtyp wuchs, aber beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase einen starken Wachstumsdefekt zeigte und nur 58 % der Biomasse des Wildtyps erreichte (Abb. 4.3). Eine Erklärung dafür könnte die Annahme bieten, dass am Ende des exponentiellen Wachstums die Sauerstoffkonzentration im Schüttelkolben so gering ist, dass die niedrig-affine Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase nur noch wenig aktiv ist und der Elektronentransfer zu O<sub>2</sub> größtenteils über die hochaffine Cytochrom-*bd*-Oxidase verläuft. Bei Deletion dieses Enzyms käme daher die Atmung praktisch zum Stillstand und demzufolge auch das Wachstum. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien mit *Mycobacterium smegmatis* (Kana *et al.* 2001). Eine *cydA*-Inaktivierungsmutante von *M. smegmatis* zeigte im Vergleich zum Parentalstamm einen Wachstumsdefekt bei Kultivierung mit 1 % Luftsättigung (ca. 2,5  $\mu$ M O<sub>2</sub>) und praktisch kein Wachstum mehr bei 0,5 % Luftsättigung. Demgegenüber war das Wachstum bei 21 % oder 5 % Luftsättigung nicht beeinträchtigt. Ausserdem konnte mittels einer chromosomalen *cyd-lacZ*-Fusion gezeigt werden, dass die *cyd*-Expression bei Sauerstoffsättigungen zwischen 5 und 0,5 % zwei- bis dreifach induziert wurde (Kana *et al.* 2001). Um die Annahme zu stützen, dass der Wachstumsdefekt der *C. glutamicum*  $\Delta$ *cydAB*-Mutante in der postexponentiellen Phase auf

Sauerstofflimitation zurückzuführen ist, wäre es wünschenswert, diesen Stamm sowie den Wildtyp in einem Fermenter mit einer kontrollierten Sauerstoffversorgung zu kultivieren. Wenn die Annahme stimmt, sollte der Wachstumsdefekt der  $\Delta cydAB$ -Mutante bei ausreichender Sauerstoffversorgung nicht mehr auftreten.

Interessanterweise konnten in *C. glutamicum* trotz des drastischen Effekts einer *cydAB*-Deletion auf das Wachstum in der postexponentiellen Phase spektroskopisch nur sehr geringe Mengen der Cytochrom-*bd*-Oxidase im Wildtyp detektiert werden. Da der Extinktionskoeffizient für Cytochrom *d* ( $\epsilon_{629-650\text{nm}} = 27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Jünemann 1997) deutlich über dem von Cytochrom *a* ( $\epsilon_{600-630\text{nm}} = 11,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Sone und Yanagita 1982) liegt, sollten Wildtyp-Zellen sehr viel geringere Mengen Cytochrom *d* im Vergleich zu Cytochrom *a* besitzen. Wenn aber trotzdem in der postexponentiellen Phase ein großer Teil des Elektronentransports über die Cytochrom-*bd*-Oxidase verläuft, so müsste die Wechselzahl dieses Enzyms deutlich höher sein als die des *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplexes. In Studien mit Cytochrom-*bd*-Oxidase von *E. coli* and *Azotobacter vinelandii* wurden Wechselzahlen von 500 – 1000  $\text{s}^{-1}$  mit Ubichinol-1 als Substrat ermittelt (Jünemann 1997). Eine alternative bzw. ergänzende Erklärung für die geringe Menge an spektroskopisch detektierbarem Cytochrom *d* liefert die Bildung einer *bb'*-Typ-Oxidase, bei der Häm *d* durch ein *b*-Typ-Häm ersetzt wird (Azarkina *et al.* 1999). Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass die Überexpression der *cydABDC*-Gene in *C. glutamicum* zu einer deutlichen Zunahme des Cytochrom-*d*-Peaks bei 630 nm führte.

Die Cytochrom-*bd*-Oxidase von *E. coli* ist ein heterodimerer Enzymkomplex, der sich aus den beiden membranintegralen Untereinheiten I (CydA, 58 kDa) und II (CydB, 43 kDa) zusammensetzt (Miller und Gennis 1983). Die Sauerstoffaffinität der *bd*-Oxidase ( $K_m = 3 - 5 \text{ nm}$ ) aus *E. coli* ist ca. 50-fach höher als die der Cytochrom-*bo'*-Oxidase ( $K_m = 0,2 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Bebbington und Williams 2001) und es konnte gezeigt werden, dass die Transkription der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Gene deutlich ansteigt, wenn Sauerstoff limitierend wird, mit einem Maximum der Transkription bei 2 % Sauerstoffsättigung (Tseng *et al.* 1996). Unter vollständig anaeroben Bedingungen liegt die *cydAB*-Expression zwischen der von mikroaeroben und sauerstoffgesättigten Bedingungen (Govantes *et al.* 2000). Auf transkriptioneller Ebene erfolgt eine Kontrolle der *cydAB*-Genexpression durch das Zweikomponentensystem ArcA/ArcB und den Sauerstoff-sensitiven Transkriptionsregulator Fnr. Hierbei wirkt ArcA als Aktivator der *cydAB*-Expression, wenn Sauerstoff limitierend wird. Nimmt die Sauerstoffsättigung weiter ab wirkt Fnr als Repressor der *cydAB*-Expression. Unklarheit herrscht darüber, ob Fnr als „Anti-Aktivator“ direkt an ArcA bindet und somit die Aktivierung der *cydAB*-Genexpression durch ArcA hemmt oder auf transkriptioneller Ebene die ArcA-Expression reprimiert (Govantes *et al.* 2000). Darüber hinaus wird vermutet, dass es einen weiteren Regulationsmechanismus gibt, da die *cydAB*-Expression in einer  $\Delta arcA$

$\Delta fnr$ -Mutante unter Sauerstofflimitation um das 2-5 fache ansteigt und damit annähernd das Wildtyp-Level erreicht. Um diesen Effekt zu erklären, wird DNA-Supercoiling als weiterer Regulationsmechanismus der *cydAB*-Expression diskutiert (Bebbington und Williams 2001).

Durch transkriptionelle und translationelle *lacZ*-Fusionsstudien in *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Gene sowohl während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase stattfindet als auch bei Kultivierung unter Sauerstofflimitation (Winstedt *et al.* 1998). Die Regulation der Cytochrom-*bd*-Oxidase erfolgt in *B. subtilis* auf Transkriptionsebene durch das Rex-Protein (früher YdiH-Protein), einem AT-reichen DNA-Bindeprotein. Hierbei wirkt Rex als negativer Regulator der *cydABDC*-Genexpression, indem es direkt an die *cydABDC*-Promotorregion bindet (Schau *et al.* 2004). Das Rex-Protein wurde in *Streptomyces coelicolor* als Regulatorprotein des *cydABDC*-Operons identifiziert. Hierbei bindet Rex direkt an die Promotorregion der *cydABDC*-Gene und reprimiert die Expression dieser Gene. Es konnte gezeigt werden, dass die Repressorwirkung von NADH, aber nicht von NAD<sup>+</sup> aufgehoben wird. Unter aeroben Bedingungen ermöglicht das niedrige NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis eine Repression der Zielgene durch Bindung des Rex-Proteins an die entsprechende Promotorregion. Unter mikroaeroben Bedingungen hingegen reduziert sich die Atmung, so dass sich das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis durch weitere Substratoxidation erhöht. Durch das erhöhte NADH-Level verliert Rex die Affinität zur Bindung an DNA und die *cydABDC*-Gene können exprimiert werden. Rex-Homologe konnten in vielen Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Lactococcus lactis* identifiziert werden (Brekasis und Paget 2003; Sickmier *et al.* 2005). In *C. glutamicum* scheint es jedoch kein Rex-Homologes Protein zu geben.

Für *Azotobacter vinelandii* konnte gezeigt werden, dass der Cytochrom-*bd*-Oxidase eine wichtige Bedeutung für das Überleben der Zellen während der stationären Phase zukommt (Edwards *et al.* 2000). Im Gegensatz zur Sauerstoffaffinität der Cytochrom-*bd*-Oxidase von *E. coli* scheint es sich bei der *bd*-Oxidase von *A. vinelandii* um eine niedrig-affine Oxidase zu handeln ( $K_m = 4,5 \mu\text{M}$ ; D'mello *et al.* 1994). Darüber hinaus kommt es, im Gegensatz zu *E. coli*, zu einer verstärkten Bildung der Cytochrom-*bd*-Oxidase mit Zunahme der Sauerstoffkonzentration. Die Regulation der *bd*-Oxidase aus *A. vinelandii* ist bisher nicht vollständig verstanden, aber es konnte ein Protein (CydR) identifiziert werden, das signifikante Ähnlichkeiten zu Fnr-Typ Regulatoren zeigt. Das Ausschalten von CydR führte zu einer Überexpression der *cydAB*-Gene und daher wird vermutet, dass CydR die *cydAB*-Expression reprimiert (Wu *et al.* 1997).

Über die Regulation der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase von *C. glutamicum* ist bisher wenig bekannt. Unter Kupfermangel konnte eine verstärkte Bildung der *bd*-Oxidase gezeigt werden (Kusumoto *et al.* 2000). Da Kupfer ein Cofaktor der Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase

ist, aber nicht der Cytochrom-*bd*-Oxidase, können die Zellen bei Kupfermangel weniger oder gar keine aktive Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase bilden und der *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Weg fällt aus. Ein Zweikomponentensystem ist möglicherweise für die Weiterleitung des unter Kupfermangelbedingungen entstehenden Signals verantwortlich und induziert die Expression der *cydAB*-Gene. Vielleicht wird auch der Kupfermangel direkt als Signal registriert. Erste Hinweise darauf, dass die Expression der *cydAB*-Gene durch transkriptionelle Regulation über ein Zweikomponentensystem reguliert wird, lieferten Untersuchungen eines *C. glutamicum*-Stammes, in dem das Zweikomponentensystem CgtRS9 deletiert ist. In diesem Stamm konnte eine erhöhte Expression der Gene *cydB*, *cydC* und *cydD* festgestellt werden (M. Brocker, unveröffentlicht). Detaillierte Untersuchungen zur Regulation der *cydABDC*-Expression in *C. glutamicum* durch Sauerstoff, Kupfer oder den Redoxzustand des NAD<sup>+</sup>/NADH-Paares wären daher zweifelsohne wünschenswert.

Die Überexpression der *cydABDC*-Gene in *C. glutamicum* ATCC 13032 führte zu deutlich erhöhten Häm *b*- und *d*-Maxima im Differenzspektrum, zu einer um 26 % erhöhten Atmungsrate von Stationärphase-Zellen ( $72 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TZ})^{-1}$  vs.  $57 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TZ})^{-1}$ ), einer um 45 % reduzierten Wachstumsrate in der exponentiellen Phase ( $0,18 \text{ h}^{-1}$  vs.  $0,33 \text{ h}^{-1}$ ), sowie einer um 35 % reduzierten Biomasse ( $11,2 \text{ g TZ l}^{-1}$  vs.  $17,3 \text{ g TZ l}^{-1}$ ). Diese Befunde zeigen, dass die *cydABDC*-Überexpression zur Überproduktion einer aktiven Cytochrom-*bd*-Oxidase führte und dies einen negativen Einfluss auf das Wachstum hatte. Dieser negative Einfluss kann damit erklärt werden, dass im Stamm 13032/pEKEx2-*cydABDC* ein größerer Anteil des Elektronentransports zu Sauerstoff über diese terminale Oxidase verläuft und aufgrund ihrer schlechteren Effizienz beim Aufbau des elektrochemischen Protonenpotentials im Vergleich zum *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex die ATP-Ausbeute pro Glucose sinkt. Daher muss deutlich mehr Glucose zur Energiegewinnung aufgewendet werden als im Wildtyp. Eine Bilanzierung (vgl. auch Tabelle 5.1) zeigt, dass beim Stamm 13032/pEKEx2 43 % der verbrauchten Glucose zur Bildung von Biomasse verwendet wird (unter der Annahme, dass 40 % des Trockengewichts aus Kohlenstoff besteht; Liebl 2005) und dementsprechend 57 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel aufgewendet werden. Beim *bd*-Oxidase-Überproduzenten 13032/pEKEx2-*cydABDC* wird dagegen nur 28 % der verbrauchten Glucose zur Biomassebildung verwendet und der Rest von 72 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Daraus lässt sich ableiten, dass 13032/pEKEx2 pro mol C in Biomasse 1,3 mol C katabolisiert, während 13032/pEKEx2-*cydABDC* pro mol C in Biomasse 2,6 mol C katabolisiert. Unter der Annahme, dass beide Stämme 10 g TZ/mol ATP bilden können (ein für das Wachstum auf Glucose üblicher  $Y_{\text{ATP}}$ -Wert), bildet 13032/pEKEx2 13,7 mol ATP/mol Glucose, 13032/pEKEx2-*cydABDC* dagegen nur 7 mol ATP/mol Glucose (der ATP-Verbrauch für den

Erhaltungsstoffwechsel wurde dabei nicht berücksichtigt). Unter der Annahme, dass der Glucose-Katabolismus ausschließlich über Glykolyse, Citrat-Zyklus und den Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Weg der Atmungskette erfolgt, können theoretisch zwischen 21,0 und 26,7 mol ATP/mol Glucose gebildet, je nachdem, ob für die Synthese von einem mol ATP durch die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase drei oder vier mol Protonen in die Zelle transportiert werden müssen. Wird anstelle des *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Weges die Cytochrom-*bd*-Oxidase verwendet, sinkt der Wert auf 9 – 10,7 mol ATP/mol Glucose (Bott und Niebisch 2003). Für die Differenz zwischen den theoretischen Maximalwerten und dem experimentell abgeschätzten Wert von 13,7 für 13032/pEKEx2 gibt es mehrere mögliche Erklärungen: (i) der Elektronentransport zu Sauerstoff erfolgt zum Teil über die Cytochrom-*bd*-Oxidase, (ii) die Verstoffwechslung von Glucose über den oxidativen Pentosephosphat-Weg, (iii) „futile cycles“ im Stoffwechsel, z.B. Pyruvat-Carboxylase/PEP-Carboxykinase, oder (iv) eine Kombination dieser Faktoren.

**Tabelle 5.1:** Bilanzierung zur Berechnung der pro gebildeter Biomasseeinheit benötigten Glucosemenge sowie zur Berechnung der ATP-Ausbeute. Zur Berechnung wurde 1 g (TZ) = 400 mg C = 33,3 mmol C angenommen. Darüber hinaus wurde der Kohlenstoff, der nicht in der Biomasse wieder gefunden wurde, als CO<sub>2</sub> angenommen.

Stamm	C <sub>(verbraucht)</sub>	C <sub>(Biomasse)</sub>	C <sub>(CO<sub>2</sub>)</sub>	C <sub>(CO<sub>2</sub>)/C<sub>(Biomasse)</sub></sub> <sup>1</sup>	Ausbeute <sup>2</sup>
(ATCC13032)	[mmol] / [%]	[mmol] / [%]	[mmol] / [%]		
pEKEx2	1332 / 100	577 / 43	755 / 57	1,3	13,7
pEKEx2- <i>cydABDC</i>	1332 / 100	373 / 28	959 / 72	2,6	7

<sup>1</sup> Der Quotient gibt an welche Menge [mmol] C<sub>(Glucose)</sub> katabolisiert wird um 1 mmol C<sub>(Biomasse)</sub> zu bilden

<sup>2</sup> Die Ausbeute ist angegeben als gebildete Menge ATP [mol] pro mol Glucose

## 2 Rolle der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase für das Wachstum und die Lysinproduktion von *C. glutamicum* Stämmen

Im Unterschied zur  $\Delta$ *cydAB*-Mutante des Wildtyps 13032 führte die *cydAB*-Deletion in den Lysinproduktionsstämmen MH20-22B und DM1730 nicht zu einem drastischen Wachstumsdefekt in der postexponentiellen Phase. Vielmehr gab es nur geringfügige Abweichungen vom jeweiligen Parentalstamm, bei DM1730 sogar eine etwas höhere maximale Biomasse (Abb. 4.5 A, B und 4.8 A). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die geringere Biomasse sein, die von Lysinproduktionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp gebildet wird, so dass es durch die geringere Zelldichte zu keiner Sauerstofflimitierung (siehe Diskussion oben) kommt. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass auch in den Lysinproduktionsstämmen ein Teil des Elektronentransportes in der Atmungskette über die

Cytochrom-*bd*-Oxidase verläuft. Für MH20-22B konnte gezeigt werden, dass hier die Expression der *cydAB*-Gene schon während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt und spektroskopisch sind signifikante Mengen der *bd*-Oxidase detektierbar (Abb. 4.6). Möglicherweise gilt dies auch für DM1730, obwohl während der stationären Phase nur geringe Mengen der Cytochrom-*bd*-Oxidase spektroskopisch nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.9). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass der ATP-Bedarf für die Lysinbiosynthese weitaus geringer ist als der für die Biomasse-Bildung. Die Lysinbildung war sowohl in MH20-22B $\Delta$ *cydAB* als auch in DM1730 $\Delta$ *cydAB* gegenüber den Parentalstämmen um ca. 10 % gesteigert (Abb. 4.5 C, D und 4.8 B). Die Ursache dafür wird in einem erhöhten P/O-Quotienten in Abwesenheit der Cytochrom-*bd*-Oxidase gesehen, der es erlaubt, weniger Glucose für den Katabolismus einzusetzen und die eingesparte Glucose für die Lysin-Synthese zu nutzen. In dem in Abb. 4.5 dargestellten Experiment werden bei MH20-22B 10 % der verbrauchten Glucose für Biomassebildung verwendet, 25 % für Lysinbildung, und der Rest von 65 % für Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Bei MH20-22B $\Delta$ *cydAB* werden ebenfalls 10 % der verbrauchten Glucose für Biomassebildung verwendet, aber 27,5 % für Lysinbildung und 62,5 % für Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Bei DM1730 (Abb. 4.8) werden von der verbrauchten Glucose 32,5 % für Biomasse, 15 % für Lysin und 52,5 % für Energie- und Erhaltungsstoffwechsel aufgewendet, bei DM1730 $\Delta$ *cydAB* sind es 35 % für Biomasse, 16,3 % für Lysin und 48,7 % für Energie- und Erhaltungsstoffwechsel.

