

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Untersuchung des Zentralstoffwechsels von
Gluconobacter oxydans durch die Etablierung
eines markerfreien Deletionssystems

Diplom-Biologin Anja Junker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

2. apl. Prof. Dr. M. A. Ehrmann

Die Dissertation wurde am 26.09.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.03.2012 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

I. Einleitung

1. *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter oxydans gehört zu den Essigsäurebakterien (*Acetobacteraceae*), die taxonomisch den α -Proteobakterien zuzuordnen sind (De Ley, 1984). Die wichtigsten Gattungen der Essigsäurebakterien sind *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* und *Kozakia* (Sievers, 2005).

Die Bezeichnung Essigsäurebakterien beruht auf der Oxidation von Ethanol zu Essigsäure (De Ley, 1981; De Ley, 1984). Nach der kompletten Oxidation von Ethanol können die Gattungen *Acetobacter*, *Acidomonas* und *Gluconacetobacter* die Essigsäure vollständig zu Kohlenstoffdioxid und Wasser oxidieren, weshalb man sie als Peroxidanten zusammenfasst. Die Gattungen *Asaia* und *Kozakia* oxidieren Essigsäure nur schwach weiter, wohingegen *Gluconobacter* dazu nicht fähig ist (De Ley, 1984; Kersters *et al.*, 2006), weshalb diese Gattung als Suboxidanten bezeichnet wird.

Gluconobacter Spezies findet man in zuckerreichen Biotopen (z.B. Früchten, Blütenpflanzen), in alkoholischen Getränken (z.B. Bier, Wein) sowie in Softdrinks (Battey and Schaffner, 2001; Gupta *et al.*, 2001). Die Klassifikation von *Gluconobacter* Spezies beruht auf chemotaxonomischen und phänotypischen Merkmalen sowie DNA-DNA Hybridisierung und rDNA-Sequenzierung. Dadurch konnte *Gluconobacter* in vier Spezies unterteilt werden: *G. oxydans*, *G. asaii*, *G. cerinus* und *G. frateurii* (Yamada and Akita, 1984a; Yamada *et al.*, 1984c; Micales *et al.*, 1985; Mason and Claus, 1989; Sievers *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1999).

G. oxydans ist ellipsoid bis stäbchenförmig, Gram-negativ, chemoorganotroph und obligat aerob. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen zwischen 25 °C - 30 °C und einem pH-Wert von 5.0-6.0 (De Ley, 1984). Allerdings kann *G. oxydans* auch bis unterhalb von pH 3 wachsen (Olijve, 1979a).

2. Physiologische und biochemische Fähigkeiten von *G. oxydans*

2.1 Metabolismus

2.1.1 Glykolyse / Gluconeogenese

Die Glykolyse repräsentiert einen weit verbreiteten Abbauweg von Kohlenhydraten, wobei Pyruvat entsteht. Des Weiteren trägt sie zur Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) sowie zur Erzeugung von NADH bei. Frühere Experimente wiesen in *G. oxydans* auf eine unvollständige Glykolyse hin (Stouthamer, 1959; Leisinger, 1965). Mit Hilfe der Sequenzierung des Genoms konnte das Fehlen des Schlüsselenzyms, der Phosphofruktokinase, festgestellt werden (Prust *et al.*, 2005). Sie katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die Umwandlung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat. In der Gluconeogenese fehlt *G. oxydans* ein wichtiges Enzym, die Phosphoenolpyruvat-Synthetase (Prust *et al.*, 2005). Weiterhin konnte auch keine Pyruvat-Phosphat-Dikinase oder andere Enzyme nachgewiesen werden, die in der Lage sind aus Pyruvat oder Oxalacetat Phosphoenolpyruvat zu synthetisieren (Prust, 2004). Für einen Ausgleich zur Glykolyse bietet sich der Pentose-Phosphat-Weg sowie der Entner-Doudoroff-Weg an, da alle Enzyme im Genom nachgewiesen werden konnten (Prust *et al.*, 2005).

2.1.2 Pentose-Phosphat-Weg (PPW)

Der Pentose-Phosphat-Weg stellt eine Möglichkeit zur Verwertung von Kohlenhydraten dar, bei der Reduktionsäquivalente in Form von NADPH generiert werden. Gleichzeitig wird Ribose-5-Phosphat gebildet, ein Grundbaustein für die Biosynthese von Nukleotiden.