Die Überproduktion der Cytochrom-*bd*-Oxidase hatte in allen untersuchten Lysinproduzenten einen negativen Effekt auf das Wachstum, allerdings war er weniger stark ausgeprägt als beim Wildtyp. Die maximale Wachstumsrate war um ca. 10 % reduziert (Wildtyp ca. 50 %), die maximale Biomasse zwischen 16 und 19 % (Wildtyp 35 %). Dies bestätigt einerseits die Annahme eines reduzierten P/O-Quotienten im Überproduzenten und zeigt andererseits, dass das Wachstum der Lysinproduzenten nicht so stark abhängig ist von der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wie das Wachstum des Wildtyps. Ursache dafür könnte die reduzierte Wachstumsrate sein. Im Gegensatz zum Wachstum war der Einfluss der Cytochrom-*bd*-Oxidase-Überproduktion auf die Lysin-Bildung in den drei untersuchten Stämmen uneinheitlich: in MH20-22B war die Lysin-Synthese reduziert, in DM1730 leicht erhöht und in DM1800 unverändert. Eine zufrieden stellende Erklärung dafür gibt es nicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 unter den getesteten Bedingungen eine wichtige Bedeutung für das Wachstum hat. Es muss aber noch gezeigt werden, ob diese Bedeutung auf sauerstofflimitierenden Versuchsbedingungen und der hohen Sauerstoff-Affinität der *bd*-

Oxidase beruht. In den untersuchten Lysinproduktionsstämmen hatte die Deletion der *bd*-Oxidase einen positiven Einfluss auf die Lysinbildung, und zwar aufgrund eines reduzierten Glucose-Bedarfs für Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Eine Steigerung der Produktausbeute durch „Optimierung“ der Atmungskettenzusammensetzung wurde bereits erfolgreich in einem Riboflavin-produzierenden *B. subtilis*-Stamm durchgeführt (Zamboni *et al.* 2003). Dabei führte die Deletion der Cytochrom-*bd*-Oxidase zu einem um 40 % reduzierten Glucosebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel, was in einer Steigerung der Riboflavinausbeute um 30 % resultierte.

### **3 Einfluss einer F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase-Deletion auf das Wachstum von *C. glutamicum***

Die Deletion der *atpBEF*- bzw. *atpBEFHAGDC*-Gene, die den membrangebundenen F<sub>0</sub>-Teil bzw. die vollständige F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase kodieren, führte im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 erwartungsgemäß zu einem drastischen Wachstumsdefekt, da die entsprechenden Mutanten ATP nur noch über Substratstufenphosphorylierung bilden können. Während Glucose als C-Quelle noch Netto-ATP-Synthese und damit Wachstum erlaubte, gab es mit Acetat als C-Quelle erwartungsgemäß kein Wachstum, da dieses Substrat keine Netto-ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung ermöglicht.

In Flüssigkultur bildete die  $\Delta F_0$ -Mutante drei unterschiedliche Typen, die sich deutlich hinsichtlich ihrer Wachstumsraten ( $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$  Typ I,  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$  Typ II und  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  Typ III) und darüber hinaus auch in der maximal gebildeten Biomasse ( $2,1 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  bei Typ I,  $4,6 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  bei Typ II und  $7,5 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$  bei Typ III) voneinander unterschieden. Der Wildtyp zeigte im Vergleich eine Wachstumsrate von  $0,36 \text{ h}^{-1}$  und eine maximale Biomasse von  $14,6 \text{ g (TZ)} \cdot \text{l}^{-1}$ . Daraus ergibt sich eine maximale Abweichung zwischen Mutante ( $\Delta F_0$ -Typ I) und dem Wildtyp von 80 % für die Wachstumsraten und von 86 % für die maximal gebildeten Biomassen. Dieser drastische Wachstumsunterschied zwischen Mutanten und Wildtyp kann damit erklärt werden, dass die Mutanten nur 4 mol ATP/mol Glucose über Substratstufenphosphorylierung bilden können, wohingegen der Wildtyp zusätzlich bis zu 23 mol ATP/mol Glucose durch oxidative Phosphorylierung bilden kann (Bott und Niebisch 2003). Dadurch steht dem Wildtyp deutlich mehr ATP pro mol Glucose zur Biomassebildung zur Verfügung als den Mutanten. Eine Bilanzierung zeigt, dass beim Wildtyp 36,5 % (Werte von 45 % sind üblich) der verbrauchten Glucose zur Bildung von Biomasse verwendet wird (Annahme: 40 % des Trockengewichts bestehen aus Kohlenstoff; Liebl 2005). Dementsprechend werden 63,5 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel

aufgewendet. Mit einer Ausbeute von 10 g (TZ)/mol ATP (vgl. Diskussion V.1) bildet der Wildtyp 10,4 mol ATP/mol Glucose. Der Typ I der  $\Delta F_O$ -Mutanten verwendet 5 % der verbrauchten Glucose für die Biomassebildung und 95 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Mit einer Ausbeute von 4 mol ATP/mol Glucose über Substratstufenphosphorylierung und 10 g (TZ)/mol ATP sollte eine maximale Biomasse von etwa 8,4 g (TZ)·l<sup>-1</sup> gebildet werden können. Tatsächlich werden aber nur 2,1 g (TZ)·l<sup>-1</sup> gebildet. Daraus lässt sich ableiten, dass 75 % der maximal gebildeten ATP-Menge nicht für die Biosynthese genutzt werden. Typ II der  $\Delta F_O$ -Mutanten verwendet 11,5 % der verbrauchten Glucose für die Biomassebildung und 88,5 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Bei einer Ausbeute von 4 mol ATP/mol Glucose über Substratstufenphosphorylierung und 10 g (TZ)/mol ATP sollte die Bildung von etwa 7,9 g (TZ)·l<sup>-1</sup> möglich sein. Tatsächlich werden 4,6 g (TZ)·l<sup>-1</sup> gebildet. In diesem Fall werden 40 % der maximal gebildeten ATP-Menge nicht für die Biosynthese genutzt. Der Typ III der  $\Delta F_O$ -Mutanten verwendet 19 % der verbrauchten Glucose für die Biomassebildung, und 81 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Insgesamt sollte damit eine maximale Biomassebildung von etwa 7,2 g (TZ)·l<sup>-1</sup> möglich sein. Tatsächlich werden 7,5 g (TZ)·l<sup>-1</sup> gebildet. Somit wird die maximal gebildete ATP-Menge vollständig zur Biosynthese verwendet.

Die  $\Delta F_1F_O$ -Mutante verwendete 5,5 % der verbrauchten Glucose für die Biomassebildung, 30 % für die Bildung von Acetat (wurde experimentell nicht gezeigt; wird aufgrund des pH-Abfalls angenommen) und 64,5 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Damit sollte eine maximale Biomassebildung von 8,4 g (TZ)·l<sup>-1</sup> möglich sein. Da tatsächlich nur 2,2 g (TZ) l<sup>-1</sup> gebildet werden, werden 75 % der maximal gebildeten ATP-Menge nicht für die Biosynthese genutzt. Die  $\Delta F_1F_O$ -Mutante verhält sich somit wie der Typ I der  $\Delta F_O$ -Mutanten. Der zum Vergleich kultivierte Wildtyp verwendet 46 % der verbrauchten Glucose für die Biomassebildung und 54 % für den Energie- und Erhaltungsstoffwechsel. Die ATP-Ausbeute liegt hier bei 15 mol ATP/mol Glucose.

Für die Abweichungen der experimentell abgeschätzten ATP-Ausbeuten (Minimalwerte) der Wildtypstämme zu den theoretisch maximal möglichen Werten von 21,0 und 26,7 mol ATP/mol Glucose (vgl. Diskussion V.1) können wiederum folgende Faktoren verantwortlich sein: (i) ein Teil des Elektronentransportes zu Sauerstoff erfolgt über die Cytochrom-*bd*-Oxidase, (ii) die Verstoffwechslung von Glucose erfolgt zum Teil über den oxidativen Pentosephosphat-Weg, (iii) „futile cycles“ im Stoffwechsel oder (iv) eine Kombination dieser Faktoren. Für die drastischen Abweichungen von den experimentell bestimmten Biomassen der  $\Delta F_O$ -Typen I und II sowie der  $\Delta F_1F_O$ -Mutante zu den theoretisch maximal möglichen können die o. a. Faktoren (ii), (iii) und (iv) verantwortlich sein. Für den  $\Delta F_O$ -Typ III stimmen experimentell bestimmte und maximal mögliche Biomasse gut überein.

Interessant bleibt die Frage, warum es unterschiedliche Typen der  $\Delta F_O$ -Mutante gibt. Die Tatsache, dass die  $\Delta F_1 F_O$ -Mutante weniger Biomasse bildet als die Typen II und III und gleich viel wie der Typ I der  $F_O$ -Mutanten spricht gegen eine mögliche ATPase-Aktivität des  $F_1$ -Teils in diesen Stämmen. Ob die  $F_1$ -Untereinheiten in den  $\Delta F_O$ -Mutanten überhaupt gebildet werden, muss zunächst noch durch Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Untereinheiten des  $F_1$ -Teils gezeigt werden. Es ist daher zu vermuten, dass es im Verlaufe der Kultivierung zu Mutationen kommt, die dazu führen, dass die Typ II und III  $F_O$ -Mutanten das gebildete ATP effizienter für die Biomassebildung nutzen können. Dies könnten Mutationen sein, die den Kohlenstofffluss über den oxidativen Pentosephosphat-Weg reduzieren, die ATP-Hydrolyse durch einen „futile cycle“ verringern oder eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bisher drei unterschiedliche Typen der  $\Delta F_O$ -Mutante und ein Typ der  $\Delta F_1 F_O$ -Mutante beobachtet werden konnten, die sich deutlich in ihren maximalen Wachstumsraten und maximal gebildeten Biomassen voneinander unterscheiden, aber darüber hinaus signifikant zur Wachstumsrate und Biomasse des Wildtyps reduziert sind. Untersuchungen zeigten einen deutlichen Unterschied im pH-Wert des Kulturmediums zwischen den Typen I und II der  $\Delta F_O$ -Mutante und der  $\Delta F_1 F_O$ -Mutante im Vergleich zum Typ III der  $\Delta F_O$ -Mutante und dem Wildtyp. So zeigen die Typen I und II sowie die  $\Delta F_1 F_O$ -Mutante eine permanente Ansäuerung des Kulturmediums auf einen pH-Wert von etwa 5 - 5,5, wohingegen Typ III einen ähnlichen pH-Verlauf wie der Wildtyp zeigte. Bei der Bestimmung von organischen Säuren konnten im Typ II hohe Konzentrationen von Acetat (209 mM) im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Da der pH-Verlauf des Typs I und der  $\Delta F_1 F_O$ -Mutante einen ähnlich starken pH-Abfall auf etwa 5,5 wie der Typ II zeigte, ist zu vermuten, dass auch diese Mutanten große Mengen organischer Säuren bilden.

Möglicherweise kommt es durch die ATP-Synthase-Deletion zu einem erhöhten Kohlenstofffluss durch die Glycolyse. In *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass es durch ATP-Mangel, hervorgerufen durch eine Erhöhung der ATPase-Aktivität durch Überexpression von Genen des  $F_1$ -Teils der  $F_1 F_O$ -ATP-Synthase, zu einem erhöhten Glykolysefluss kommt (Koebmann *et al.* 2002). Offenbar wird bei erhöhtem Glykolysefluss dann aber der Fluss durch den Citrat-Zyklus in *C. glutamicum* limitierend, so dass es zur Ausscheidung von Acetat kommt. Dies wird durch die Ergebnisse einer *C. glutamicum* ATCC 14067-Mutante gestützt, die durch eine Punktmutation in der  $\gamma$ -Untereinheit der  $F_1 F_O$ -ATP-Synthase eine auf 25 % reduzierte ATP-Synthase-Aktivität besitzt, wodurch es zu einem um 70 % erhöhten Glucoseverbrauch, einer Verdopplung der Atmungsrate und zur Bildung von Pyruvat kommt (Sekine *et al.* 2001). Auf die ATP-Bildung durch Substratstufenphosphorylierung hat die Ausscheidung von Acetat keinen Einfluss. Der Anteil an Acetyl-CoA, der nicht in den Citrat-Zyklus eintritt, in dem ein mol ATP/mol Acetyl-CoA bei der

Succinyl-CoA-Synthetase-Reaktion gebildet wird, wird durch die Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase zu Acetat umgesetzt, wobei ebenfalls ein mol ATP/mol Acetyl-CoA gebildet wird.

Die Deletion des *atp*-Operons in *E. coli* führte zu einer um 21 % reduzierten Wachstumsrate und einer Verringerung der maximal gebildeten Biomasse um 42 %. Die Atmungsrate in dem Deletionsstamm war um etwa 40 % und die Menge an gebildetem *b* Typ-Cytochrom um etwa 80 % gegenüber dem Vergleichsstamm erhöht. Darüber hinaus konnte ein Anstieg in der Glucoseverbrauchsrate, eine Verdopplung des Kohlenstoffflusses durch die Glykolyse, ein erhöhter Fluss durch den Citrat-Zyklus sowie eine Erhöhung der Acetat-Produktion in der Mutante festgestellt werden. Die nur um 58 % höhere Biomasse des Wildtyp-Stammes kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass ATP-Hydrolyse durch einen „futile cycle“ zu einer Reduktion der maximal möglichen Biomasse führt. Die Reoxidation der erhöhten NADH-Mengen, die aus dem verstärkten Kohlenstofffluss durch die Glykolyse und den Citrat-Zyklus resultieren, erfolgt durch eine Erhöhung der Atmungsrate und die gesteigerte Bildung von Enzymen der Atmungskette (erhöhter Cytochrom-*b* Level). Die um den Faktor 1,8 erhöhte Bildung von Acetat und der verstärkte Kohlenstofffluss durch den Citrat-Zyklus in der *atp*-Deletionsmutante deuten auf eine „Optimierung“ der ATP-Bildung hin, insofern, dass die Bildung von Lactat, die zu einer Reduzierung der maximal möglichen ATP-Menge führen würde und möglicherweise im Wildtyp erfolgt, durch Änderung des Kohlenstoffflusses umgangen wird. Die Wachstumsrate und maximale Biomassebildung einer *atpB*-Deletionsmutante war auf 57 % bzw. 45 % des Wildtyp-Levels reduziert, wohingegen die Atmungsrate um 41 % erhöht war. Die nochmals reduzierte Wachstumsrate und Biomassebildung dieser Mutante im Vergleich zu der *atpIBEFHAGDC*-Deletionsmutante wird durch die noch vorhandene ATPase-Aktivität des  $F_1$ -Teils erklärt. Um auszuschließen, dass die oben genannten Effekte auf die Deletion des *atpI*-Gens zurückzuführen sind, wurden Mutanten konstruiert, in denen nur das *atpI*-Gen ausgeschaltet wurde. Diese zeigten keine Unterschiede in den untersuchten Parametern zum Wildtyp (Jensen und Michelsen 1992).

Eine Deletionsmutante von *B. subtilis*, in der die *atpFHAGDC*-Gene deletiert wurden, konnte nicht mehr auf Minimalmedium mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, da mit diesem Substrat kein ATP über Substratstufenphosphorylierung gebildet werden kann. Die Wachstumsrate und maximale Biomasse dieser Mutante bei Kultivierung auf Glucosemedium war um 34 % bzw. 44 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Sowohl die Glucoseverbrauchsrate als auch die Bildung von Acetat war in der Mutante verdoppelt. Darüber hinaus konnte eine 50 %-ige Erhöhung der Atmungsrate festgestellt werden, die mit einem Anstieg in der Expression von Genen terminaler Oxidasen einherging.

Ein Vergleich der *atp*-Deletionsmutanten von *C. glutamicum* mit den Mutanten von *E. coli* und *B. subtilis* hinsichtlich der Wachstumsrate und der gebildeten Biomasse sowie der Bildung von Acetat zeigt, dass sich die Mutanten von *E. coli* und *B. subtilis* sehr ähnlich verhalten, wohingegen sich die *C. glutamicum* Mutanten in einigen Aspekten davon unterscheiden. Hinsichtlich der Wachstumsrate und Biomasse verhält sich die  $\Delta F_o$ -Mutante Typ III von *C. glutamicum* annäherungsweise wie die Mutanten von *E. coli* und *B. subtilis*. Betrachtet man jedoch die Bildung von Acetat so verhält sich die  $\Delta F_o$ -Mutante Typ II (und möglicherweise auch Typ I und die  $\Delta F_1F_o$ -Mutante) annähernd wie die *E. coli* und *B. subtilis* Mutanten. Unterschiedliche Typen von Mutanten sind für *E. coli* und *B. subtilis* offensichtlich nicht zu beobachten. Eine Mutante, die sich nur um 40-50 % in der Wachstumsrate vom Wildtyp unterscheidet, etwa 50 % der Wildtyp-Biomasse bildet und darüber hinaus Acetat ausscheidet, wie es für die *atp*-Mutanten von *E. coli* und *B. subtilis* beobachtet wurde, konnte für *C. glutamicum* nicht beobachtet werden. Hier gibt es nur Mutanten, die entweder eine relativ hohe Wachstumsrate (33 % des Wildtyp-Levels) und Biomassebildung (51 % des Wildtyp-Levels) zeigen, aber kein Acetat ausscheiden oder Mutanten, die Acetat ausscheiden, aber nur maximal  $\frac{1}{4}$  der Wildtyp-Wachstumsrate zeigen und 32 % der Wildtyp-Biomasse bilden. Wie sich die *atp*-Deletionsmutanten von *C. glutamicum* hinsichtlich Sauerstoff- und Glucoseverbrauch sowie einer erhöhten Bildung von Enzymen der Atmungskette verhalten, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

**Tabelle 5.2:** Vergleich einiger Wachstumsparameter von  $F_1F_o$ -ATP-Synthase-Deletionsmutanten von *C. glutamicum*, *E. coli* und *B. subtilis*.

Stamm	Wachstumsrate $\mu$ Biomasse <sub>max.</sub>	
	[% des Wildtyp-Levels]	
<b><i>C. glutamicum</i></b>		
$\Delta atpBEF$ (Typ I)	19	14
$\Delta atpBEF$ (Typ II)	25	32
$\Delta atpBEF$ (Typ III)	33	51
$\Delta atpBEFHAGDC$	19	12
<b><i>E. coli</i></b>		
$\Delta atpIBEFHAGDC$	79	58
$\Delta atpIB$	57	45
<b><i>B. subtilis</i></b>		
$\Delta atpFHAGDC$	66	56

<sup>1</sup>n.b. = nicht bestimmt

#### 4 Proteomvergleich der Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032 und ATCC 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>

Zur Identifizierung möglicher Unterschiede im Proteinmuster, die aus der Deletion der vollständigen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase resultieren, wurde ein Vergleich der Stämme ATCC 13032 und ATCC 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> auf Proteinebene durch 2D-Gelelektrophorese in einem pI-Bereich von 4,5-5,5 und 4-7 durchgeführt. Insgesamt konnten 12 Proteine identifiziert werden, deren Konzentration sich in den beiden Stämmen unterschied. Besonders auffällig waren die stark erhöhten Mengen an Katalase, Dps, SufB und SufD in der Mutante. Alle diese Proteine sind am Schutz der Zelle vor oxidativem Stress beteiligt, der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst wird. Zu den ROS gehören H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das Hydroxylradikal (OH•) sowie das Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Lushchak 2001). Die ROS sind in der Lage, alle zellulären Komponenten zu schädigen. Interaktion mit Proteinen zum Beispiel führt zu Modifikationen von Aminosäuren, Angriff der DNA zu Strangbrüchen und Punktmutationen. Besonders gefährdet sind ungesättigte Fettsäuren, die in einer Kettenreaktion Lipid-Peroxide bilden (Lushchak 2001; Zheng und Storz 2000). In der Zelle entstehen ROS unter aeroben Bedingungen vorwiegend durch die Fenton-Reaktion überall dort, wo Übergangsmetalle (hauptsächlich Eisen- und Kupfer-Ionen) vorhanden sind, oder beim Elektronentransport in der Atmungskette (Gutteridge und Halliwell 1989). Katalase katalysiert die Umsetzung von 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 2 H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> und schützt damit vor dem Oxidationsmittel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, insbesondere aber vor dem wesentlich reaktiveren Hydroxylradikal, das bei der Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit zweiwertigem Eisen im Zuge der Fenton-Reaktion gebildet wird. Das Dps-Protein bindet unspezifisch an DNA und bildet Protein-DNA-Komplexe, die die DNA vor Zerstörung schützen (Martinez und Kolter 1997). Die beiden Proteine SufB und SufD sind an der Bildung bzw. der Reparatur von Fe-S-Clustern in Proteinen beteiligt (Rangachari *et al.* 2002). Das Eisen liegt somit koordiniert in einer komplexen Struktur vor und kann daher nicht mit O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Bildung von ROS reagieren. Die erhöhten Konzentrationen von Katalase, Dps, SufB und SufD deuten also darauf hin, dass die  $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Mutante einem erhöhten oxidativen Stress unterliegt. Ursache dafür könnte eine erhöhte Atmungsrate sein, hervorgerufen durch einen Mangel an ATP. Die Erhöhung der Atmungsrate in Abhängigkeit eines ATP-Mangels wurde bereits für eine F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase-Mutante von *C. glutamicum* gezeigt (Sekine *et al.* 2001). Durch die Erhöhung der Atmungsrate sollen mehr Protonen für die ATP-Bildung durch oxidative Phosphorylierung bereitgestellt werden. Gleichzeitig steigt jedoch durch die erhöhte Atmungsrate die Wahrscheinlichkeit der Bildung von ROS im Zuge des Elektronentransportes durch die Atmungskette.

Um die o. g. These zu untermauern müssen einerseits die Ergebnisse aus dem Proteom-Vergleich durch weitere 2D-Gelanalysen bestätigt werden und andererseits die Atmungsraten der *atp*-Mutanten bestimmt werden.

## **5 Einfluss einer F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase Deletion auf die Aminosäureproduktion von *C. glutamicum***

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Fehlen der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase auf die Aminosäurebildung von *C. glutamicum* hat, wurde der Lysinproduktionsstamm DM1730ΔF<sub>0</sub>, in dem der membrangebundene F<sub>0</sub>-Teil der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase deletiert ist, hinsichtlich der Aminosäurebildung untersucht. Hierbei fiel auf, dass auch der F<sub>0</sub>-Deletionsstamm des Lysinproduzenten eine nur um 50 % reduzierte Biomasse in Bezug auf den Vergleichsstamm bildete, wie dies bereits für den Typ II der entsprechenden Wildtyp-Mutante gezeigt wurde. Die Lysinkonzentration war in der Mutante um etwa 50 % reduziert. Geht man davon aus, dass es auch in dem Lysinproduzenten aufgrund eines ATP-Mangels zu einem erhöhten Glycolysefluss kommt, so ist möglicherweise der für die NADPH-Synthese wichtige Kohlenstoff-Fluss über den oxidativen Pentosephosphatweg reduziert. Darüber hinaus ist auch die Lysinbiosynthese ein ATP-konsumierender Prozess. Im Gegensatz zu der deutlich reduzierten Lysinmenge konnten aber mit 1,1 g·l<sup>-1</sup> signifikante Mengen Alanin im Kulturüberstand der Mutante detektiert werden. Bei einem erhöhten Glycolysefluss und einem möglicherweise limitierenden Citrat-Zyklus könnte es zu einem Anstieg der intrazellulären Pyruvat-Konzentration kommen, die für die erhöhte Alanin-Bildung über die Transaminase AlaT (Marienhagen *et al.* 2005) verantwortlich ist. Neben der Bildung von Acetat aus Pyruvat kann somit auch Alanin aus der direkten Vorstufe Pyruvat gebildet werden. Eine erhöhte Alaninbildung (4,4 g·l<sup>-1</sup>) wurde auch in der *C. glutamicum* ATCC 14067-Mutante mit einer auf 25% reduzierten ATP-Synthase-Aktivität festgestellt (Sekine *et al.* 2001).

## **6 Veränderungen in der NADPH-Verfügbarkeit und ein damit verbundener Einfluss auf die Aminosäureproduktion von *C. glutamicum***

Die heterologe Expression der *pntAB*-Gene aus *E. coli* führte zur Bildung einer aktiven membrangebundenen Transhydrogenase in dem Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* DM1730. Die gemessene Transhydrogenase-Aktivität liegt mit 0,65 U·mg (Membranprotein)<sup>-1</sup> in einer Größenordnung wie sie auch bei der heterologen Expression der *pntAB*-Gene in

*Saccharomyces cerevisiae* bestimmt wurde (Anderlund *et al.* 1999). Damit ist die Transhydrogenase-Aktivität um das 40-fache gegenüber der in *E. coli* gemessenen nativen Aktivität erhöht (Sauer *et al.* 2004). Ein negativer Einfluss der Transhydrogenase PntAB auf die maximale Wachstumsrate, wie dies in *S. cerevisiae* beobachtet wurde (Anderlund *et al.* 1999), und die maximale Biomassebildung konnte in *C. glutamicum* DM1730 nicht festgestellt werden. Die Expression von *pntAB* im Stamm DM1730 führte aber zu einer um 17 % erhöhten Lysin-Konzentration. Noch größere Zunahmen konnten bei Wachstum mit Fructose oder einem Glucose/Fructose-Gemisch festgestellt werden (47 % bzw. 37 %), während bei Wachstum auf Saccharose die *pntAB*-Überexpression sogar zu einer um 200 % gesteigerten Lysinbildung führte (T. Georgi, unveröffentlicht). Diese positiven Effekte sind vermutlich auf eine verbesserte NADPH-Bereitsstellung in Gegenwart der Transhydrogenase PntAB zurückzuführen. Der stärkere Effekt bei Wachstum auf Saccharose deckt sich mit Ergebnissen zur Überproduktion der Fructose-1,6-bisphosphatase in DM1730. Auch dabei wirkte sich die erhöhte Aktivität am stärksten positiv auf die Lysin-Bildung bei Wachstum auf Saccharose aus (Georgi *et al.* 2005). Eine Erklärung dafür bietet die Annahme, dass aufgrund einer hohen Konzentration von Fructose-1,6-bisphosphat in Saccharose-gewachsenen Zellen der oxidative Pentosephosphat-Weg gehemmt ist, da dieser Metabolit die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase inhibiert (Georgi *et al.* 2005). Ob sich die PntAB-Überexpression auch in einer Veränderung des NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnisses widerspiegelt, muss in weiteren Experimenten gezeigt werden. Da die Transhydrogenase-Reaktion in Richtung NADPH-Bildung ein protonengekoppelter Prozess ist, konkurriert diese Reaktion mit der protonenabhängigen ATP-Bildung durch die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase. Eine Optimierung der Protonentranslokation der Atmungskette könnte somit einen positiven Einfluss auf ATP- und NADPH-Bildung haben. Die Expression der *pntAB*-Transhydrogenasegene in den Cytochrom-*bd*-Oxidase-Deletionsmutanten der Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B und DM1730 könnte also die Lysinproduktion noch weiter verbessern.

## VI Literaturverzeichnis

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

**Anderlund, M., Nissen, T. L., Nielsen, J., Villadsen, J., Rydström, J., Hahn-Hägerdal, B. und Kielland-Brandt, M. C. (1999)** Expression of the *Escherichia coli pntA* and *pntB* Genes, Encoding Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its Effect on Product Formation during Anaerobic Glucose Fermentation. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2333-2340.

**Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L. und Konstantinov, A. A. (1999)** A Cytochrome *bb'*-type Quinol Oxidase in *Bacillus subtilis* Strain 168. *J Biol Chem*, **274**, 32810-32817.

**Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Flechoso, F. Und Martín, 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.

**Bebbington, K. J. und Williams, H. D. (2001)** A role for DNA supercoiling in the regulation of the cytochrome *bd* oxidase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **147**, 591-598.

**Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. und Stork, H. (1974)** Glucosetest. In Methoden der enzymatischen Analyse II, Bergmeyer, H.U., ed., VCH Weinheim, pp. 1241-1246.

**Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.

**Bizouarn, T., Althage, M., Pedersen, A., Tigerström, A., Karlsson, C. J. und Rydström, J. (2002)** The organization of the membrane domain and its interaction with the NADP(H)-binding site in proton-translocating transhydrogenase from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1555**, 122-127.

**Blattner, F.R., Plunkett, G., 3<sup>rd</sup>, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. und Shao, Y. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1474.

- Boonstra, B., French, C. E., Wainwright, I. und Bruce, N. C. (1999)** The *udhA* Gene of *Escherichia coli* Encodes a Soluble Pyridine Nucleotide Transhydrogenase. *J Bacteriol*, **181**, 1030-1034.
- Bott, M. und Niebisch, A. (2003)** The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, **104**, 129-153.
- Bott, M. und Niebisch, A. (2005)** Respiratory Energy Metabolism. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L. and Bott, M., eds., Boca Raton, CRC Press, pp. 307-334.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method of the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dya binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brekasis, D und Paget, M. S. B. (2003)** A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J*, **22**, 4856-4865.
- Castiglioni, E., Grilli, E. und Sanguinetti, S. (1997)** A new simple and low cost scattered transmission accessory for commercial double beam ultraviolet-visible spectrophotometers. *Rev Sci Instrum*, **68**, 4288-4289.
- Clarke, D. M. und Bragg, P. D. (1985)** Cloning and expression of the transhydrogenase gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **162**, 367-373.
- Clauser, K. R., Baker, P. und Burlingame, A. L. (1999)** Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem*, **71**, 2871-2882.
- Degraf, S. (2005)** Regulation von Genen der Atmungskette und der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Universität zu Köln.
- D'mello, R. A., Hill, S. und Poole, R. K. (1994)** Determination of the oxygen affinities of terminal oxidases in *Azotobacter vinelandii* using the deoxygenation of oxyleghaemoglobin and oxymyoglobin: cytochrome *bd* is a low-affinity oxidase. *Microbiology*, **140**, 1395-1402.

**Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J.-L., Coccain-Bousquet, M. und Lindley, N. D. (1998)** Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem*, **254**, 96-102.

**Edwards, S. E., Loder, C. S., Wu, G., Corker, H., Bainbridge, B. W., Hill, S. und Poole, R. K. (2000)** Mutation of cytochrome *bd* quinol oxidase results in reduced stationary phase survival, iron deprivation, metal toxicity and oxidative stress in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett*, **185**, 71-77.

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

**Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. und Sahm, H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promoter probing. *Gene*, **102**, 93-98.

**Fountoulakis, M. und Langen, H. (1997)** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem*, **250**, 153-156.

**Georgi, T., Rittmann, D. und Wendisch, V. F. (2005)** Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng*, **7**, 291-301.

**Goa, J. (1953)** A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest*. 1953, **5**, 218-222.

**Govantes, F., Albrecht, J. A. und Gunsalus, R. P. (2000)** Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome *d* oxidase (*cydAB*) operon: roles of multiple promoters and the Fnr-1 and Fnr-2 binding sites. *Mol Microbiol*, **37**, 1456-1469.

**Gutteridge, J. M. und Halliwell, B. (1989)** Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*, **2**, 195-256.

**Hanahan, D. (1983)** Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.

- Hanahan, D. (1985)** Techniques of Transformation of *E. coli*. In DNA-Cloning, Glover, D. M., ed., IRL-Press, pp. 109-135.
- Hermann, T. (2003)** Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol*, **104**, 155-172.
- Hicks, D. B., Wang, Z. X., Wei, Y., Kent, R., Guffanti, A. A., Banciu, H., Bechhofer, D. H. und Krulwich, T. A. (2003)** A tenth *atp* gene and the conserved *atpI* gene of a *Bacillus atp* operon have a role in Mg<sup>2+</sup> uptake. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 10213-10218.
- Jackson, J. B. (2003)** Proton translocation by transhydrogenase. *FEBS Letters*, **545**, 18-24.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G. und Wohleben, 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.
- Jensen, P. R. und Michelsen, O. (1992)** Carbon and energy metabolism of *atp* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 7635-7641.
- Jünemann, S. (1997)** Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim Biophys Acta*, **1321**, 107-127.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I. und Tauch, A. (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.
- Kana, B. D., Weinstein, E. A., Avarbock, D., Dawes, S. S., Rubin, H. und Mizrahi, V. (2001)** Characterization of the *cydAB*-Encoded Cytochrome *bd* Oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, **183**, 7076-7086.
- Kelle, R., Hermann, T. und Bathe, B. (2005)** L-Lysine Production. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L. and Bott, M., eds., Boca Raton, CRC Press, pp. 467-490.

**Kiefer, P., Heinzle, E., Zelder, O. und Wittmann, C. (2004)** Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 229-239.

**Kimura, E. (2005)** L-Glutamate Production. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L. and Bott, M., eds., Boca Raton, CRC Press, pp. 441-466.

**Kinoshita, S. und Tanaka K. (1972)** Glutamic acid. In The Microbial Production of Amino Acids. Yamada, K., ed., Wiley, New York, pp. 263-324.

**Koebmann, B. J., Westerhoff, H. V., Snoep, J. L., Nilsson, D., und Jensen, P. R. (2002)** The Glycolytic Flux in *Escherichia coli* Is Controlled by the Demand for ATP. *J Bacteriol*, **184**, 3909-3916.

**Kotrba, P., Inui, M. und Yukawa, H. (2001)** The *ptsI* Gene Encoding Enzyme I of the Phosphotransferase System of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 1307-1313.

**Kusumoto K., Sakiyama, M., Sakamoto, J., Noguchi, S. und 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.

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

**Lagoni, O. R., von Meyenburg, K. und Michelsen, O. (1993)** Limited Differential mRNA Inactivation in the *atp (unc)* Operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **175**, 5791-5797.

**Liebl, W. (2005)** *Corynebacterium* Taxonomy. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L. and Bott, M., eds., Boca Raton, CRC Press, pp. 9-34.

**Lindroth, P. und Mopper, K. (1979)** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with *o*-phthalaldehyde. *Anal Chem*, **51**, 1667-1674.

- Link, A. J., Phillips, D. und 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.
- Lushchak, V. I. (2001)** Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Mosc)*, **66**, 476-489.
- Marienhagen, J., Kennerknecht, N. Sahm, H. und Eggeling, L. (2005)** Functional Analysis of All Aminotransferase Proteins Inferred from the Genome Sequence of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, **187**, 7639-7646.
- Martinez, A. und Kolter, R. (1997)** Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol*, **179**, 5188-5194.
- Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L., und Sahm, H. (1996)** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolic balancing. *Biotechnol Bioeng*, **49**, 111–129.
- Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahm, H. und Eggeling, L. (1997)** Response of the Central Metablism of *Corynebacterium glutamicum* to Different Flux Burdens. *Biotechnol Bioeng*, **56**, 168-180.
- Marx, A., Hans, S., Möckel, B., Bathe, B. und de Graaf, A. A. (2003)** Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, **104**, 185-197.
- Matsushita, K., Yamamoto, T., Toyama, H. und Adachi, O. (1998)** NADPH oxidase system as a superoxide-generating cyanide-resistant pathway in the respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 1968-1977.
- Miller, M. J. und Gennis, R. B. (1983)** The purification and characterisation of the cytochrome *d* terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J Biol Chem*, **258**, 9159-9165.
- Miller, M. J. und 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.

**Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.

**Nicholls, D. G. und Ferguson, S. J. (2002)** Bioenergetics3, 2nd edn., 4<sup>th</sup> printing, Academic Press, London.

**Niebisch, A. (2003)** Molekulare Charakterisierung des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

**Niebisch, A. und Bott, M. (2001)** Molecular analysis of the cytochrome *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub> branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c*<sub>1</sub>. *Arch Microbiol*, **175**, 282-294.

**Niebisch, A. und Bott, M. (2003)** Purification of a cytochrome *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub> supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome *aa*<sub>3</sub> oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome *c*<sub>1</sub>. *J Biol Chem*, **278**, 4339-4346.

**Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K. und Ikeda, M. (2002)** A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 217-223.

**Oswald, C., Johansson, T., Törnroth, S., Ökvist, M. und Kregel, U. (2004)** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the NAD(H)-binding domain of *Escherichia coli* transhydrogenase. *Acta Cryst*, **D60**, 743-745.

**Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G. A., Weil, B., Kramer, R. und Titgemeyer, F. (2001)** *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **3**, 423-428.

**Pfefferle W, Moeckel B, Bathe B, und Marx A. (2003)** Biotechnological Manufacture of L-lysine. In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag, Berlin, Vol. 79, pp. 59-112.

- Pittman, M. S., Corker, H., Wu, G., Binet, M. B., Moir, A.J. und 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. und Poole R. K. (2005)** A Bacterial Glutathione Transporter (*Escherichia coli* CydDC) Exports Reductant to the Periplasm. *J Biol Chem*, **280**, 32254-32261.
- Pons, A., Dussap, C. G., Pequinot, C. und Gros, J. B. (1996)** Metabolic flux distribution in *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 for various carbon sources. *Biotechnol Bioeng*, **51**, 77-189.
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B. und Wikström, M. (1991)** Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **30**, 3936-3942.
- Rangachari, K., Davis, C. T., Eccleston, J. F., Hirst, E. M., Saldanha, J. W., Strath, M. und Wilson, R. J. (2002)** SufC hydrolyzes ATP and interacts with SufB from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett*, **514**, 225-228.
- Rittmann, D., Schaffer, S., Wendisch, V. F. und Sahn, H. (2003)** Fructose-1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme. *Arch Microbiol*, **180**, 285-292.
- Sakamoto J, Shibata T, Mine T, Miyahara R, Torigoe T, Noguchi S, Matsushita K und Sone N. (2001)** Cytochrome *c* oxidase contains an extra charged amino acid cluster in a new type of respiratory chain in the amino-acid-producing Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, **147**, 2865-2871.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.

**Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. und Fischer, E. (2004)** The Soluble and Membrane-bound Transhydrogenase UdhA and PntAB Have Divergent Functions in NADPH Metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **8**, 6613-6619.

**Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und 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., Gunther, K., Nickolaus, M., Hermann, T. und Bott, M. (2001)** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis*, **22**, 4404-4422.

**Schau, M., Chen, Y. und Hulett, F. M. (2004)** *Bacillus subtilis* YdiH Is a Direct Negative Regulator of the *cydABDC* Operon. *J Bacteriol*, **186**, 4585-4595.