Mittels der Genomanalyse konnten alle Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges identifiziert werden (Prust *et al.*, 2005). Dabei befanden sich eine Mehrzahl der Gene in einem Cluster (Prust, 2004). Eine weitere Besonderheit war, dass das Gen für die Transaldolase-Reaktion im unteren Teil des Pentosephosphat-Weges ein bifunktionales Enzym ist. Es weist zusätzlich eine Glucose-6-

Phosphat-Isomerase Funktion auf, wie sie im oberen Teil der Glykolyse verwendet wird. Dadurch kann Fructose-6-Phosphat in den PPW eingeschleust werden (Prust, 2004). Ein funktionelles Phosphotransferasesystem zur Phosphorylierung von Glucose fehlt in *G. oxydans*, jedoch wird durch die Glucokinase Glucose zu Glucose-6-phosphat umgewandelt.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass der PPW einer der Hauptwege des Kohlenhydrat Abbaus in *G. oxydans* ist (Kitos *et al.*, 1958; De Ley, 1984). Zum Beispiel wurde die Dissimilation von Glukose und Glukonat zu Kohlenstoffdioxid in *G. oxydans* untersucht. Dabei zeigten radioaktive C-14 Markierungsexperimente, dass die eingesetzten Substrate zum größten Teil in Pentosephosphate umgewandelt wurden. Des Weiteren wurde in Anwesenheit von Sauerstoff nahezu alles Kohlenstoffdioxid durch den PPW produziert (Kitos *et al.*, 1958). Eine ähnliche Studie in *Acetobacter aceti*, einem nahen Verwandten von *G. oxydans*, zeigte, dass 6% der Glukose zu CO₂ abgebaut wird. Dabei erfolgt die Decarboxylierung ausschließlich am C₁-Atom, wodurch der PPW einer der Hauptabbauwege für Glukose ist (Fluckiger and Ettliger, 1977).

Eine andere interessante Tatsache ist, dass die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase sowohl NAD als auch NADP als Coenzyme verwenden können und somit für die NADH Regeneration mit verantwortlich sind (Tonouchi *et al.*, 2003). Das gebildete NADH kann anschließend in die Atmungskette weitergeleitet werden, was der Energiebereitstellung dient.

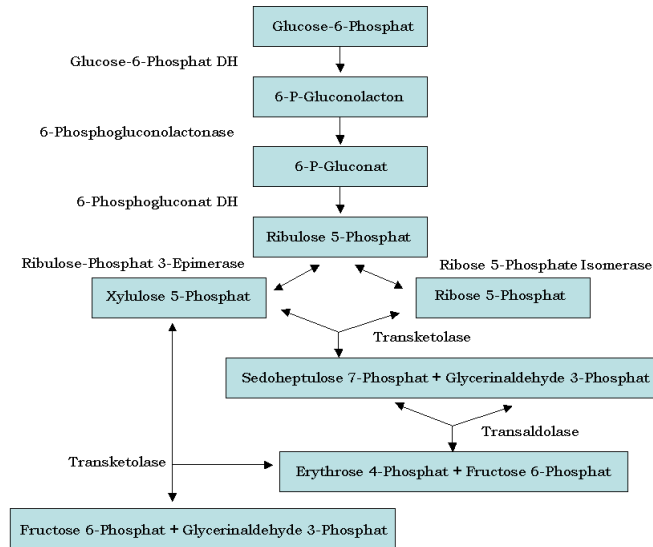


Abb.I.1: Schematische Darstellung des Pentose-Phosphat-Weges

Die oxidativen Schritte sind im oberen Teil dargestellt, der untere Abschnitt zeigt die reversiblen Reaktionen der Transaldolase und Transketolase durch die eine Isomerisierung von Aldosen zu Ketosen erfolgt.

2.1.3 Entner-Doudoroff-Weg (2-Keto-3-desoxy-phosphogluconat-Weg oder KDPG-Weg)

Eine Alternative zur Glykolyse ist der Entner-Doudoroff-Weg (ED), der ebenfalls durch den Abbau von Zuckern zur Energiegewinnung beiträgt. Er wurde als erstes in *Pseudomonas saccharophila* entdeckt (Entner and Doudoroff, 1952). Allerdings beträgt die Energieausbeute lediglich 1 ATP, wohingegen 2 ATP in der Glykolyse gewonnen werden. Der ED-Weg wurde bisher am häufigsten in Gram-negativen Bakterien nachgewiesen (Conway, 1992). Durch die Genomanalyse konnten alle Gene für den ED-Weg in *G. oxydans* identifiziert werden (Prust *et al.*, 2005). Aus einem Molekül Glucose entstehen zwei Moleküle Pyruvat. Anders als bei der normalen Glykolyse wird das charakteristische Zwischenprodukt, 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat, gebildet (Abb. 2). Der ED-Weg dient z.B. in *E. coli* zur Verstoffwechslung von Gluconat und anderen verwandten organischen Säuren. Die genaue Rolle des ED-Weges in *G. oxydans* ist noch unbekannt.