**Schirawski, J. und Uden, G. (1998)** Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *Eur J Biochem*, **257**, 210-215.

**Schrumpf, B., Eggeling, L. und Sahl, H. (1992)** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **37**, 566-571.

**Schwarzer, A., und Pühler, A. (1991)** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology*, **9**, 84-7.

**Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F. und Yokota, A. (2001)** H<sup>+</sup>-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl Microbiol Biotechnol*, **57**, 534-540.

**Shuman, S. (1994)** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, **269**, 32678-84.

**Sickmier, E. A., Brekasis, D., Paranawithana, S., Bonanno, J. B., Paget, M. S. B., Burley, S. K. und Kielkopf, C. L. (2005)** X-Ray Structure of a Rex-Family Repressor/NADH Complex Insights into the Mechanism of Redox Sensing. *Structure*, **13**, 43-54.

**Simons, S. S., Jr. und Johnson, D. F. (1978)** Reaction of *o*-phthalaldehyde and thiols with primary amines: fluorescence properties of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles. *Anal Biochem*, **90**, 705-725.

**Sindelar, G. (2003)** Globale Expressionsanalysen zur Charakterisierung der Lysin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

**Singh, A., Venning, J. D., Quirk, P. G., van Boxel, G. I., Rodrigues, D. J., White, S. A. und Jackson, J. B. (2003)** Interactions between Transhydrogenase and Thio-nicotinamide Analogues of NAD(H) and NADP(H) Underline the Importance of Nucleotide Conformational Changes in Coupling to Proton Translocation. *J Biol Chem*, **35**, 33208-33216.

**Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.

**Sone, N., Nagata, K., Kojima, H., Tajima, J., Kodera, Y., Kanamaru, T., Noguchi, S. und 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.

**Sone, N. und Yanagita, Y. (1982)** A cytochrome *aa*<sub>3</sub>-type terminal oxidase of a thermophilic bacterium purification, properties and proton pumping. *Biochim Biophys Acta*, **682**, 216-226.

**Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.

**Sternson, L. A., Stobaugh, J. F. und Repta, A. J. (1985)** Rational design and evaluation of improved *o*-phthalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal Biochem*, **144**, 233-246.

**Sugiyama, Y., Kitano, K. und Kanzaki, T. (1973)** Role of copper ions in the regulation of L-glutamate biosynthesis. *Agric Biol Chem*, **37**, 1837-1847.

**Takahashi, Y. und Tokumoto, U. (2002)** A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem*, **277**, 28380-28383.

**Tseng, C. P., Albrecht, J. und Gunsalus, R. P. (1996)** Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (*cyoABCDE* and *cydAB*) and anaerobic (*narGHJI*, *frdABCD* and *dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **178**, 1094-1098.

**Van der Rest, M. E., Lange, C. und Molenaar, D. (1999)** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol*, **52**, 541-545.

**Venning, J. D. und Jackson, J. B. (1999)** A shift in the equilibrium constant at the catalytic site of proton-translocating transhydrogenase: significance for a 'binding-change' mechanism. *Biochem J*, **341**, 329-337.

**Wennerhold, J. und Bott, M. (2006)** The DtxR Regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, in revision.

**Winstedt, L., Yoshida, K.-I., Fujita, Y. und von Wachenfeldt, C. (1998)** Cytochrome *bd* Biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *cydABDC* Operon. *J Bacteriol*, **180**, 6571-6580.

**Wu, G., Hill, S., Kelly, M. J. S., Sawers, G. und Poole, R. K. (1997)** The *cydR* gene product, required for regulation of cytochrome *bd* expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*, is an Fnr-like protein. *Microbiology*, **143**, 2197-2207

**Zamboni, N., Mouncey, N., Hohmann, H.-P. und Sauer, U. (2003)** Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, **5**, 49-55.

**Zheng, M. und Storz, G. (2000)** Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*, **59**, 1-6.

## VII Anhang

### A1 Sequenz der Gene *atpBEFHAGDC* aus *C. glutamicum*

Region des *C. glutamicum* Genoms mit den *atpBEFHAGDC*-Genen (kodieren die  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase) und dem *atpI*-Gen (kodiert ein hypothetisches Protein), sowie der entsprechenden Proteinsequenzen. Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation der Deletionskonstrukte verwendet wurden sind grau unterlegt, diejenigen zur Überprüfung der Deletion sind unterstrichen.

```

1  AAACTTGATT AAGTGATTGT CACTTTGGAT TGTCATATTG GCGGAATAAA CCGGTAGGAT TCCCCTTCGT GAGCGCCGAA
81  AATACCGAGA ACACAGATTG CCCATTGAA ATCTCCGAGT TTGATGATCA CCGACGCCCC CTCCAGCGGG CCTCAAATT
161 CGGTTCCATC GCCCTAATTG TCTTCACCCT GATCTCCCTA GCGATCTGGG GTGCTACTCG CGGCGTACCC GGCGTATGGG
241 GAGTTGTTAT CGGCGCAGCA GTTGGCGGAG GCTTTGTCCT CTTAACGGCT CTCAGCGTCC TGTTTACAGC TAATTCCAAC
321 GTCACCACCA CCGGTGCGGT GGTGCTCGGT GGCTGGCTGC TGAAGATCGT TATTCTGATC ATCGTGTCTG CAGTCATCAA
401 AGACATGACC TTCTACGACA ACACCGCCCT TTTTGTACAA GTGGTGATTG CCTTAGTAGT TGTCTGCTG ACTGAAGTCT
                                                                    ( $\Delta F_0-1-for$ )
481 GGGGAGTCGT GACCTCTAGG GTTACATACG TCGGATAAGC AATCGGTCAT TTCAACGCC CCACACCCCT TGAAACAGGG
561 GAGTGGGGGC GTTTTAATAC CTGCCCCCGC TACCATTGTG TACTAGGTG AGTGGGCTTA GGTGTCTCAG AGCACAGTAG
                                                                    ► atpI
641 TCGGACATTA GAGAGCTGCA CCGCAGTAAA AGGCCACGAT GTAGGAGGTG GCGGAGTGT CCGTGTCTGG AAAGTGGCGG
                                                                    V S V L G N W R
721 GGAACITTTA GAGATAACCC TCCGAATTGC TGGCAAATTT CIGATGAAAT TTCTCCGCGA AGCCACATG AACTACCCCC
    G T F R D N P P N C W Q I S D E I S P R S P H E L P
801 GTTTACCCTC AAAATAAGCC CTGTGACACA CATAACACCC CCTAATCGTA CCCGCTCACA CGCTATTTTC GAGGTGTGGT
    P F T L K I S P V T H I T P P N R T R S H A I F E V W
881 TCGCCTTCGG AAACGAATGC CCCC GCCCA CTTGATAAAA AGACGAATTC ACCTGTTAGT CTATAACGCG GGTGAACCG
    F A F G N E C P R P T W I K D E F T C Stop
                                                                    ► atpB ( $\Delta F_0-2-rev$ )
961 AGAAACCCCT CAAGGCAGCA GACAATAGCC GCAAGGGGT TCGCGGAGCA CGTCCCCTGT GATCGTTGCG CTGATGTGCG
    L R S T S P V I V A L M C
1041 ACGGAGTCCG TAGCGATTAC AGCGAGTTTT TCAGACGTCC ATCGCACCGT GCACAACAAC ATTTAGGTG CACGGCCCGA
    D G V R S D Y S E F F R R P S H R A Q Q H F R C T A R
1121 ACACGGGAGA GAACGCTGAG CGTTACAACA CTGTCCATGA AGGCGAATT CCACGCCCC GATTTGGACA AAGAATTTT
    T R E R T L S V T T L S M K G E F H A P D L D K E F
1201 CCCGGGGCAG GTAACCGATA GTGGTGAAGT CGTGAACATG CTGTTACCG ATTTGCTAA TGGTTGGTTC GCAATGGACC
    F P G H V T D S G E V V N M L F T D F A N G W F A M D
1281 GCATCGTATT GATCCGCTTT CTTATGACGG CAGTCGTTGT GGTCTTCTC CTTTGGGCTA TGCGAAGCC AAAGCTTGTT
    R I V L I R L L M T A V V V V F F L W A M R K P K L V
1361 CCGCATGGCG TCCAGAATTT TGCAGAGTAC GCACTCGATT TCGTTCGTAT TCACATCGCT GAAGACATCC TCGGAAAGAA
    P H G V Q N F A E Y A L D F V R I H I A E D I L G K
1441 GGAAGTTCGT CCGTTCCTGC CGATCCTGGC CACCATCTTC TTCGCGGCTC TGTTGATGAA CCTTGCAACG ATCATCCCGG
    K E G R R F L P I L A T I F F A A L L M N L A T I I P
1521 GACTAAACAT CTCCTCCAAC TCACGTATTG CATTCCCAAT CGTGATGGCG GTAGCTGGTT ACATCGCGTT TATCTACGCA
    G L N I S S N S R I A F P I V M A V A G Y I A F I Y A
1601 GGCTCTAAGC GTTACGGATT CTTCAAATAT GTGAAGTCTT CIGTTGIGAT TCCGAACATT CCACCAGCAC TTCACGCTTT
    G S K R Y G F F K Y V K S S V V I P N I P P A L H V
1681 GGTGGTTCCA ATTGAGTTCT TCTCTACATT CATCTTGAGG CCAGTCACCC TGGCACTGCG TTTGATGGCC AACTTCCTTG
    L V V P I E F F S T F I L R P V T L A L R L M A N F L
1761 CTGGCCACAT CATCCTGGTT CTGCTTTTCT CCGAACGAA CTTCTTCTC TTCAGTTCA ACGGATGGAC AGCAATGTCC
    A G H I I L V L L F S A T N F F F F Q F N G W T A M S
1841 GCGGTAACCA TCTTGATGGC AGTACTCTTC ACGGTTTACG AGATCATTGT TATCTTCTG CAGGCATACA TCTTCTGCTT
    G V T I L M A V L F T V Y E I I V I F L Q A Y I F A
1921 GCTGTGCTGT GTATACATTG AGCTTTCAC TACGCGGAT TCTACTAGA TGAAAAAGGT CGCTATTAAA AGCTTCTTGC
    L L V A V Y I E L S L H A D S H Stop

```

2001 ACAAGTCGCC CAGATAGCGA GCGGACCACT CGGTCAACTG AATAACCCCA CTAAACACTT CACAGCCCGA ACACACGGGC  
 ▶ *atpE*  
 2081 ACCAGAAAGG GAACGACACC TCATGAACGA GATCATCCTG GCACAGGACG CAACCGAGTC CACCATCACC GGAATTGGCG  
 M N E I I L A Q D A T E S T I T G L G  
 2161 CTGTCGGCTA CGGCATCGCA ACCATCGGAC CTGGCCTCGG CATCGGCATC CTGGTTGGTA AGGCTCTCGA GGGTATGGCA  
 A V G Y G I A T I G P G L G I G I L V G K A L E G M A  
 2241 CGTCAGCCTG AGATGGCTGG ACAGCTCCGT ACCACCATGT TCCTGGGCAT CGCCTTCGTT GAGGCCCTGG CACTGATCGG  
 R Q P E M A G Q L R T T M F L G I A F V E A L A L I  
 ◀ *atpF*  
 2321 CCTTGTGCT GGCTTCTGT TCTAATCAGC TAACCTAACG GAAAGCTGGT AAACCATGGC GAATTCGATT TACAATTGG  
 G L V A G F L F Stop M A N S I Y N L  
 2401 CGCAAGCAGA TGCGCTGCCT TTGGAGAGCG GAAACTCAAT TCTGTTCCTT CCTCTGTATG ACATCGTCTG GTCCTTCATC  
 A Q A D A L P L E S G N S I L F P P L Y D I V W S L I  
 2481 CCGTTTTTGA TCATCCTGAT CGTATTTTGG AAGCTTGTTT TTCCGAAGTT CCAGGAGGTC CTGACCGAGC GTGAGGACCG  
 P F L I I L I V F W K L V L P K F Q E V L T E R E D  
 2561 GATCAAGGGA GGCATTACG GTGCCGAAGC CGCTCAGGCT GAGGCCAAGG CTGCCCTTGA AAAGTACAAC GCACAGCTCG  
 R I K G G I Q R A E A A Q A E A K A A L E K Y N A Q L  
 2641 CTGAGGCCCG TACTGAAGCT GCTGAGATCC GTGAGCAGGC GCGCGAGCGC GGCAAGCAGA TCGAAGCAGA ACTGAAGGAC  
 A E A R T E A A E I R E Q A R E R G K Q I E A E L K D  
 2721 AAGGCTAACG AAGAGAGCAA CCGCATCATC GAGTCCGGTA GCAAGCAGCT TCTGGCACAG CCGGAGCAGG TCGTTAACGA  
 K A N E E S N R I I E S G S K Q L L A Q R E Q V V N  
 2801 ACTGCGCCGC GAAATGGGCC AGAACTCCAT CAACCTTGCC GAGCACCTTC TTGAGATCA GCTCTCCGAT AACGTAAGC  
 E L R R E M G Q N S I N L A E H L L G D Q L S D N V K  
 (ΔF<sub>o</sub>-3-for) ◀ ▶ *atpH*  
 2881 GCTCTGGCAC GATTGATCGC TTCCTCGCTG ACCTCGATAC CGTGGCACCG AACGGAAAGT AGGCGACATG CACGACGCAA  
 R S G T I D R F L A D L D T V A P N G K Stop M H A A  
 2961 GCCGCGAGGC ACTGGCAAAG GTTTCGTCCG ATCTGGACGC TGCTCTAGCA GCAGACAACA CCATGGCAGT TGCCGCCAG  
 S R E A L A K V S S D L D A A L A A D N T M A V A A Q  
 3041 GCTGGAAGTG AGCTTTTCGA CGTCGTCGAC ATTCTCGACG GCGACCGAGC TCTGCGTGTG GCTGTTGCCG ACTCTTCTAA  
 A G T E L F D V V D I L D G D R A L R V A V A D S S  
 3121 GGACGCACAC AGCCGAGTCG GCCTCATTGA GGCTGTCTTC GGTGGAAAAG TGAGCCCATC TGTTCTCGAA GTCCTCAAGG  
 K D A H S R V G L I E A V F G G K V S P S V L E V L K  
 3201 ACGCCGACAG GCAGACCTGG TCCACTCCAC GCGAGTCCG CGCTGGACTA GTCCAAGTTC GCCGTCGCGC CCTTCTTCGC  
 D A A E Q T W S T P R E F R A G L V Q L G R R A L L R  
 3281 TCTGCGGAGA AACAGGGTCA GCTTGGTCAG GTGGAAGATG AACIGTTCGG ACTCAGCCGA ATCCTGGATC GCGAAAGCAA  
 S A E K Q G Q L G Q V E D E L F R L S R I L D R E S  
 3361 GCTGACTCAG CTTCTTTCAG ATCGCACTCA GGAAATTGGC GGTCGACGTG ACCTCCTGGC TAAGGTGCTC TACGGCAAGG  
 K L T Q L L S D R T Q E I G G R R D L L A K V L Y G K  
 (ΔF<sub>o</sub>-4-rev)  
 3441 TAACTGCTGT TACCGAAGCC CTCGCACTGC AGGCTATTGG TCGCCCTGAG CACAACCCAA TTGACGATAT CGCAGCTTTG  
 V T A V T E A L A L Q A I G R P E H N P I D D I A A L  
 3521 GCTGGCGCTG TAGCAGAGCT ACAGGGTCGT TCCGTGTCAC ATGTCGTTAC CGCAGTTGAA CTCACGAGG GACAGCAACA  
 A G A V A E L Q G R S V A H V V T A V E L N E G Q Q  
 3601 AGCGTAGCT GAAAAGCTGG GACGTATTTA TGGTCGTGCG ATGAGCATCC ACTCCGAGGT TGATACCAGC CTCCTCGGTG  
 Q A L A E K L G R I Y G R A M S I H S E V D T S L L G  
 3681 GAATGATCAT CCGCGTCGGA GACGAAGTAA TTGACGGCAG CACCTCGGGC AAACCTGAGC GTCTGCGGGC AAGCTTCGCA  
 G M I I R V G D E V I D G S T S G K L E R L R A S F A  
 ◀ ▶ *atpA*  
 3761 TAAAGACACG ACGAATTAGA CAACATTAGT AATGCTGGAA GAAACAACCG AGAGCAGGAA GAACATGGCG GAGCTGACGA  
 Stop M L E E T T E S R K N M A E L T  
 3841 TCTCCTCCGA TGAGATCCGT AGCGCGATTG CGAACTACAC CTCGAGCTAC TCCGCGGAGG CCTCCCCTGA GGAGGTCGGC  
 I S S D E I R S A I A N Y T S S Y S A E A S R E E V G  
 3921 GTGGTTATTT CGGCCCTGTA CGGTATCGCC CAGGTTTCGG GCCTCCCCTC AGTAATGGCG AATGAGCTCC TCGAATTCCC  
 V V I S A A D G I A Q V S G L P S V M A N E L L E F  
 4001 GGGCGGCGTC ATCGGCGTCG CACAGAACCT TGAAGCTGAC CGAGTCGGCG TCGTGGTCCT GGGTAACTAC GAGCTACTTA  
 P G G V I G V A Q N L E A D R V G V V V L G N Y E L L  
 4081 AAGAAGGCGA CCAAGTTCGT CGTACTGGAG ACGTTCGTGC TATCCCAGTC GGCGAGGCAT TCCTTGGCCG CGTTATCAAC  
 K E G D Q V R R T G D V L S I P V G E A F L G R V I N

4161 CCCCTTGGCC AGCCAATTGA CGGCCTGGGC GAAATTGCAT CCGAAGAGGA CCGCGTCCTC GAGCTTCAGG CACCAACCGT  
P L G Q P I D G L G E I A S E E D R V L E L Q A P T

4241 GCTTGAGCGC CAGCCTGTGC AGGAGCCTTT GGCAACCGGC ATCAAGGCTA TCGATGCAAT GACCCCAATC GGCCGCGGTC  
V L E R Q P V E E P L A T G I K A I D A M T P I G R G

4321 AGCGTCAGCT GATCATTGGT GACCGTAAGA CTGGCAAGAC CGCAGTCTGT GTCGATACCA TCCTTAACCA GAAGGCCAAC  
Q R Q L I I G D R K T G K T A V C V D T I L N Q K A N

4401 TGGGAGACCG GCGACAAGAC CAAGCAGGTT CGCTGCATCT ACGTCGCAAT CCGTCAGAAG GGCTCCACCA TTGCAGCCCT  
W E T G D K T K Q V R C I Y V A I G Q K G S T I A A

4481 GCGTAAGACC CTCGAGGAGC AGGGCGCTCT CGAGTACACC ACCATCGTGG CTGCACCCGC TTCCGATGCT GCAGGCTTCA  
L R K T L E E Q G A L E Y T T I V A A P A S D A A G F