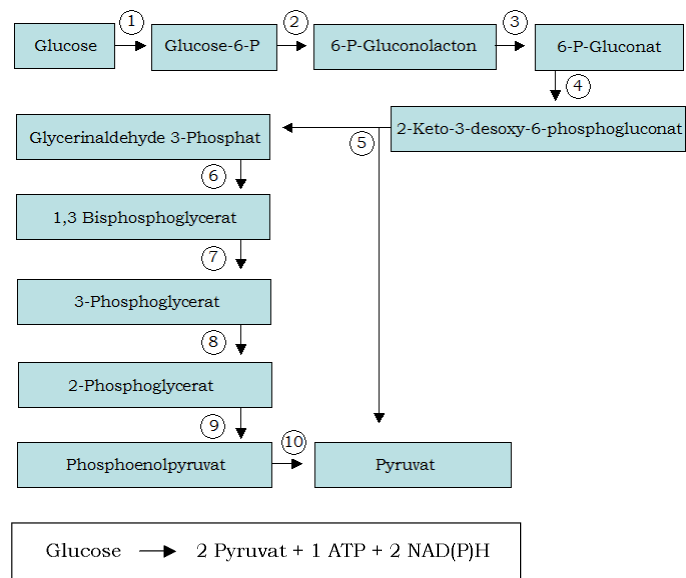


Abb.II.2: Schematische Darstellung des Entner-Doudoroff-Weges

Zuerst wird Glucose-6-P mit Hilfe der beiden Enzyme Glucose-6-P-Dehydrogenase und Gluconolactonase in 6-Phosphogluconat und später in 6-Phosphogluconolacton umgewandelt. Die Oxidation von Glucose-6-P erfolgt durch die Kopplung mit der Reduktion von NADP⁺ zu NADPH. Anschließend wird 6-Phosphogluconat zu KDPG dehydratisiert. KDPG wird dann mit Hilfe der KDPG Aldolase in ein Molekül Pyruvat und ein Molekül Glycerinaldehyd-3-P gespalten. Das Zwischenprodukt Glycerinaldehyd wird mittels weiterer enzymatischer Reaktionen zu einem weiteren Pyruvat umgesetzt. 1) Hexokinase (ATP-ADP) 2) Glucose-6-Phosphat-DH (NADP⁺-NADPH); 3) Gluconolactonase; 4) 6-Phosphogluconat Dehydratase; 5) KDPG-Aldolase; 6) Glycerinaldehyd-DH (NAD⁺ - NADH); 7) Phosphoglycerat-Kinase (ADP-ATP); 8) Phosphoglycerat-Mutase; 9) Enolase; 10) Pyruvat-Kinase (ADP - ATP)

2.1.4 Zitronensäurezyklus (TCC)

Der Zitronensäurezyklus ist ein zentraler Kreislauf, der normalerweise dem Abbau von Acetyl-CoA zum Zwecke der Energiegewinnung und der Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesen dient. Anhand von früheren Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, dass *G. oxydans* nicht in der Lage ist C₄-Dicarbonsäuren, α-Ketoglutarat, Citrat und Isocitrat zu oxidieren (King and Cheldelin, 1953; Stouthamer, 1959). Des Weiteren konnte keine Enzymaktivität für die Succinat-Dehydrogenase nachgewiesen werden (Greenfield, 1972), was später mittels der Genom-Analyse bestätigt wurde, da keine Gene, die für die Succinat-Dehydrogenase oder für die Succinat-Thiokinase kodieren, nachgewiesen werden konnten (Prust *et al.*, 2005). Diese Beobachtung belegen einen unvollständigen TCC. In Folge dessen wird das Schlüsselintermediat

Acetyl-CoA nicht vollständig zu Kohlenstoffdioxid oxidiert. Somit stellt der TCC in *G. oxydans* lediglich eine Quelle für Intermediate des Anabolismus dar. Da dieser alle Enzyme des oxidativen Zweiges des TCC besitzt, kann er Citrat zu Succinyl-CoA umwandeln (Prust *et al.*, 2005), welches als Ausgangsstoff bei der Synthese von Porphyrine dient. Der reduktive Teil des TCC besteht aus einer membrangebundenen Malat-Dehydrogenase sowie eine Fumarase, die zur Bildung oder zum Abbau von Fumarat dienen könnte (Prust, 2004).

2.2 Dehydrogenasen und deren Anwendung in der Biotechnologie

Ein Charakteristikum für *Gluconobacter*-Spezies ist die schnelle und unvollständige Oxidation einer Vielzahl von Zuckern, Alkoholen und Polyolen (Gupta *et al.*, 2001; Deppenmeier *et al.*, 2002). Die Oxidation der Substrate erfolgt dabei durch membrangebundene, stereo- und regioselektive Dehydrogenasen, die an die Atmungskette gekoppelt sind. Dabei ragt das aktive Zentrum der Enzyme in den periplasmatischen Raum. Die unvollständig oxidierten Produkte werden direkt ins Medium ausgeschieden. Diese Eigenschaft ist in der Biotechnologie von großer Bedeutung. Da der Substrat- und Produkt-Transport durch die Cytoplasmamembran entfällt, wird die Produktaufreinigung vereinfacht und daher ist ein Zellaufschluss nicht mehr notwendig (Deppenmeier *et al.*, 2002).

G. oxydans wird in vielen biotechnologischen Verfahren verwendet z.B. wird der Organismus in der Lebensmittelindustrie, sowie in der pharmazeutischen und chemischen Industrie eingesetzt. Ein Beispiel ist die Produktion von Speiseessig, welches durch die oxidative Fermentation alkoholhaltiger Flüssigkeiten mit Essigsäurebakterien entsteht. Diese Aufbereitung zählt zu den ältesten Lebensmittelherstellungsverfahren der Menschheit. In *Gluconobacter* Stämmen entsteht Essig durch zwei enzymatische Schritte. Als erstes erfolgt die Umsetzung von Ethanol zu Acetaldehyd mittels der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (Matsushita *et al.*, 1999). Das entstandene Acetaldehyd wird anschließend durch die

membrangebundene Aldehyd-Dehydrogenase zu Essigsäure weiter oxidiert (Matsushita *et al.*, 1994).

In der pharmazeutischen Industrie wird u.a. durch die Kombination von biotechnologischen und chemischen Schritten das Diabetesmedikament Miglitol hergestellt. Dabei wird D-Glucose durch eine chemische Aminierung zu 1-Amino-Sorbitol umgesetzt, welches anschließend durch den Einsatz von *G. oxydans* zu 1-Amino-D-Sorbose umgewandelt wird. Diese stereo- und regioselektive Oxidation von 1-Amino-Sorbitol wird mittels der Sorbitol-Dehydrogenase durchgeführt. Durch einen anschließenden chemischen Ringschluss wird Miglitol synthetisiert (Campbell *et al.*, 2000; Schedel, 2000). Des Weiteren kann *G. oxydans* mittels seiner membrangebundenen Glyzerin-Dehydrogenase Glyzerin zu Dihydroxyaceton unvollständig oxidieren, welches als Selbstbräuner in der Kosmetik Verwendung findet (Claret, 1994). Ein weiteres biotechnologisches relevantes Produkt ist 5-Ketoglukonat, welches für die Synthese von Isoascorbinsäure und die Herstellung von Weinsäure eingesetzt wird (Klasen *et al.*, 1992). Das Reichstein-Verfahren ist ein weiterer wichtiger Prozess, der ausgehend von Glukose zur Vitamin C-Synthese eingesetzt wird (Reichstein and Grüssner, 1934). Dabei erfolgt zuerst eine chemische Reduktion von D-Glukose zu D-Sorbitol, welches anschließend mit Hilfe von *G. oxydans* und deren Sorbitol-Dehydrogenase in einer regiospezifischen Oxidation weiter zu L-Sorbitol fermentiert wird. Das große biotechnologische Interesse an dieser Reaktion ist die stereo- und regioselektive Umsetzung von D-Sorbitol zu L-Sorbose, da nur das L-Isomer der Ascorbinsäure aktiv ist, dadurch lässt sich eine aufwendige Schutzgruppenchemie vermeiden (Boudrant, 1990).

Neben den membrangebundenen Dehydrogenasen besitzt *Gluconobacter* einen weiteren Satz an cytoplasmatischen Dehydrogenasen. Damit eine Oxidation an den cytoplasmatischen Dehydrogenasen erfolgen kann, müssen zunächst die Substrate in das Cytoplasma transportiert und anschließend zum Teil phosphoryliert werden. Nach einer Phosphorylierung können die

gebildeten Intermediate über den Zentralstoffwechsel weiter metabolisiert werden (Adachi *et al.*, 2001). Die Bedeutung der löslichen Dehydrogenasen könnte eher die Produktion von Biomasse sein. Dagegen ist die Bereitstellung von Energie eher den membranständigen Dehydrogenasen zuzuordnen (Matsushita *et al.*, 1994).