4561 AGTGGCTTGC ACCATTGCTT GCGCTGCTC TCGCCAGCA CTGGATGTAC CAGGGCAACC ACGTCCCTGGT CATCTACGAT  
K W L A P F A G A A L A Q H W M Y Q G N H V L V I Y D

4641 GATCTGACCA AGCAGGCTGA GGCATAACCGT GCTATCTCCC TGCTGCTGCG TCGCCACCG GGCCGCGAAG CATAACCCAGG  
D L T K Q A E A Y R A I S L L L R R P P G R E A Y P

4721 TGACGTCTTC TACCTGCACT CCCGCTGCTT GGAGCGCGCT GCGAAGCTGT CCGATGAACT AGGCGCAGGT TCTATTACAG  
G D V F Y L H S R L L E R A A K L S D E L G A G S I T

4801 CACTGCCAAT CATTGAGACC AAGGCTAATG ACGTTTCCGC CTTTATTCTT ACCAACGTGA TTTCCATCAC CGACGGTCAG  
A L P I I E T K A N D V S A F I P T N V I S I T D G Q

4881 GTATTCTTGG AGTCCGACCT GTTCAACCGT GGCGTTCGCC CCGCGATCAA CGTCCGGTGA TCCGCTCTCCG GTGTCCGGTG  
V F L E S D L F N R G V R P A I N V G V S V S R V G

4961 CGCAGCTCAG ACCAAGGGTA TGAAGAAGGT TGCCGGTCTT CTCCGCTGCG ATCTGGCTGC ATTCCCGCAG CTGGAAGCAT  
G A A Q T K G M K K V A G S L R L D L A A F R D L E A

5041 TCGCTACCTT CGCATCTGAC TTGGATGCTG CATCCAAGTC TCAGTCTGAG CGTGGCCAGC GCCTCGTTCA GCTGTTGATT  
F A T F A S D L D A A S K S Q L E R G Q R L V Q L L I

5121 CAGTCTGAGA ACGCACCTCA GGCTGTTGAG TACCAGATCA TTTCTCTCTG GCTTGCAGGC GAAGGCGCAT TCGACAACGT  
Q S E N A P Q A V E Y Q I I S L W L A G E G A F D N

5201 TCCGTGTTGAA GATGTTGCTC GCTTCGAGTC CGAAGTGCAC GAGTACTTAG GCTCCAACGC TGCACAGGTC TACGAGCAGA  
V P V E D V R R F E S E L H E Y L G S N A A Q V Y E Q

5281 TCGCTGGTGG AGCTCAGCTT TCCGACGAGT CCAAGGAAAC CTTGCTCAAG GCAACCGAAG ATTTCAAGAG CGCTTTCCAG  
I A G G A Q L S D E S K E T L L K A T E D F K S A F Q

5361 ACCACCGATG GCACCCCTGT CATCAACGAG CCTGAGGTTG AAGCACTCGA TGCAGGCCAG GTCAGAAGAAG ACCAGCTCAC  
T T D G T P V I N E P E V E A L D A G Q V K K D Q L

5441 CGTTTCCCGC AAGGTCAGCA AGAAGTAAGG CAGCGAGCCT AACTAAATG ACTGTCCAAG CAACTGAAGG GAGGCGTGTG  
T V S R K V S K K Stop  
▶ *atpG*

5521 AACCATGGCA ACAATTGCTG AATTGCGTGA CCGAATTCGT TCGGTTAACT CAACCAAGAA GATCACCAAG GCTCAAGAGC  
M A T I R E L R D R I R S V N S T K K I T K A Q E

5601 TCATCGCCAC CTCTCGCATC ACCAAGGCAC AGGGTCGCGT CGCGGCAGCT GCGCCGTACG CCGAGGAAAT CCAGCGCGTG  
L I A T S R I T K A Q G R V A A A A P Y A E E I Q R V

5681 CTGGAGCGCC TCGCGTCGGC AAGCTCCCTA GACCACCCAA TGCTGCGTGA GCGTGAAGGC GGCAAGCGAG CCGCCGTGCT  
L E R L A S A S S L D H P M L R E R E G G K R A A V

5761 CGTGGTACT TCTGACCGCG GCATGGCTGG TGGCTACAAC CACAACGTTT TGAAAAAGGC AGCGGAGCTG GAAAAGCTTC  
L V V T S D R G M A G G Y N H N V L K K A A E L E K L

5841 TTGCTGAAA GGGATAAGAA GTGGTTCGTT ATGTCACCGG CAAAAAGGGC GTCGACTACT ACAAGTTCGG CGCTGAAGAT  
L A E S G Y E V V R Y V T G K K G V D Y Y K F R A E D

5921 GTGGCTGGCA CCTGGACTGG ATTCTCACAG GATCCAGACT GGGCAGCTAC CCACAACGTG CGCCGTACCC TCATTGATGG  
V A G T W T G F S Q D P D W A A T H N V R R H L I D

6001 TTTACCGCC AGCTCTGAAG GTGAAGCTGC ATGGCGCGAG GGAAGTGAAC TACCAGAAGG CCAGGATATC CAGGGCTTCG  
G F T A S S E G E A A W R E G L N L P E G Q D I Q G F

6081 ACCAGGTTCA CGTGGTCTAC ACCGAGTTCA TCTCCATGCT GACTCAAAAC CCAGTAGTGC ACCAACTGCT GCCTGTTGAG  
D Q V H V V Y T E F I S M L T Q N P V V H Q L L P V E

6161 CCAGTCATCG AAGATGAAAT TTTGAAAAA GGCGAGGATC TGCTGTCCTT TTCCGGCGAA GTCGAACCCG ACTACGAGTT  
P V I E D E I F E K G E D L L S S S G E V E P D Y E

6241 CGAGCCGGAT GCAGACACTC TGCTTGAGGC ACTGCTCCCG CAGTACGTCT CTCGTAGGCT GTTCTCCATC TTCTTGGAGG  
 F E P D A D T L L E A L L P Q Y V S R R L F S I F L E

6321 CTGCAGCTGC AGAGTCCGCT TCACGTCGAA ACGCGATGAA GTCTGCGACT GACAACGCTA CGGAACCTGGT CAAGGACCTG  
 A A A A E S A S R R N A M K S A T D N A T E L V K D L

6401 TCCCCTGTGG CCAACCAGGC ACGTCAGGCA CAGATCACCC AGGAAATCAC AGAGATTGTT GGTGGCGCAG GCGCGCTCGC  
 S R V A N Q A R Q A Q I T Q E I T E I V G G A G A L

6481 CGACAGCGGA GAAAGTGACT AATTATGACT ACAGCTCTTG AAGAGCAGAA CGCACAGCAG GCAGCCACTG CCGGCCGTGT  
 A D S G E S D Stop M T T A L E E Q N A Q Q A A T A G R

6561 CGTGCGTGT ATTGGTGGG TCGTCGACGT GGAGTTTCCC CGCGGCGAGC TGCCAGCACT GTACAACGCA CTTACTGTAG  
 V V R V I G A V V D V E F P R G E L P A L Y N A L T V

6641 AGGTAACCCT CGAATCAGTT AAGAAGACCG TTGTCTCGA GGTGCTCAG CACCTCGGCG ACAACCTCAT CCGCACCATC  
 E V T L E S V K K T V V L E V A Q H L G D N L I R T I

6721 GCTATGGCAC CAACCGACGG ACTTGTCCCG GGTGCTGCTG TAACCATAAC TGCACGCCCA ATTTCCGTAC CAGTGGGCGA  
 A M A P T D G L V R G A A V T D T A R P I S V P V G

6801 TGTGTTAAG GCCACGTAT TCAACGCTTT GGGCGACTGC CTAGACGAGC TTTCCCTGAA CAACAACCCA GAGATCGAGC  
 D V V K G H V F N A L G D C L D D V S L N N N P E I E

6881 GTTGGGGCAT CCACCGCGAG CCACCATCAT TCGATCAGCT TGAGGGTAAG ACCGAGATCC TGGAAACAGG CATCAAGGTT  
 R W G I H R E P P S F D Q L E G K T E I L E T G I K V

6961 ATCGACCTC TCACCCCTTA CGTTAAGGGT GGAAAGATCG GCCTCTCCGG TGGTGCAGGT GTGGGTAAGA CCGTCTTAT  
 I D L L T P Y V K G G K I G L F G G A G V G K T V L

7041 CCAGGAAATG ATCACCCGTA TTGCACGTGA GTTCTCCGGT ACTTCCGTGT TCGCAGGTGT TGGTGAAGCGT ACCCGTGAGG  
 I Q E M I T R I A R E F S G T S V F A G V G E R T R E

7121 GCACCGACTC CTTCTCGAA ATGGAAGAAA TGGGCGTCTT CCAGGACACC GCCCTGGTGT TCGGTACAGT GGATGAGCCA  
 G T D L F L E M E E M G V L Q D T A L V F G Q M D E P

7201 CCAGGAGTCC GTATGCGCGT GGCTCTGTCC GGCCTGACCA TGGCGGAGTA CTTCCGCGAT GTTCAGAACC AGGACGTGCT  
 P G V R M R V A L S G L T M A E Y F R D V Q N Q D V

7281 GCTGTTTCAT GACAACATCT TCCGTTTCAC CCAGGCAGGT TCTGAGGTTT CCACCCTTCT GGGTCTGATG CCTTCCGCCG  
 L L F I D N I F R F T Q A G S E V S T L L G R M P S A

7361 TGGGTTACCA GCCAACCCCTG GCTGACGAGA TGGGTGTTCT CCAGGAGCGC ATTACCTCCA CCAAGGGCCG TTCGATTACC  
 V G Y Q P T L A D E M G V L Q E R I T S T K G R S I T

7441 TCTCTGCAGG CCGTTTACGT TCCTGCCGAT GACTACACCG ACCCGGCTCC AGCGACCACC TTCGCTCACT TGGATGCAAC  
 S L Q A V Y V P A D D Y T D P A P A T T F A H L D A

7521 CACCGAGCTT GACCGCTCCA TTGCTTCCAA GGGTATTTAC CCAGCAGTGA ACCCACTGAC CTCCACCTCT CGTATTCTCG  
 T T E L D R S I A S K G I Y P A V N P L T S T S R I L

7601 AGCCAGCAAT CGTTGGTGAG CGTCACTACG AGGTTTCTCA GCGTGTATC GGCATTCTGC AGAAGAACAA GGAACTTCAG  
 E P A I V G E R H Y E V S Q R V I G I L Q K N K E L Q

7681 GACATCATCG CCATCCTTGG TATGGACGAG CTTTCTGAAG AGGACAAGAT CACCGTTGCA CGTGCGCGTC GCATCGAGCG  
 D I I A I L G M D E L S E E D K I T V A R A R R I E

7761 CTTCTGGGT CAGAACTTCT TCGTTGAGCA GAAGTTCACC GGTCTTCTG GCTCTACGT GCCACTGACC GACACCGTCC  
 R F L G Q N F F V A E K F T G L P G S Y V P L T D T V

7841 ACGCTTTCGA GCGTATTGTC AACGGCGACT TCGACCACTA CCCAGATCAG GCTTCAACG GCCTCGGTGG TTTGGACGAT  
 D A F E R I C N G D F D H Y P D Q A F N G L G G L D D

7921 GTCGAAGCTG CATAACAAGAA GCTGACCGGA AAGTAAGGTA GAGACACATG GCTGAAATCA CCGTTGAACT GGTGTCTGTA  
 V E A A Y K K L T G K Stop M A E I T V E L V S V

8001 GAGCGCATGC TGTGGGCCGG CCAGGCCTCC ATCGTGACTG CACAGACCAC CGAGGGTGAG ATCGGCGTGC TGCCCGATCA  
 E R M L W A G Q A S I V T A Q T T E G E I G V L P D

8081 CGAGCCTCTT CTCGGCCAAT TGGTTGAGAA CGGTGTCGTG ACCATCCAGC CGATCGACGG CGAAAAGCTT ATCGCCGGCG  
 H E P L L G Q L V E N G V V T I Q P I D G E K L I A G

8161 TTTCGGATGG ATTCCTCTCC GTATCTAAGG AAAAGGTGAC GATCCTCGCG GACTTCGCGG TCTGGGCGAA TGAGGTTGAT  
 V S D G F L S V S K E K V T I L A D F A V W A N E V D

8241 ACCGCATCCG CCGAGGCTGA CCTTAATTCC GACGACGAGC TGGCCAAGGC ACACGCCGAG GCTGGGCTGC GCGCGGTCCG  
 T A S A E A D L N S D D E L A K A H A E A G L R A V

( $\Delta F_1F_0$ -3-for) ◀

8321 CCGCAGCAGC GAAGGTCTCT AAACCTCCGT TTAGCTGAAG TAGTAAAACC CGCTGATATT TCTAAATGAA GTATCAGCGG  
R R S S E G L Stop

8401 GTTTTGGTAT TTCTGGGTGT CGCATTAGCC CCGCTGTGGG GGTGATTTAT TGGGAGTACC TAGGGTCCTG ACAACCTATG  
8481 ATCCTTGACC TCGGCAGGAT CAACGACGGC GGTTCGCGC CAGGCGACAT TGTGAGTAGG ATCGTCTAAA ATCGTTTTCT  
8561 TATCGCAGGA AGGACTCAA AAGGCCGTGG AATATTTGAC CTGGGTTTG GTGATTGTTG CAGTGTCGGC AGTTCTTCTT  
8641 GCTGCCTGGC GGTTTTTTAC CTTACGTTCT CGGGGAACCA CTGTGATTCT GCGTGAGTTG CCACAAAGCG GTGTGCATGG  
8721 CTGGCGCCAT GGATCATTTT GCTACAACGG CAACGACTTG GAGTACTTCA AGCTGCGCTC TTTGTCTCCC ATGGCTGACC

( $\Delta F_1F_0$ -4-rev)

8801 TTATTTTGAA CCGCCTTTCA GTAACCTTTC TTGATCGTAG AGATCCAGCT GCTGATGAGG CCGTTTTTAT GICTCAAGGC  
8881 TTAAAAATTC TGCACATTA ATCCAAAAAT GATCAGATTG AATTAGCTTT GGACGCCAC GGGGAGATGG CGTTTACTGC  
8961 CTGGTTGGAA GCAGCACCAG ATGCGCGGGC GGAGCATTCA TTGAATCCAC GTGATTTCAA CCGCTTTTCA GCCAGCAAAG  
9041 ACACCCGCAA AAACCGCTAA GTAGACGTCA TTGTATGGT GGGTGCATGC GTTAGTCAAT CGCCCGTTGC TCAGTTGATT

## A2 Sequenz der Gene *cydA*, *cydB*, *cydD* und *cydC* aus *C. glutamicum*

Region des *C. glutamicum* Genoms mit den *cydAB*-Genen (Untereinheiten I und II der terminalen Cytochrom-*bd*-Oxidase) und den *cydDC*-Genen (Untereinheit eines putativen ABC-Typ Transporters), sowie der entsprechenden Proteinsequenzen. Die Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation der *cydAB*- und *cydABDC*-Gene verwendet wurden, sind unterstrichen.

1 GAATGCTGTG GATCTTCATG TTTTTGTGAA GAAGGACGAT GCCGAAGGCC TTGATTTCTT CTACCTTGGT CAAGCGCATT  
81 CAGAAAACAG CAAACAGTCA TCGATGCCCG GAAACAAAGG AGTTGTGCAA CCGGTGGTCA CAATGGATCT ACAGTTCGAC  
161 ACACCCGTCG AACAAAGCCT GTTTGAGTAC CTGAGCACAA ATCTCGCCGT AACGGAGTAA CCACCCGCAAC CAAGCGTCGA  
241 AAAGCAAAT CTTTTGACG CTTTTTGGTG ACTTGTCAAC AAGGGGAGC GAAATCAGTC ATTGACAGGA AAAGGTTGAC  
321 CACAATCGGG GTTAACTTT ATAAAGTTAA GCTGTGAGCG GGAACCTAGG AATAAACTTC AACGCAACCC TTTAAGAAGC

401 TCTTATTGGT TCTTCGTTTT GIATCGATAA ATACAATCGG TTTCTGGCT TAATAAGGCT GTTCTGTCA ACCTGCAATG  
▶ *cydA*

481 GAAGAGGAAG TGTACCTAGC GTGGATGTCG TCGACATCGC ACGGTGGCAA TTCGGAATTA CCACCGTCTA TCACTTCATT  
G R G S V P S V D V V D I A R W Q F G I T T V Y H F I

561 TTTGTCCCAC TGACCATTGG CTTAGCGCCG CTGGTCGCAA TCATGCAAAC GTTTTGGCAA GTTACCGCA AAGAGCACTG  
F V P L T I G L A P L V A I M Q T F W Q V T G K E H

641 GTATCGGGCC ACAAGATTTT TTGGCACTGT GCTGTCTATC AACTTCGCGG TTGGTGTAGC AACGGGCATT GTGCAGGAGT  
W Y R A T R F F G T V L L I N F A V G V A T G I V Q E

721 TCCAGTTCGG TATGAACTGG TCGGAATATT CGCGTTTCGT CCGTGTATGT TTCGGCGGAC CGCTGGCTTT GGAGGGTCTT  
F Q F G M N W S E Y S R F V G D V F G G P L A L E G L

801 ATCGCGTTCT TCCTTGAGTC TGTATCCTG GGACTGTGGA TTTTCGGATG GGGGAAGATT CCTGGTTGGT TGCACACTGC  
I A F F L E S V F L G L W I F G W G K I P G W L H T

881 ATCCATTTGG ATCGTTGCTA TTGCGACGAA TATTTCTGCC TATTTTATCA TCGTGGCCAA CTCGTTTATG CAGCATCCGG  
A S I W I V A I A T N I S A Y F I I V A N S F M Q H P

961 TGGGTGCTGA GTATAACCCT GAGACTGGTC GTGCGGAGCT TACTGATTTT TGGGCTCTC TCACAAATC CACCGCGCTG  
V G A E Y N P E T G R A E L T D F W A L L T N S T A L

1041 GCTGCGTTCC CGCATGCTGT TGCCGGTGGT TTTTAAACAG CTGGAACCTT CGTTCCTCGGA ATTTCCGGTT GGTGATTAT  
A A F P H A V A G G F L T A G T F V L G I S G W W I

1121 TCGTGCACAC CGTCAGGCCA AGAAGGCTGA GTCGAAAATC GAGTCGAAGC ATTCGATGCA CAGGCCCGCG TTGTGGGTTG  
I R A H R Q A K K A E S E I E S K H S M H R P A L W V

1201 GTTGGTGGAC CACAGTTGTC TCTTCCGTGG CGCTGTTTAT CACTGGCGAT ATCCAGGCCA AGCTCATGTT CGTGCAGCAG  
G W W T T V V S S V A L F I T G D I Q A K L M F V Q Q

1281 CCAATGAAGA TGGCGTCGGC GGAATCCTTG TGTGAAACCG CCACAGATCC AAACCTCTCC ATTCTGACAA TTGGTACGCA  
P M K M A S A E S L C E T A T D P N F S I L T I G T

1361 CAACAACTGC GATACGGTAA CCCACCTGAT CGATGTTCCG TTTGTGCTTC CATTCTTGGC TGAAGGAAAA TTCACCGGTG  
H N N C D T V T H L I D V P F V L P F L A E G K F T G

1441 TGACTTTGCA GGGTGTAAAC CAGCTCCAAG CTGCAGCGGA GCAAGCATA GGCCTGGCA ACTACTCCCC TAACTTGT  
V T L Q G V N Q L Q A A A E Q A Y G P G N Y S P N L F

1521 GTCACCTACT GGTCATTCCG CGCAATGATC GGCCTGATGC TTGGTICTTT GGCTATCGCT GCGATTGCGT GGCTGTTGCT  
 V T Y W S F R A M I G L M L G S L A I A A I A W L L

1601 GCGTAAGAAG CGCACACCAA CTGGAAAGAT TGCTCGTCTG TTCCAGATCG GCAGCCTCAT TGCTATCCCG TTCCCATTCT  
 L R K K R T P T G K I A R L F Q I G S L I A I P F P F

1681 TGGCCAACTC TGCTGGTTGG ATCTTCACCG AGATGGGCCG CCAGCCTTGG GTGGTGACCC CGAACCCCTGA ATCTGCCGGC  
 L A N S A G W I F T E M G R Q P W V V H P N P E S A G

1761 GATGCCCGAA CAGAGATGAT CCGGATGACT GTTGATATGG GTGTATCTGA TCATGCGCCA TGGCAAGTCT GGCTGACTCT  
 D A R T E M I R M T V D M G V S D H A P W Q V W L T

1841 CATTGGCTTC ACGATTCTCT ATCTCATTTT GTTCGTGGTG TGGGTGTGGC TGATTCCGCG CGCAGTTCG ATCGGACCAC  
 L I G F T I L Y L I L F V V W V W L I R R A V L I G P

1921 CAGAGGAAGG CGCTCCATCC GTGGAGGCAA AGACTGGACC GGCAACCCCG ATTGGTTCAG ATATGCCCAT GACACCGCTG  
 P E E G A P S V E A K T G P A T P I G S D M P M T P L

2001 CAATTTACTG CCGCTGCCCC AACCCAGGT GAAAAGGAAT AACCATGGAT CTCAATACCT TTTGGTTTAT TCTCATCGCA  
 Q F T A A A P T T G E K E Stop M D L N T F W F I L I A

2081 TTTTGTGTTG CGGGATACTT TCTCCTCGAA GGATTGACT TCGGCGTCGG AATTTTGGCA CCCATCATCG GTAAAGATTC  
 F L F A G Y F L L E G F D F G V G I L A P I I G K D

2161 AGCGGCTAGG AACACAGTGA TCCGTACGAT TGGCCTGTC TGGGACGGAA ATGAAGTGTG GCTGATCGTG GCAGGTGGCG  
 S A A R N T V I R T I G P V W D G N E V W L I V A G G

2241 CTTTGTGTTG TGCCCTCCCT GAGTGGTACG CAACGATGTT CTCGGGAATG TATCTGCCGC TGTCTCTCGT GCTTGTGTCG  
 A L F A A F P E W Y A T M F S G M Y L P L F L V L V S

2321 TTGATCATGC GCGTGGTGGG CCTTGAATGG CGCAAGAAAG TCGATGATCC TCGTTGGCAA AAGTGGTCTG ACCGGGCCAT  
 L I M R V V G L E W R K K V D D P R W Q K W S D R A

2401 CTTTATTGGT TCTTGGACTC CACCGCTGAT GTGGGGATTG ATCTTCGCCA ATATTTTGGC TGGCATGCC CTCAAGCGCG  
 I F I G S W T P P L M W G F I F A N I L R G M P L K A

2481 ATCACACCAT CGATGCTGCG GCAGCCCTTC CTGGCATGGT CAACGTCTTC GCCATTCTGG GTGCACTTGC GTTCACCGCA  
 D H T I D A A A A L P G M V N V F A I L G A L A F T A

2561 CTGTTCCGCC TTCATGGTCT CGCATTATC CGCCTGAAAA CTGCTGGTGC GTTGCGCACC GATGCGGCGA AGGCAGCTCC  
 L F A L H G L A F I R L K T A G R V R T D A A K A A

2641 AGTAGTCGCA CTTCTTGTG CGGTGACTGG TGGACCTTTC GTGTTGTGGG CTGCCATCGC ATACGGCCGT TCCTGGTCTC  
 P V V A L L A A V T G G P F V L W A A I A Y G R S W S

2721 GGATCCTCGC AGTGTGATC ATCGCAGCGG TTCTCGGTGG AGCTTTCGCA CTGATCAAAG ACCGCGATGG ATTAAGCTTC  
 W I L A V L I I A A V L G G A F A L I K D R D G L S F

2801 CTGTCCACTT CCGTCGCTGT CATCGGTGTC GTTGCACTGC TGTTTAGTTC GCTTTTCCCC AACGTCATGC CAACAACGCT  
 L S T S V A V I G V V A L L F S S L F P N V M P T T

2881 TGCTGATGGC GTGAGCCTGG ATATCTGGAA CGCCTCCGCA AGCGCCTACG CATTACTAT CCTGACTTGG ACCGCCGCTG  
 L A D G V S L D I W N A S A S A Y A F T I L T W T A A

2961 TGATCGCACC GCTGGTTGTC CTCTACCAAG GCTGGACCTA CTGGGTGTTG CGCAAACGAC TTCACGCCGA GCCAGTGTCT  
 V I A P L V V L Y Q G W T Y W V F R K R L H A E P V S

3041 GCTTAAAGTT GGAAAAATTG AGTACTAAAT CTTCAGCTCC TGCAAAAAGG CGCGCCGGCC CCGTCGATCC GCGGCTTTTG  
 A Stop L  
*cydD*

3121 CGCCTATCCC CCGCTACCCG CCGTTGGGTG ATAATCGCAG GTGTTCTCAC CGCGTTGAAA ACCCTCGCGA CAGTCGCAAT  
 R L S P A T R R W V I I A G V L T A L K T L A T V A

3201 GGGCTTGCTC ATCGGCCAGA TGGCAGCGGG CATCATGAG GTTTCGGGAA GTTCTTTGCC CCGAATGGAA CTCATCGCGC  
 M G L L I G Q M A A G I I E V S G S S L P R M E L I A

3281 TCGCCATCAC GGTGGTTGTG CGCGGACTTC TTGCGTGGGC ACAGGATCGG TTCGCGCAAC GCGCATCGTC CCAGGTGACT  
 L A I T V V V R G L L A W A Q D R F A Q R A S S Q V T

3361 GTGGATCTTC GGGAGAAAAC CCTGCGGCAC CTGGCACAAA GCGATCCCGC CACCATCGAT CAAGCCTTGT GGCGACCCG  
 V D L R E K T L R H L A Q S D P R T I D Q A L W R T

3441 TTGACCTCT GGCCTTGATG GTTTGGGGCC TTACCTCACC GGATTTTTGC CAGCTCTAGC CGCCACGATC ATTGCCACCC  
 R L T S G L D G L G P Y L T G F L P A L A A T I I A T

3521 CGGTCATGCT CGCGGIGGTG GGTGGCTGG ATGTTGGGTC CATGGTCATC GCGATCATCA CGCTCCCCCT CATTCCGGTG  
 P V M L A V V G W L D V G S M V I A I I T L P L I P V

3601 TTCATGTGGC TGGTGGGAAC ACTCACCGCA GGTCGCACCG AACAAACGCCT CAGCGACCTA GCCATTTTGG GAGGTCAGCT  
 F M W L V G T L T A G R T E Q R L S D L A I L G G Q

3681 GCTTGATCTC ATCGCAGGCT TGCCACCTT GCGAGCATT AGGCGCCACC AAGACATGGC AGCTCAGGTC ACGCGACTAT  
 L L D L I A G L P T L R A F R R H Q D M A A Q V T R L

3761 CCTCCCAACA TGCAAGCTCC ACGTTGAGCG TGCTGAAAAT CGCGTTCCTT TCCAGCTTGG TGTGGAATT TTGGCCACA  
 S S Q H A S S T L S V L K I A F L S S F V L E F L A T

3841 CTATCGGTG CATTGGTAGC GGTTGGCATC GGATTTGCGC TGCTCGCGGG CGATCTCACC CTCGCCATCG GCCTGACCGT  
 L S V A L V A V G I G F R L L A G D L T L A I G L T

3921 ACTGATCATC ATCCCAGAGG TCTACGCGCC GATCCGCGAA GTCGGCACCC GCTTCCACGA CGCCCAAGAC GCCTGTTG  
 V L I I I P E V Y A P I R E V G T R F H D A Q D G L V

4001 CCACCGATGA GATCCTAAAA TTACTCAGCG TTTCTTCGCT TGTCGACGCG CCTACCCACA CACCCCGCGA CGTTGCAGGC  
 A T D E I L K L L S V S S L V D A P T H T P R D V A G

4081 GGGCTGGAGG TGAGCGTCGA AAAGCTTCGC GCTGATGGAC GCGATGGGCC GAGGCCTGCT GATTGTGCGT TCACCGCAA  
 G L E V S V E K L R A D G R D G P R P A D L S F T A

4161 GCCTGGGCG TTAGCGGTGC TGTGGGGGCC AAACGGCAGC GGCAAATCCA CGGCCTTGCT AGCGGTGTTG GGCTTGGCGA  
 K P G Q L T V L W G P N G S G K S T A L L A V L G L A

4241 CGGAAGGCAT CACTGGAGAG GTTTCGTC AAGATGCCTC GGGCCAGGAA TTTAAGGACA GCGCATTGTG GGAGACTGCG  
 T E G I T G E V S V K D A S G Q E F K D S A L W E H C

4321 GCATATTTGC CGCAGCGGCC GGTCATTGAT CCGGAAAGTG TCAGTGATTA TCGGAACTG TCGCTTGGGC AGCGCCAACG  
 A Y L P Q R P V I D P E S V S D Y A E L S L G Q R Q

4401 GCTTGCCTG AAACGTGAGC TTGGGGCGCA ATTGCTCCTG TTGGATGAGC CGACCGCGCA CCTGGATCCA GACAACGCTG  
 R L A L K R E L G A Q L L L L D E P T A H L D P D N A

4481 CGATCATGAT CCAGCAATTG CAGGCTGAAG CCCGCCGAGG CACCACAGTA CTGGCGGTTT CGCATGATCC TTTGCTGCGT  
 A I M I Q Q L Q A E A R R G T T V L A V S H D P L L R

▲  
 ▶ *cydC*  
 Stop

4561 GCGGCTGCCG ATGAAGTGGT GGAGGTCAAA TGAACACCCT GGTAACAACT CGTTTCCGCG AGCTAATTC CGCCGTTGTT  
 A A A D E V V E V K M N T L V K L R F R E L I P A V V

4641 GCAGGTAGCG TCACGATGAT CGCCTCCATC ACCCTGACGG TGGTGTCCGC CTGGCTGATC ACCAAAGCTT GGGAAATGCC  
 A G S V T M I A S I T L T V V S A W L I T K A W E M

4721 GCCAGTGATG GATCTGACCG TGGCGGTAC CGCTGTGCGA GCCCTGGGCA TTAGCCGTCG GATGTTCCGT TATATAGAGA  
 P P V M D L T V A V T A V R A L G I S R A M F R Y I E

4801 GAATCGTTTC ACATGACTTG GCGTTGAAGG CAGCCAGCCG AGCCCGTTTC AGTGCATATC AACGCCTGGC TTCGTCGCCA  
 R I V S H D L A L K A A S R A R S S A Y Q R L A S S P

4881 AACTCTGCGT TGACGATGCG CCGCGGCGAA CTGCTTAGCC GCCTTGGTGT GGATATCGAT TCGGTTGCCG ATGTCATCGT  
 N S A L T M R R G E L L S R L G V D I D S V A D V I

4961 CCGCGCCGTC ATTCCCGCCG GAGTTGCCCT GTCACCGGA GTTGTGCGCA TCATCTTAC CGCGATTCTC AGCCCCGCAA  
 V R A V I P A G V A L L T G V V A I I F T A I L S P A

5041 CCGCACTTGT CCTGGCGATT GGATTGATTG CTGCTGCAAT TATCCCTCCC CTGCTTGCTG CTCGCGGAGT TAAAACAGCC  
 T A L V L A I G L I A A A I I P P L L A A R G V K T A

5121 GAAGCCCGGC GCGCTGAATC CAGCGAAGCC TACTTGAGTT CCTTGGATCA GGTGCTGTCC AACCAGGCGG CGCTTCGTGT  
 E A R R A E S S E A Y L S S L D Q V L S N Q A A L R

5201 TCGTGGTGAA ATGCCGCGG CTCTGTCCAA GCGGATGTTG GCTGCGCGTT CCTATTCTTC TTCACTGGAG GCAGGCGCGA  
 V R G E M P A A L S K A D V A A R S Y S S S L E A G A

5281 AAGACTGTC CATTGGCGCA GCGAGTTCCC TGTTGGATTCA CGGTTTCACT GTCATTGGTG TGCTCATGGT TTCCGCGTCA  
 K D T A I G A A S S L W I H G F T V I G V L M V S A S

5361 CTGTATGCAG ATGGAAGCCA TTCACCGCAG TGGTTTGGTG TGTTGGTGCT GCTTTCCTC GCAGCTTTCG AGGCTGTCTC  
 L Y A D G S H S P Q W F G V L V L L S L A A F E A V

5441 TGTTCTCCC GATGCTGCGA TTGCTCGTAC CCGCGCCGCA GATGCCACCA GGAGGCTTGC GGAAATCTCG GCGCTGCCAG  
 S V L P D A A I A R T R A A D A T R R L A E I S A L P

5521 AATCTGTCTC TCTTGAGCTT CGCACGGCCT CTGACCAGCC CGTATTACGC GCCGAGAATC TAGTTTATGG ATGGGACAGC  
 E S V S L E L R T A S D Q P V L R A E N L V Y G W D S

5601 GACCTAGGCA CGAGCAACCT GGATCTCACC TTTGGTTCAC GACATGAAAT CATCGCACCC TCTGGAACCTG GCAAAACGAC  
D L G T S N L D L T F G S R H E I I A P S G T G K T

5681 CCTGCTGCTC ACACTTGGCG GGCTGTTGGA ACCTCGTGGA GGCCAAGTGC TTATCGACGG CACCAATCCT TCCGAGTTGA  
T L L L T L A G L L E P R G G Q V L I D G T N P S E L

5761 AAAACGCCGT GCTGTTTCAGT CCAGAAGATG CCCACATTTT TGCCACCACT GTCCGAGATA ACTTAGCACT CGGAGCACCG  
K N A V L F S P E D A H I F A T T V R D N L A L G A P

5841 GAAGCAACCG ACGCGGAAAT GACATCGATC CTGGAACATG TTGGTTTGTG AGAGTGGGTT CAAGGTTTAC CCGATGGTCT  
E A T D A E M T S I L E H V G L S E W V Q G L P D G

5921 TGGCACTGTC CTTGATTTCAG GTGCCGATAG TCTCTCGGGA GGTCAGCGCC GCCGCTGCT CTTGCCCGC GTACTACTAA  
L G T V L D S G A D S L S G G Q R R R L L L A R V L L

6001 GTGATGCACC AATTCTGCTT TTGGATGAAC CCACCGAGCA CCTCGACACT GCAGGCTCCT CTGAAATCTT GTCTATGCTG  
S D A P I L L L D E P T E H L D T A G S S E I L S M L

6081 GCCTCCGATG AACTCCCTGG TAAAAGAGCT AGGAGAACCG TAGTGATTGT GAGGCATGTG AGGTAATTTT GCCCCGCTGT  
A S D E L P G K R A R R T V V I V R H V R Stop

6161 CTTCTGACCA GAATGATGTT AGTTGGTGGT CGTTGTGCGAC TTAGTTCATA GGGGAAAGAA TGTGCGAATA TCCACCACAG  
6241 ATTCGAGGTT TCCAGCCTTC TGTGGTGGAT TTTTGCAACT TAGCTCCCGG AATATGCAA AATCTGTTTCG ATTTTACTT  
6321 TCCAGGCCTG TTTGTGGTGA GTCCTTGATC AGCAAACACC CAGGTTTCAC ATCTACCCCA CTTGCCCAA AATGTCACCC  
6401 TCCTAGAATC GCGTTTAAGG ACCCAAACAA CCTCAACCGA CACTCTGGAC CACTCCGGAA CACCTTGACC CCTTAAATCG

### A3 Sequenz der Gene *pntA* und *pntB* aus *E. coli*

Region des *E. coli* Genoms mit den Genen *pntA* ( $\alpha$ -Untereinheit der Transhydrogenase) und *pntB* ( $\beta$ -Untereinheit der Transhydrogenase), sowie der entsprechenden Proteinsequenzen. Die Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation verwendet wurden, sind unterstrichen.