2.3 Charakterisierung der Atmungskette

In vielen Pro- und Eukaryonten besteht die Atmungskette aus der NADH-Dehydrogenase, der Cytochrom *c*-Reduktase sowie den Cytochrom *c*-Oxidasen und einige Chinol-Oxidasen. Die beiden letzteren Enzyme werden in einigen bakteriellen Atmungsketten durch Chinol-Oxidasen ersetzt.

In *G. oxydans* fehlt eine protonen-translozierende NADH-Dehydrogenase (Prust *et al.*, 2005). Die Genomanalyse ergab, dass *G. oxydans* 621H lediglich über eine NADH-Dehydrogenase vom Typ II verfügt, welche NADH zwar oxidieren kann, aber nicht in der Lage ist, Protonen durch die Membran zu pumpen. Dadurch ist das H⁺/e⁻-Verhältnis geringer, so dass weniger Energie konserviert werden kann und als Wärme verloren geht (Matsushita *et al.*, 1994).

Die membrangebundenen Dehydrogenasen geben die Elektronen, die bei den Oxidationsreaktionen entstehen, direkt auf ihre prosthetischen Gruppen Pyrrolochinolinchinon (PQQ) oder Flavinadenindinukleotid (FAD) ab. Diese werden direkt in den Ubichinonpool geleitet, von dort fließen sie weiter auf die Chinol-Oxidasen vom Typ *bo3* oder *bd*, welche molekularen Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor verwenden. (Matsushita *et al.*, 1994; Prust *et al.*, 2005).

Gluconobacter ist für seine geringe Produktion von Biomasse bekannt, was ihn besonders für die Biotechnologie interessant macht. Ein Grund hierfür könnte in der weniger effizienten Energiekonservierung liegen, da er seine Substrate nur unvollständig oxidiert.

3. Zielsetzung

3.1 Aufstellen eines Deletionssystems

Eine von *G. oxydans* herausragenden Eigenschaften ist die unvollständige Oxidation mit Hilfe seiner membranständigen Dehydrogenasen. Aufgrund der biotechnologischen Bedeutung ist es von großer Wichtigkeit, gezielte markerfreie Gen-Deletionen setzen zu können, um mehr über den Zentralstoffwechsel sowie über die membranständigen Dehydrogenasen in Erfahrung zu bringen. Hinzu kommt, dass die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen in industriellen Fermentationen kaum möglich ist. Bisherige Deletionssysteme beruhen auf der Integration eines Antibiotika-Resistenzgens in das entsprechende Gen (Hölscher and Görisch, 2006; Hölscher *et al.*, 2007). Dabei können jedoch polare Defekte auf die downstream Region nicht ausgeschlossen werden. Gleichzeitig ist die Anzahl von Antibiotika-Kassetten beschränkt, so dass Mehrfachdeletionen erschwert werden. Aufgrund dieser Problematik war es eines der Ziele dieser Arbeit ein markerfreies Deletionssystem für *G. oxydans* 621H zu etablieren.

In vielen Bakterien, Archaeen und in Eukaryonten werden in Deletionssystemen Gene verwendet, die im Purin und Pyrimidin Stoffwechsel vorhanden sind. Insbesondere werden die Gene, die für eine Phosphoribosyltransferase (PRTase) kodieren eingesetzt. Darunter befinden sich die Gene *upp* (kodiert für eine Uracil-PRTase), *pyrE/ura5* (kodiert für eine Orotat-PRTase), *hprT* (kodiert für eine Hypoxanthin-PRTase) und *pyrF/ura3* (kodiert für eine Orotidin-5-Phosphat Decarboxylase). Mit Hilfe dieser Gene, die als Gegenselektion Verwendung finden, wurden in unterschiedlichen Organismen Deletionssysteme aufgestellt (Boeke *et al.*, 1984; Boeke *et al.*, 1987; Peck *et al.*, 2000; Fabret *et al.*, 2002; Bitan-Banin *et al.*, 2003; Pritchett *et al.*, 2004; Kristich *et al.*, 2005).

Das Prinzip beruht auf der Inaktivierung der Synthese von Purin oder Pyrimidin. Dabei spielen die Phosphoribosyltransferasen (PRTase) eine entscheidene Rolle, indem sie freie Purin- oder Pyrimidinbasen

in ihre korrespondierende Nukleotid-Monophosphate umwandeln. Zusätzlich können PRTasen mit Basenanaloga interagieren, was einen toxischen Effekt auf die Zelle ausüben kann. Eine PRTase-Mutante wäre resistent gegenüber dem Analogon und somit würde kein toxischer Effekt eintreten. Durch das Einbringen einer funktionalen Kopie vom Gen der PRTase in die Zelle, mittels PCR-Produkt oder Plasmid, würde die Basis für eine Gegenselektion geschaffen werden.