1 ATTTAGCTCG TACATGAGCA GCTTGTGTGG CTCCTGACAC AGGCAAACCA TCATCAATAA AACCGATGGA AGGGAATATC

► *pntA*

81 ATGCGAATTG GCATACCAAG AGAACGGTTA ACCAATGAAA CCCGTGTTCG AGCAACGCCA AAAACAGTGG AACAGCTGCT  
M R I G I P R E R L T N E T R V A A T P K T V E Q L

161 GAAACTGGGT TTTACCGTCG CGGTAGAGAG CGGCGCGGGT CAACTGGCAA GTTTTGACGA TAAAGCGTTT GTGCAAGCGG  
L K L G F T V A V E S G A G Q L A S F D D K A F V Q A

241 GCGCTGAAAT TGTAGAAGGG AATAGCGTCT GGCAGTCAGA GATCATTCTG AAGGTCAATG CGCCGTTAGA TGATGAAAT  
G A E I V E G N S V W Q S E I I L K V N A P L D D E I

321 GCGTTACTGA ATCCTGGGAC AACGCTGGTG AGTTTTATCT GGCCTGCGCA GAATCCGGAA TTAATGCAAA AACTTGCGGA  
A L L N P G T T L V S F I W P A Q N P E L M Q K L A

401 ACGTAACGTG ACCGTGATGG CGATGGACTC TGTGCCGCGT ATCTCACGCG CACAATCGCT GGACGCACTA AGCTCGATGG  
E R N V T V M A M D S V P R I S R A Q S L D A L S S M

481 CGAACATCGC CGGTTATCGC GCCATTGTTG AAGCGGCACA TGAATTTGGG CGCTTCTTTA CCGGGCAAAT TACTGCGGCC  
A N I A G Y R A I V E A A H E F G R F F T G Q I T A A

561 GGGAAAGTGC CACCGGCAAA AGTGATGGTG ATTGGTGGCG GTGTTGCAGG TCIGGCCGCC ATTGGCGCAG CAAACAGTCT  
G K V P P A K V M V I G A G V A G L A A I G A A N S

641 CGGCGCGATT GTGCGTGCAT TCGACACCCG CCCGGAAGTG AAAGAACAAG TTCAAAGTAT GGGCGCGGAA TTCTCGAGC  
L G A I V R A F D T R P E V K E Q V Q S M G A E F L E

721 TGGATTTTAA AGAGGAAGCT GGCAGCGCGC ATGGCTATGC CAAAGTGATG TCGGACGCGT TCATCAAAGC GGAAATGGAA  
L D F K E E A G S G D G Y A K V M S D A F I K A E M E

801 CTCTTTGCCG CCCAGGCAAA AGAGGTGCAT ATCATTGTCA CCACCGCGCT TATTCCAGGC AAACCAGCGC CGAAGCTAAT  
L F A A Q A K E V D I I V T T A L I P G K P A P K L

881 TACCCGTGAA ATGGTTGACT CCATGAAGGC GGGCAGTGTG ATTGTGACCT TGGCAGCCCA AAACGCGCGC AACTGTGAAT  
I T R E M V D S M K A G S V I V D L A A Q N G G N C E

961 ACACCGTGCC GGGTGAATC TTCACTACGG AAAATGGTGT CAAAGTGATT GGTATAACCG ATCTTCCGGG CCGTCTGCCG  
Y T V P G E I F T T E N G V K V I G Y T D L P G R L P

1041 ACGCAATCCT CACAGCTTTA CGGCACAAAC CTCGTAAATC TGCTGAAACT GTTGTGCAAA GAGAAAGACG GCAATATCAC  
 T Q S S Q L Y G T N L V N L L K L L C K E K D G N I

1121 TGTTGATTTT GATGATGTGG TGATTGCGGG CGTGACCGTG ATCCGTGCGG GCGAAATTAC CTGGCCGGCA CCGCCGATTC  
 T V D F D D V V I R G V T V I R A G E I T W P A P P I

1201 AGGTATCAGC TCAGCCGCGAG GCGGCACAAA AAGCGGCACC GGAAGTGAAA ACTGAGGAAA AATGTACCTG CTCACCGTGG  
 Q V S A Q P Q A A Q K A A P E V K T E E K C T C S P W

1281 CGTAAATACG CGTTGATGGC GCTGGCAATC ATTCCTTTTTG GCTGGATGGC AAGCGTTGCG CCGAAAGAAT TCCTTGGGCA  
 R K Y A L M A L A I I L F G W M A S V A P K E F L G

1361 CTTCACCGTT TTCGCGCTGG CCTGCGTTGT CGGTATTAC GTGGTGTGGA ATGTATCGCA CGCGCTGCAT ACACCGTTGA  
 H F T V F A L A C V V G Y Y V V W N V S H A L H T P L

1441 TGTCGGTCAC CAACGCGATT TCAGGGATTA TTGTGTGCGG AGCACTGTTG CAGATTGGCC AGGGCGGCTG GGTTAGCTTC  
 M S V T N A I S G I I V V G A L L Q I G Q G G W V S F

1521 CTTAGTTTTA TCGCGTGCT TATAGCCAGC ATTAATATTT TCGGTGGCTT CACCGTACT CAGCGCATGC TGAAAATGTT  
 L S F I A V L I A S I N I F G G F T V T Q R M L K M

1601 CCGCAAAAAT TAAGGGGTAA CATATGCTGT GAGGATTAGT TACAGCTGCA TACATTGTTG CCGCGATCCT GTTTATCTTC  
 F R K N Stop M S G G L V T A A Y I V A A I L F I F

1681 AGTCTGGCCG GCTTTTCGAA ACAIGAAACG TCTCGCCAGG GTAACAACCT CGGTATCGCC GGGATGGCGA TTGCGTTAAT  
 S L A G L S K H E T S R Q G N N F G I A G M A I A L

1761 CGCAACCATT TTTGGACCGG ATACGGGTAA TGTTGGCTGG ATCTTGCTGG CGATGGTCAT TGGTGGGGCA ATTGGTATCC  
 I A T I F G P D T G N V G W I L L A M V I G G A I G I

1841 GTCTGGCGAA GAAAGTTGAA ATGACCGAAA TGCCAGAACT GGTGGCGATC CTGCATAGCT TCGTGGTCTT GCGGCGAGTG  
 R L A K K V E M T E M P E L V A I L H S F V G L A A V

1921 CTGGTTGGCT TTAACAGCTA TCTGCATCAT GACGCGGGAA TGGCACCGAT TCTGGTCAAT ATTCACCTGA CGGAAGTGT  
 L V G F N S Y L H H D A G M A P I L V N I H L T E V

2001 CCTCGGTATC TTCATCGGGG CGGTAACGTT CACGGGTTG GTGGTGGCGT TCGGCAAACT GTGTGGCAAG ATTCGTCTA  
 F L G I F I G A V T F T G S V V A F G K L C G K I S S

2081 AACCATTGAT GCTGCCAAAC CGTCACAAAA TGAACCTGGC GGCTCTGGTC GTTTCCTTCC TGCTGCTGAT TGTATTTGTT  
 K P L M L P N R H K M N L A A L V V S F L L L I V F V

2161 CGCACGGACA GCGTCGGCCT GCAAGTCTGT GCATTGCTGA TAATGACCGC AATTGCGCTG GTATTGCGCT GGCATTTAGT  
 R T D S V G L Q V L A L L I M T A I A L V F G W H L

2241 CGCCTCCATC GGTGGTGCG ATATGCCAGT GGTGGTGTG ATGCTGAACT CGTACTCCGG CTGGGCGGCT GCGGCTGCGG  
 V A S I G G A D M P V V V S M L N S Y S G W A A A A A

2321 GCTTTATGCT CAGCAACGAC CTGCTGATTG TGACCGGTGC GCTGGTGGT TCTTCGGGGG CTATCCTTTC TTACATTATG  
 G F M L S N D L L I V T G A L V G S S G A I L S Y I M

2401 TGTAAGGCGA TGAACCGTTC CTTTATCAGC GTTATTGCGG GTGGTTTCGG CACCGACGGC TCTTCTACTG GCGATGATCA  
 C K A M N R S F I S V I A G G F G T D G S S T G D D

2481 GGAAGTGGGT GAGCACCGCG AAATCACCGC AGAAGAGACA GCGGAACTGC TGAAAAACTC CCATTACATG ATCATTACTC  
 Q E V G E H R E I T A E E T A E L L K N S H S V I I T

2561 CGGGGTACGG CATGGCAGTC GCGCAGGCGC AATATCCTGT CGCTGAAATT ACTGAGAAAAT TGC GCGCTCG TGGTATTAAT  
 P G Y G M A V A Q A Q Y P V A E I T E K L R A R G I N

2641 GTGCGTTTCG GATCCACCC GGTGCGGGG CGTTTGCTG GACATATGAA CGTATTGCTG GCTGAAGCAA AAGTACCGTA  
 V R F G I H P V A G R L P G H M N V L L A E A K V P

2721 TGACATCGTG CTGAAAATGG ACGAGATCAA TGATGACTTT GCTGATACCG ATACCGTACT GGTGATTGGT GCTAACGATA  
 Y D I V L E M D E I N D D F A D T D T V L V I G A N D

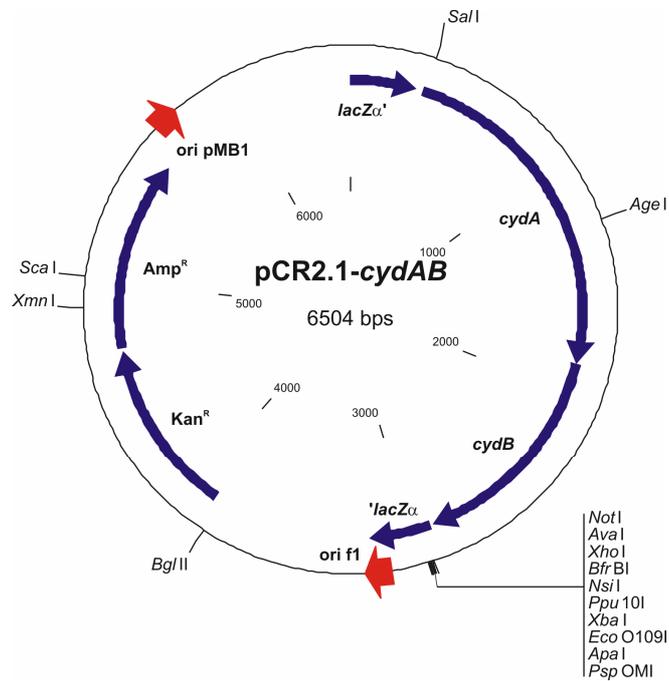
2801 CGGTTAACCC GGCGGCGCAG GATGATCCGA AGAGTCCGAT TGCTGGTATG CCTGTGCTGG AAGTGTGGAA AGCGCAGAAC  
 T V N P A A Q D D P K S P I A G M P V L E V W K A Q N

2881 GTGATTGCTT TAAACGTTT GATGAACACT GGCTATGCTG GTGTGCAAAA CCCGCTGTTC TTCAAGGAAA ACACCCACAT  
 V I V F K R S M N T G Y A G V Q N P L F F K E N T H

2961 GCTGTTTGGT GACGCCAAAG CCAGCGTGGA TGCAATCTGT AAAGCTCTGT AACCTGACG GCCTCTGCTG AGGCCGTCAC  
 M L F G D A K A S V D A I L K A L Stop

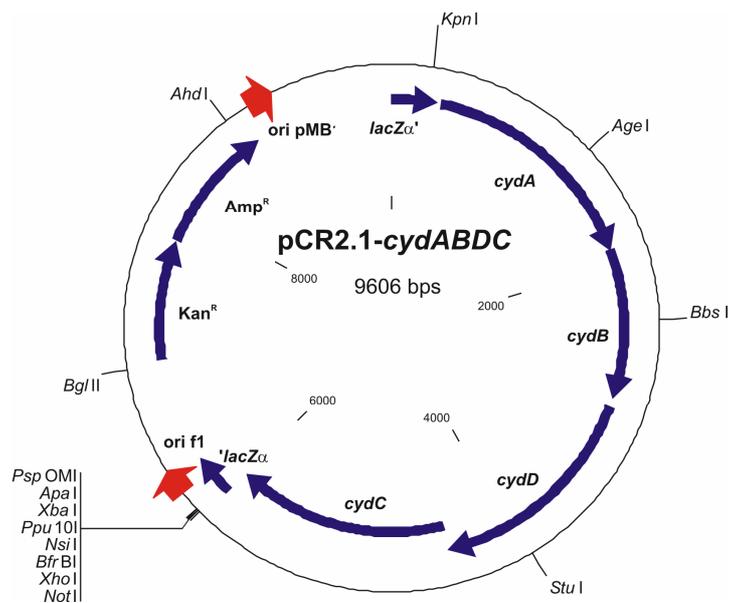
## A4 Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

### pCR2.1TOPO-*cydAB*

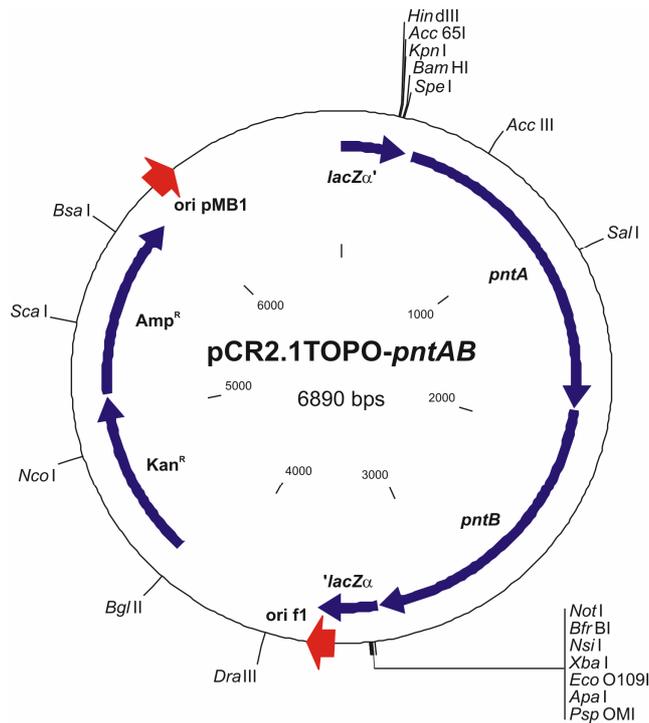


**Abbildung A1:** Plasmid pCR2.1TOPO-*cydAB* mit einem 2578 bp PCR-Fragment (Primer *cydAB*-for und *cydAB*-rev), das die *cydAB*-Gene inkl. der putativen RBS aus *C. glutamicum* enthält.

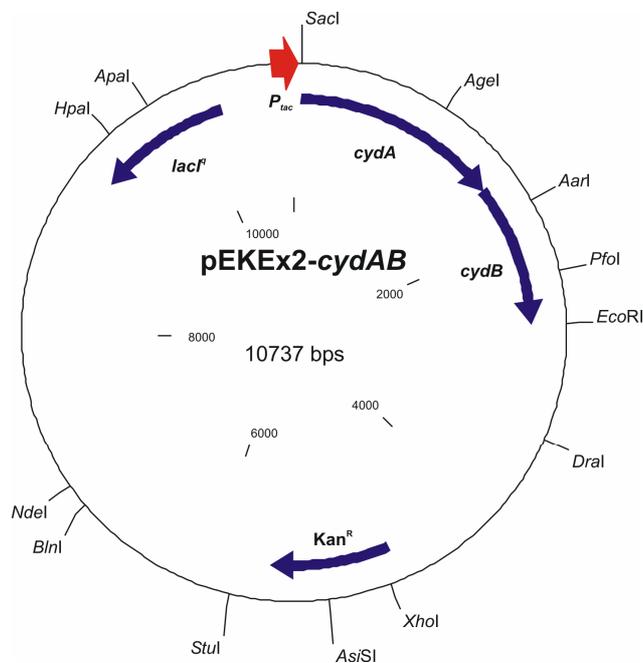
### pCR2.1TOPO-*cydABDC*



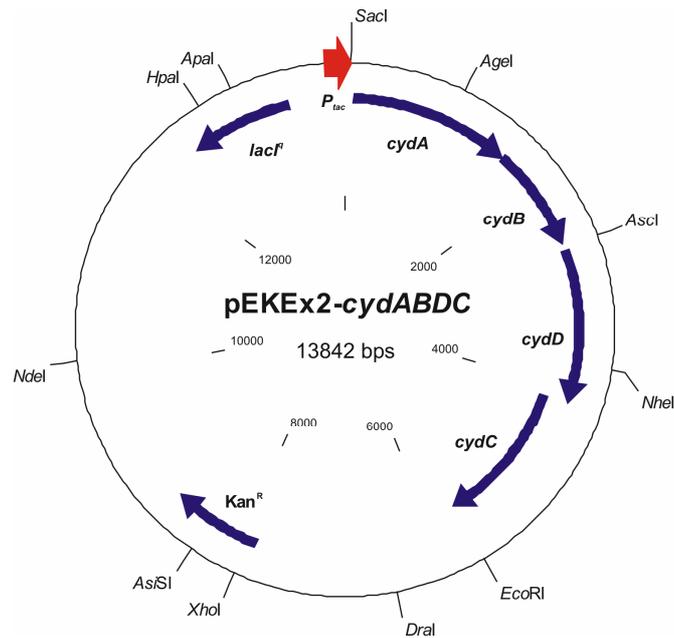
**Abbildung A2:** Plasmid pCR2.1TOPO-*cydABDC* mit einem 5683 bp PCR-Fragment (Primer *cydAB*-for und *cydABDC*-rev), das den *cydABDC*-Gencluster inkl. der putativen RBS aus *C. glutamicum* enthält.

**pCR2.1TOPO-*pntAB***

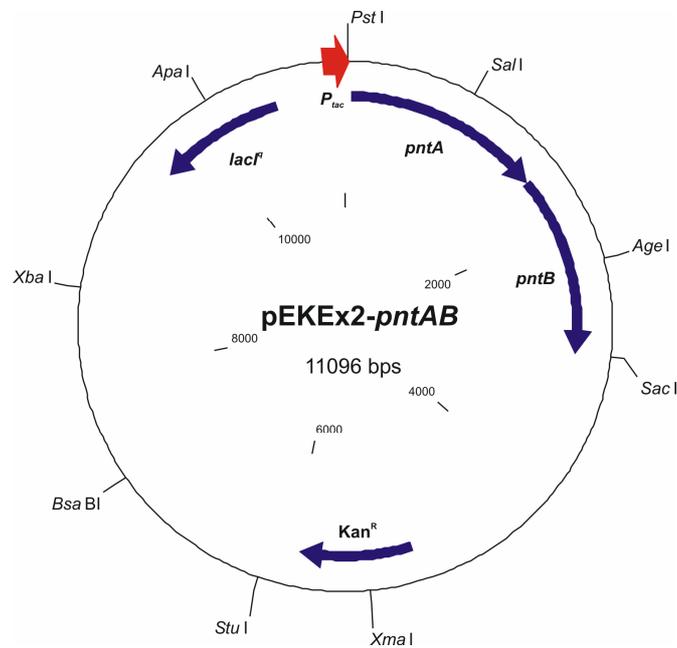
**Abbildung A3:** Plasmid pCR2.1TOPO-*pntAB* mit einem 2968 bp PCR-Fragment (Primer *pntAB*-for und *pntAB*-rev), das die *pntAB*-Gene inkl. der putativen RBS aus *E. coli* enthält.

**pEKEx2-*cydAB***

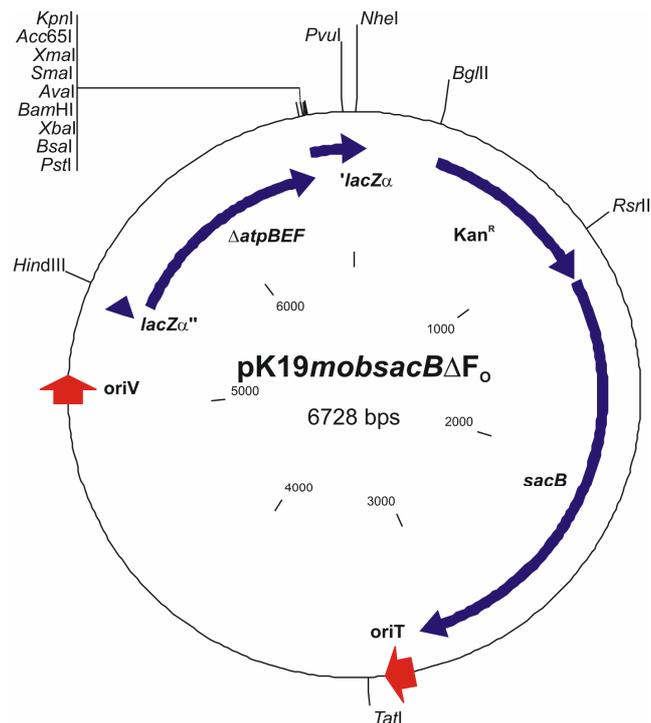
**Abbildung A4:** Plasmid pEKEx2-*cydAB* mit einem 2578 bp PCR-Fragment (Primer *cydAB*-for und *cydAB*-rev) in den SacI- und EcoRI-Schnittstellen, das die *cydAB*-Gene inkl. der putativen RBS aus *C. glutamicum* enthält.

**pEKEx2-cydABDC**

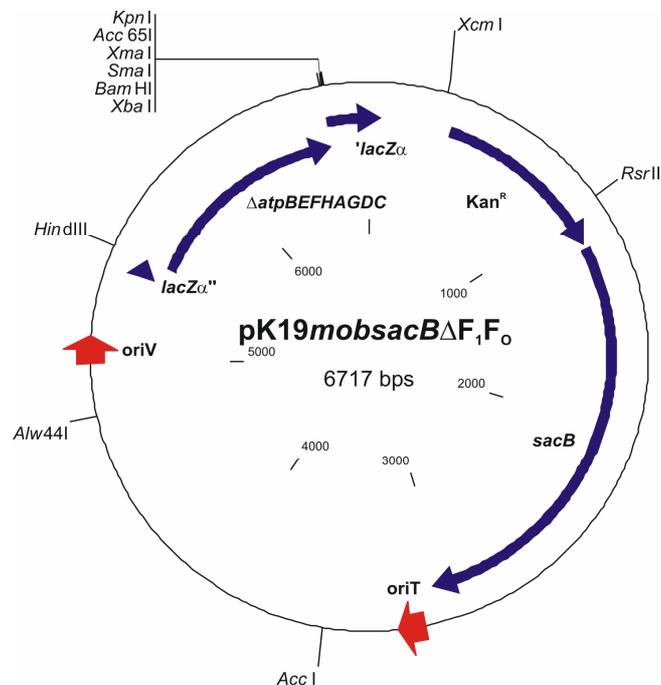
**Abbildung A5:** Plasmid pEKEx2-cydABDC mit einem 5683 bp PCR-Fragment (Primer *cydAB*-for und *cydABDC*-rev) in den SacI- und EcoRI-Schnittstellen, das die *cydABDC*-Gene inkl. der putativen RBS aus *C. glutamicum* enthält.

**pEKEx2-pntAB**

**Abbildung A6:** Plasmid pEKEx2-pntAB mit einem 2968 bp PCR-Fragment (Primer *pntAB*-for und *pntAB*-rev) in den PstI- und SacI-Schnittstellen, das die *pntAB*-Gene inkl. der putativen RBS aus *E. coli* enthält.

**pK19mobsacB $\Delta$ F<sub>0</sub>**

**Abbildung A7:** Plasmid pK19mobsacB $\Delta$ F<sub>0</sub> mit einem 1057 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer  $\Delta$ F<sub>0</sub>-1-for,  $\Delta$ F<sub>0</sub>-2-rev,  $\Delta$ F<sub>0</sub>-3-for,  $\Delta$ F<sub>0</sub>-4-rev) in den HindIII- und XbaI-Schnittstellen, das die *atpBEF*-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* enthält.

**pK19mobsacB $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>**

**Abbildung A8:** Plasmid pK19mobsacB $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> mit einem 1046 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer  $\Delta$ F<sub>0</sub>-1-for,  $\Delta$ F<sub>0</sub>-2-rev,  $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-3-for,  $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-4-rev) in den HindIII- und XbaI-Schnittstellen, das die *atpBEFHAGDC*-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* enthält.

## A5 MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerprintanalyse

**Tabelle A1:** Peptidmassenfingerprintanalyse löslicher Proteine von *C. glutamicum* ATCC 13032 und ATCC 13032 $\Delta$ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>, die durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Die Nummerierung bezieht sich auf die Proteinspots der Abbildungen 4.27 bzw. 4.28. Die  $\Delta$ ppm-Werte geben die Abweichung der experimentell bestimmten zu den berechneten monoisotopischen Massen an.

Nr.	Protein (Gen)				Sequenz- abdeckung
	m/z	$\Delta$ ppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
<b>1</b>	<b>SufB (<i>sufB</i>)</b>				<b>31 %</b>
	1338.5811	-22.4885	220-230	(R)INTENMGQFER(T)	
	1419.6458	-36.5075	438-450	(R)GLAEEEEAMAMIVR(G)	
	1431.6628	-29.7821	56-66	(K)KSEPEWMLQQR(L)	
	1477.7005	-36.0833	116-128	(K)NTYDKLGIPEAEK(Q)	
	1477.7005	-24.0663	459-470	(K)ELPMEYALELNR(L)	
	1514.7650	-31.0086	207-219	(K)GVHVDIPLQAYFR(I)	
	2010.9288	-24.0870	327-346	(K)GEVLSVAFAGEGQFQDTGAK(M)	
	2030.0049	-16.6471	188-206	(K)FSALNSAVWSSGGSFIYVPK(G)	
	2079.9611	-34.0847	347-365	(K)MTHMAPYTSSNIVSKSVAR(G)	
	2132.0683	-21.4494	131-149	(R)LVAGVAAQYSEVVYHQIR(E)	
<b>2</b>	<b>Katalase (<i>katA</i>)</b>				<b>47 %</b>
	974.3999	-93.2143	5-13	(K)SAADQIVDR(G)	
	1111.4502	-93.0437	350-358	(R)IFAYADQQR(Y)	
	1470.4900	-82.4388	173-183	(R)DADMQWDFWTR(A)	
	1486.4767	-87.0742	173-183	(R)DADMQWDFWTR(A)	1Met-ox
	1611.6249	-76.2247	276-288	(K)VQIMPFEDAENYR(W)	
	1627.6250	-72.2968	276-288	(K)VQIMPFEDAENYR(W)	1Met-ox
	1637.6230	-81.2163	108-122	(R)FSTVAGEQGSPTWR(D)	
	1674.6680	-73.4311	184-198	(R)APESAHQVTYLMGDR(G)	
	1679.7830	-79.2361	302-315	(K)DYPLIPVGYFILNR(N)	
	1690.6570	-76.2518	184-198	(R)APESAHQVTYLMGDR(G)	1Met-ox
	1827.6929	-75.1071	492-506	(R)VYDYWNNVDENLGAR(V)	
	1831.7167	-79.0378	448-462	(K)HQDDDDFIQPGILYR(E)	
	1886.8197	-80.9735	367-382	(R)DLPVNRPIEVNTYSR(E)	
	2016.8236	-70.6267	473-491	(R)LADNISNAMQGISEATEPR(V)	
	2089.8390	-68.9192	74-92	(K)GHGAFGELHITEDVSEYTK(A)	
	2276.8377	-61.1782	383-402	(R)EGSMQYIFDAEGEPSYSPNR(Y)	
	2292.8716	-43.7450	383-402	(R)EGSMQYIFDAEGEPSYSPNR(Y)	1Met-ox
	2363.9703	-81.2674	443-462	(R)AAVVKHQDDDDFIQPGILYR(E)	
	2496.9914	-70.5517	131-151	(R)FYTEEGNYDIVGNNTPTFFLR(D)	
	2682.9806	-67.6903	383-405	(R)EGSMQYIFDAEGEPSYSPNRYDK(G)	
	2699.0164	-52.1388	383-405	(R)EGSMQYIFDAEGEPSYSPNRYDK(G)	1Met-ox
	2767.2777	-59.3356	319-344	(R)NFFAQIEQLALDPGNIVPGVGLSPDR(M)	

weiter auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung</i>					
Nr.	Protein (Gen)				Sequenz- abdeckung
	m/z	$\Delta$ ppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
<b>3</b>	<b>2-Methylcitrat- Dehydratase-3 (<i>prpD3</i>)</b>				<b>12 %</b>
	1083.5533	-4.9563	76-85	(R)A AFFNSALSR(Y)	
	1363.6405	-6.5362	280-291	(R)AQEGFNVDNIEK(I)	
	1707.7910	-10.5929	147-164	(K)GFDHTTQGAFAGASAAK(A)	
	1989.9648	-4.7330	262-279	(K)HNAEIHSQSALDAAQEIR(A)	
<b>4</b>	<b>Protein chain release factor A</b>				<b>24 %</b>
	1079.4404	-46.8682	310-317	(R)TYNWPENR(I)	
	1416.6523	-31.5675	53-65	(R)DLVSAQEDLEAAR(E)	
	1468.7406	-34.4574	41-52	(R)YSELQPIINVHR(D)	
	1617.7729	-31.3922	113-129	(K)AGAGGEEAALFAGDLLR(M)	
	1775.8039	-31.4702	279-295	(R)LQAMKEEEEEAAEAATGR(A)	
	1791.7466	-60.3103	279-295	(R)LQAMKEEEEEAAEAATGR(A)	1Met-ox
	2347.1035	-39.7470	92-112	(K)LADLLAPRDPHDGEDIVMEIK(A)	
<b>5</b>	<b>SufD (<i>sufD</i>)</b>				<b>62 %</b>
	945.4775	-62.7933	302-310	(R)SLVLTEGAR(A)	
	947.3696	-67.4991	33-39	(R)GRDEEWR(F)	
	1218.5542	-62.6369	279-288	(R)TCWVGDLIR(S)	
	1272.5987	-56.0836	204-215	(R)HTVATFGGEVVR(I)	
	1293.5981	-58.4584	247-257	(R)LLVDHAVPNCR(S)	
	1435.5479	-50.3589	289-301	(R)SNAHGTDTYEANR(S)	
	1539.6402	-53.9478	336-347	(R)FDDEHVFYLQAR(G)	
	1565.6778	-96.3895	114-128	(K)NSHNPTPVTITVTGK(G)	
	1571.6847	-59.2447	264-278	(K)GALQGDKNSDKPDAR(T)	
	1847.9165	-46.2434	361-376	(R)GFFNEVINKVPVESIR(G)	
	1871.7883	-49.8034	17-32	(K)GDLFSSFNVEDFEIPR(G)	
	2460.1684	-47.2445	311-335	(R)ADAIPNLEIETGQIVGAGHAATVGR(F)	
	2773.3401	-35.4974	174-198	(R)LTVITDTHWNADAVHLSNQLAQLGR(D)	
	2784.0948	-46.8212	222-246	(R)FTAPGGDAEMLGVYFADDGQYFEQR (L)	
	2800.0927	-45.4883	222-246	(R)FTAPGGDAEMLGVYFADDGQYFEQR (L)	1Met-ox
	3319.4858	-36.8774	48-80	(R)GLHNGEFAPATTSVTVVEIPADAEGAS HEVVAK(D)	

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung					
Nr.	Protein (Gen)				Sequenz- abdeckung
	m/z	$\Delta$ ppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
<b>6</b>	<b>2-Methylcitrat- Dehydratase-3 (<i>prpD3</i>)</b>				<b>12 %</b>
	1083.5533	-4.9563	76-85	(R)A AFFNSALSR(Y)	
	1363.6405	-6.5362	280-291	(R)AQEGFNVDNIEK(I)	
	1707.7910	-10.5929	147-164	(K)GFDHTTQGAFAGASA(A)	
	1989.9648	-4.7330	262-279	(K)HNAEIHQSALDAAQEIR(A)	
<b>7</b>	<b>Malic enzyme (<i>malE</i>)</b>				<b>67 %</b>
	907.4415	-64.5641	305-313	(K)YGAI VATGR(S)	
	1168.5528	-71.7550	100-110	(K)AQLFSSFAGLK(A)	
	1565.7543	-47.5579	226-239	(R)GIHDSREDLSPVK(A)	
	1897.9168	-37.0117	347-365	(K)LAAAEAIADIAAEDLEVGR(I)	
	2026.8658	-40.0710	8-25	(R)STQNLTHEEIFEHEGGK(L)	
	2384.1890	-36.4930	159-180	(R)LDIPVMHDDQHGTAVVILAALR(N)	
	2400.1450	-52.4591	159-180	(R)LDIPVMHDDQHGTAVVILAALR(N)	1Met-ox
	2441.2687	-20.7345	314-337	(R)SDLPNQINNVLAFPGIFAGALAAK(A)	
	2731.2651	-35.2031	39-63	(R)DLSLAYTPGVAQVCEAIKEDPEVAR(T)	
	2764.3836	-23.4088	280-304	(K)LMAPEPILFTLANPTPEIDPELSQK(Y)	
	2879.3794	-21.9695	250-279	(R)GISGGINEAFTGADLFIGVSGGNIGEDA LK(L)	
	2927.4382	-38.5942	195-225	(K)IVISGAGAAGVAAVDMLTNAGATDIVVL DSR(G)	
	2943.4265	-40.6367	195-225	(K)IVISGAGAAGVAAVDMLTNAGATDIVVL DSR(G)	1Met-ox
	3475.7094	-29.1431	64-99	(R)THTGIGNTVAVISDGTAVLGLGDIGPQA SLPVMEGK(A)	
<b>8</b>	<b>N.-D. Zucker Epim.<sup>§</sup></b>				<b>27 %</b>
	1389.6862	-26.1520	45-57	(R)SEIEALGATTLER(D)	
	1450.6543	-29.2167	73-86	(K)DFDVVWSAGNGGK(N)	
	1812.9177	-15.3729	98-116	(R)DAAIASIDGAASLGEKAPR(Y)	
	2008.9809	-12.1216	40-57	(R)NPDHRSEIEALGATTLER(D)	
	2636.2475	-12.4537	87-113	(K)NGADATYAIDRDAAIASIDGAASLGEK (A)	

weiter auf der nächsten Seite

§ Nucleosid-Diphosphat Zucker Epimerase

Fortsetzung					
Nr.	Protein (Gen)			Sequenz- abdeckung	
	m/z	$\Delta$ ppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
<b>9</b>	<b>Polyphosphat- Glucokinase (<i>ppgK</i>)</b>				<b>33 %</b>
	1549.7267	-95.1794	197-211	(K)LFSPSVFIIGGISR(K)	
	1549.7267	-57.6515	235-250	(R)AGIVGAAMAVNQHLTP(-)	
	1565.6936	-74.9860	235-250	(R)AGIVGAAMAVNQHLTP(-)	1Met-ox
	1574.6536	-67.7573	84-96	(K)SWIGTDVHELFD(R)(H)	
	2010.9338	-61.4726	216-232	(K)WLPLMELDTDIVPAELR(N)	
	2387.0381	-61.2421	102-125	(R)EITVLNDADAAGIAEATFGNPAAR(E)	
<b>10</b>	<b>Dps (<i>dps</i>)</b>				<b>73 %</b>
	906.4686	0.0635	91-97	(R)TPLQYER(N)	
	1009.4713	12.1114	63-71	(R)GYADEVAER(I)	
	1071.5941	13.3188	16-24	(K)QLIDGLQER(L)	
	1135.6650	15.4110	112-121	(R)VYTQVLTGVR(E)	
	1457.8168	11.2207	25-36	(R)LDYNDLHLILK(H)	
	1522.8061	21.9589	98-111	(R)NAGNVQAHLTDLNR(V)	
	1833.9919	25.0969	72-90	(R)ISTLGGAPVGTPEGHVADR(T)	
	2510.2279	-53.3463	16-36	(K)QLIDGLQERLTDYNDLHLILK(H)	
	2705.2598	-22.4173	1-24	(-)MANYTVPGINENDAKQLIDGLQER(L)	1Met-ox
	2721.5144	43.4934	72-97	(R)ISTLGGAPVGTPEGHVADRTPPLQYER (N)	
	3023.6044	24.1531	37-62	(K)HVHWNVTGPNFIAVHEMLDPQVDLVR (G)	
<b>11</b>	<b>Hypoth. Protein</b>				<b>19 %</b>
	1434.6979	-47.9370	116-128	(R)TMTSGWALVIDLK(G)	
	1438.6349	-86.1908	87-99	(R)GQIQMLAAVAHQ(R)	1Met-ox
	1450.6167	-99.8566	116-128	(R)TMTSGWALVIDLK(G)	1Met-ox
	1789.7819	-74.8538	39-54	(R)FPNGTVMDDLVISIPR(D)	1Met-ox
<b>12</b>	<b>50 S ribosom. Protein L12</b>				<b>28 %</b>
	915.4743	-84.2987	81-89	(R)ELVSGGLK(E)	
	1438.6066	-99.9414	15-26	(K)EMTLIELSEFVK(E)	
	1515.6584	-70.6392	101-115	(K)AILEGANKDDAEAAK(A)	

## Danksagungen

Ein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Michael Bott für die Überlassung des interessanten Themas, die erstklassige und intensive Betreuung, das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat sowie der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Weiss danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Sahm bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am IBT1 und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Der Degussa danke ich für die finanzielle Unterstützung und das stete Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Andreas, Axel, Brita, Christian, Christina, Jens, Julia, Kerstin, Lena, Marc, Melanie, Martina, Mirja, Sabina, Sabine, Sarah, Sonja, Steffen und Tanja möchte ich für die gute fachliche Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und vor allem für die angenehme Atmosphäre während der gemeinsamen Zeit im Büro und Labor danken.

Ein besonderer Dank gilt Melanie für die leider viel zu seltenen privaten Treffen, aber insbesondere dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine fachlichen und privaten Gespräche hat. Schön, dass es Menschen wie Dich gibt!

Weiterhin sei allen Institutsangehörigen an dieser Stelle für die nette Atmosphäre und die stets gewährte Unterstützung gedankt.

Michael Stolz und Roman möchte ich an dieser Stelle für die vielen kleinen und großen „Schwätzchen“ danken.

Ansgar, Diana, Frank, Hajo, Peter, Michael Esser, Manu und Sascha danke ich für die abwechslungsreichen und gemütlichen Abende bei einem Bier mehr oder weniger. Insbesondere aber dafür, dass wir es trotz kleinerer und größerer Entfernungen immer noch schaffen uns zu treffen.

Bei Oliver möchte ich mich für die unzähligen Klettertage, die gemütlichen „Zocker-Abende“, aber vor allem für seine stete Gesprächsbereitschaft bedanken.

Ein ganz lieber Dank gilt Katrin, die mich trotz vieler Entbehrungen durch einen großen Teil meines Lebens begleitet hat. Danke für alles! Und wieder einmal: Alles ist gut!

Ein ganz besonders lieber Dank gilt Mirja für ihr Verständnis, ihre permanente Hilfsbereitschaft und die vielen sinnigen und unsinnigen Gespräche. Vor allem aber dafür, dass sie trotz meines zickigen Gemüts immer noch zu mir steht und mir den nötigen Halt in jeder Lebenslage gibt.

Ein grenzenloser und besonders lieber Dank gilt meiner Familie, die mich mit Fürsorge, Verständnis, Aufmunterungen und unzähligen, unbezahlbaren Unterstützungen durch Studium und Doktorarbeit begleitet hat.

## **Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Neuss, den 01.02.2006