In dieser Arbeit wird das Gen *upp* als Gegenselektion verwendet. Das Gen *upp* kodiert dabei für die Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase), ein Schlüsselenzym für die Verwertung von Uracil. Mittels der UPRTase wird Uracil zu Uridinmonophosphat (UMP) umgesetzt, ein wichtiges Zwischenprodukt der Pyrimidinbiosynthese. Das toxische Basenalogon 5-Fluorouracil (5-FU) wird ebenso von der UPRTase verwertet, wodurch 5-Fluorouridinmonophosphat (5-Fluoro-UMP) entsteht. Dieses 5-Fluoro-UMP reagiert weiter zu 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (5-Fluoro-dUMP), welches an das Enzym die Thymidylat-Synthase bindet und es inaktiviert. Diese Enzyminaktivierung bewirkt, dass kein Thymidylat (dTMP) mehr aus Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) umgewandelt werden kann. Thymidylat ist ein wichtiges Zwischenprodukt für die Synthese von Thymidin, welches ein wichtiger Bestandteil der DNA ist. In Folge dessen wäre die DNA-Reparatur sowie die Replikation gehemmt. Diese toxischen Auswirkungen bei der Verwendung von 5-FU auf die Zelle wird in dieser Arbeit als Grundlage für die Etablierung eines markerfreien Gen-Deletionssystem eingesetzt, indem das *upp*-Gen deletiert wird und in trans zur Gegenselektion verwendet wird.

3.2 Untersuchung des Entner-Doudoroff Weges

G. oxydans besitzt alle Enzyme für den Entner-Doudoroff-Weg, sowie für den PPW (Prust *et al.*, 2005).

Für genauere Untersuchungen des ED-Weges in *G. oxydans* wird in dieser Arbeit das Schlüsselenzym die 6-P-Gluconat Dehydratase sowie die KDPG-Aldolase deletiert. Eine interessante Frage dabei ist,

ob *G. oxydans* den ED-Weg überhaupt benötigt. Dazu sollen die konstruierten Mutanten anschließend auf unterschiedlichen C-Quellen in ihrem Wachstumsverhalten hin untersucht werden.

3.3 Annotation von *G. oxydans* DSM3504 mit anschließendem Genomvergleich zu *G. oxydans* 621H

Gluconobacter oxydans ist ein industriell wichtiger Organismus. Für ein besseres Verständnis der Biologie dieses Organismus erfolgte die Sequenzierung des gesamten Genoms von *G. oxydans* 621H (Prust *et al.*, 2005). Dabei konnten mögliche Gründe für die geringe Biomassebildung identifiziert werden. (Prust *et al.*, 2005).

Bei Untersuchungen auf unterschiedlichen C-Quellen (Sorbitol, Mannitol, Glukose) zeigte *G. oxydans* DSM3504 im Gegensatz zu *G. oxydans* 621H eine höhere Wachstumsrate und bildete mehr Biomasse (Bremus, 2006). Jedoch setzte *G. oxydans* 621H die Substrate schneller um als *G. oxydans* DSM3504, was sich in einer höheren spezifischen Substratbildungsrate und höheren spezifischen Produktausbeute von Sorbose, Fruktose sowie Glukonat, 5-Ketoglukonat und 2-Ketoglukonat widerspiegelte (Bremus, 2006). Um die Unterschiede der beiden Stämme auch auf molekularbiologischer Ebene besser verstehen zu können, erfolgte die Sequenzierung und die Editierung mit anschließender Überprüfung der Assemblierung des Stammes *G. oxydans* DSM3504 im Genomlabor in Göttingen (Sonja-Volland / G2L).

Ein Ziel dieser Arbeit war die ORF-Korrektur sowie die Annotation des Stammes *G. oxydans* DSM3504 mit anschließendem Sequenzvergleich zu dem bereits vollständig sequenzierten Stamm *G. oxydans* 621H.

II. Material und Methoden

1. Organismen und Plasmide

In der Tab.II.1 sind die verwendeten Organismen aufgeführt. Tab.II.2 zeigt die verwendeten Plasmide.

Tab.II.1: Übersicht von den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämmen und die verwendeten bzw. konstruierten *G. oxydans* Stämme

Stamm	Eigenschaften/ Genotyp/ Phänotyp	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5a	[F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk-), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal ^r), <i>relA1</i> , D(<i>lacZYAargF</i>) U169, F80 <i>lacZDM15</i>]	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> S-17	F ⁻ , Φ80d <i>lacZ</i> M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-,mk+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , (<i>lacZYAargF</i>)U169	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , <i>hsdS20</i> (r-B, m-B), <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK-2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA13</i> , <i>KanR</i> , <i>oriColE1</i> , <i>RK2-Mob+</i> , <i>RK2-Tra+</i> , <i>mH-1</i> mit Plasmid pRK2013	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969; Figurski and Helinski, 1979)
<i>Gluconobacter oxydans</i>		
621H (DSM 2343)	Wildtyp, Cef ^R	(Gillis and de Ley, 1980; De Ley <i>et al.</i> , 1984)
DSM 7145	Wildtyp, Cef ^R	(Gillis and de Ley, 1980; De Ley <i>et al.</i> , 1984)
DSM 3504	Wildtyp, Cef ^R	(Gillis and de Ley, 1980; De Ley <i>et al.</i> , 1984)
621H Δ <i>Gox0327</i> (<i>upp</i>)	Cef ^R , Deletion von <i>Gox0327</i> , welches für die Uracil-Phosphoribosyl-Transferase kodiert	diese Arbeit
621H pAJ46	Cef ^R , mit <i>uppI</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ47	Cef ^R , <i>uppII</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ48	Cef ^R , <i>uppIII</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ49	Cef ^R , <i>uppVI</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ50	Cef ^R , <i>uppI</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ51	Cef ^R , <i>uppII</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ52	Cef ^R , <i>uppIII</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ53	Cef ^R , <i>uppVI</i> – Fragment, Km ^R	diese Arbeit

Stamm	Eigenschaften/ Genotyp/ Phänotyp	Quelle / Referenz
621H Δ Gox0431	Cef ^R , Gox0431 deletiert, welches für die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase kodiert	diese Arbeit
621H Δ Gox0430	Cef ^R , Gox0430 deletiert, welches für die KDPG-Aldolase kodiert	diese Arbeit
621H Δ Gox2181	Cef ^R , Gox2181 deletiert, welches für eine putative Polyol-Dehydrogenase kodiert	diese Arbeit
621H Δ Gox0310	Cef ^R , Gox0310 deletiert, welches für die α -Untereinheit der Transhydrogenase	diese Arbeit
621H pAJ75	Cef ^R , enthält pAJ75, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ76	Cef ^R , enthält pAJ76, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ78	Cef ^R , enthält pAJ78, Km ^R	diese Arbeit
621H pAJ79	Cef ^R , enthält pAJ79, Km ^R	diese Arbeit
DSM 7145 Δ upp	Cef ^R , Deletion von <i>upp</i> , welches für die Uracil-Phosphoribosyl-Transferase kodiert	diese Arbeit
DSM 7145 Δ Gox0431	Cef ^R , Gox0431 deletiert, welches für die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase kodiert	diese Arbeit
DSM 7145 Δ Gox0310	Cef ^R , Gox0310 deletiert, welches für die α -Untereinheit der Transhydrogenase	diese Arbeit
621H Gox0327:: RGLU00541	Cef ^R , Integration von RGLU00541 (NADH-Dehydrogenase) in das <i>upp</i> -Gen	diese Arbeit

Tab.II.2: Übersicht von den in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pk19mobsacB	mobilisierbarer Integrationsvektor, Derivat von Plasmid pK19 durch Einfügen <i>mob</i> und <i>sacB</i> Gene, Km ^R	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pk19mobGII	Deletionsvektor, <i>GusA</i> , Km ^R	(Katzen <i>et al.</i> , 1999)
pBBR1-MCS2	broad host range Klonierungsvektor, <i>ori</i> pBBR1, <i>lac</i> Promotor, <i>lacZa</i> , Km ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pAJ35	Derivat von pk19mobsacB mit den <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten von Gox0327 zur Deletion der Uracil-Phosphoribosyl-Transferase, Km ^R	diese Arbeit
pAJ46	Derivat von pk19mobsacB mit dem uppI – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ47	Derivat von pk19mobsacB mit dem uppII – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ48	Derivat von pk19mobsacB mit dem uppIII – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ49	Derivat von pk19mobsacB mit dem uppIV – Fragment, Km ^R	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAJ50	Derivat von pk19mobGII mit dem uppI – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ51	Derivat von pk19mobGII mit dem uppII – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ52	Derivat von pk19mobGII mit dem uppIII – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ53	Derivat von pk19mobGII mit dem uppIV – Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pAJ55	Derivat von pk19mobsacB mit den <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten von Gox0310 zur Deletion der α -Untereinheit der Transhydrogenase, Km ^R	diese Arbeit
pAJ63a	Derivat von pk19mobGII, <i>gusA</i> wurde zum größten Teil durch das uppI-Fragment ersetzt, Km ^R	diese Arbeit
pAJ67	Derivat von pAJ63a mit den <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten von Gox0431 zur Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydratase, Km ^R	diese Arbeit
pAJ70	Derivat von pAJ63a mit den <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten von Gox2181 zur Deletion einer vermutlichen cytoplasmatischen Polyol-Dehydrogenase, Km ^R	diese Arbeit
pAJ72	Derivat von pAJ63a mit den <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten von Gox0430 zur Deletion der KDPG-Aldolase, Km ^R	diese Arbeit
pAJ73	Derivat von pk19mobsacB mit den <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten von <i>upp</i> zur Deletion der Uracil-Phosphoribosyl-Transferase, Km ^R	diese Arbeit
pAJ75	Derivat von pBBR1-MCS2 mit den RGLU00478-0479 (Gluconat-Dehydrogenase) Genen und der putativen Promotorregion zur Expression in <i>G. oxydans</i> 621H, Km ^R	diese Arbeit
pAJ76	Derivat von pBBR1-MCS2 mit dem RGLU01182 Gen (Nitrilase) und der putativen Promotorregion zur Expression in <i>G. oxydans</i> 621H, Km ^R	diese Arbeit
pAJ78	Derivat von pBBR1-MCS2 mit dem RGLU00541 Gen (NADH-Dehydrogenase) und der putativen Promotorregion zur Expression in <i>G. oxydans</i> 621H, Km ^R	diese Arbeit
pAJ79	Derivat von pBBR1-MCS2 mit dem RGLU00548 Gen (Triose-P-Isomerase) und der putativen Promotorregion zur Expression in <i>G. oxydans</i> 621H, Km ^R	diese Arbeit

2. Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Biomol (Hamburg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) mit den Reinheitsgraden *pro analysis* oder „reinst“ verwendet. Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

3. Nährmedien, Puffer und Stammlösungen

3.1 Komplexmedien

Im Folgenden sind die verwendeten Nährlösungen aufgeführt. Alle Medien wurden durch das Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Feste Medien wurden durch den Zusatz von 1,5 % [w/v] Agar zu den entsprechenden Nährlösungen hergestellt. Hitzelabile Medienzusätze wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Festmedien nach Abkühlung auf 55 °C zugesetzt.

Luria Bertani Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{des.}	ad 1000 ml

Mannitol-Medium (Buchert and Viikari, 1988)

Trypton	3 g
Hefeextrakt	5 g
D-Mannitol	10 g
H ₂ O _{des.}	ad 1000 ml pH 6,0

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf pH 6.0 eingestellt.

3.2 Medienzusätze

Die Stammlösungs- und Arbeitskonzentrationen von den in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und anderen Medienzusätzen sind in Tab.II.3 aufgeführt.

Tab.II.3: Übersicht von den in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze mit Angabe der Konzentration der Stammlösung und der eingesetzten Endkonzentration

Medienzusatz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
		[mg/ml]	[µg/ml]
Ampicillin	H ₂ O _{dest.}	100	100
Kanamycin	H ₂ O _{dest.}	50	50
Cefoxitin	H ₂ O _{dest.}	50	50
X-Gal	N,N-Dimethylformamid	40	40
5'-Fluorouracil	Dimethylsulfoxid	60	60

4. Zellanzucht

G. oxydans 621H und *E. coli* wurden aerob in Flüssigkultur in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben angezogen, deren Volumina dem zehnfachen bis zwanzigfachen des Kulturvolumens entsprachen. *G. oxydans* wurde in Mannitol-Medium bei 30 °C kultiviert, wohingegen *E. coli* in LB-Medium bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert wurde. Die Anzucht auf festen Medien erfolgte bei den oben angegebenen Temperaturen.

5. Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung wurden *E. coli* und *G. oxydans* auf entsprechenden Agarplatten gelagert und alle vier Wochen überimpft. Für das Anlegen einer Stammkultur wurden in einem sterilen, verschraubbaren 1,5 ml Reaktionsgefäß 900 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl 50 % Glycerin gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

6. Reinheitskontrollen

Zellsuspensionen wurden regelmäßig auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) anhand der Kolonie- bzw. der Zellmorphologie auf ihre Reinheit überprüft. Darüber hinaus wurden aus *G. oxydans* Zellsuspensionen Vereinzelungsausstriehe auf LB- und VM-Mannitol-Agarplatten angelegt um Kontaminationen auszuschließen.

7. Bestimmung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen wurde über die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) mit einem UV/Vis Spektrometer (Spectrophotometer Typ Ultrospec®3300pro, Amersham Pharmacia Biotech) verfolgt. Als Nullwert diente unbeimpftes Medium. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Proben mit unbeimpftem Medium verdünnt, sobald die Extinktion einen Wert von 0,5 überschritt.

8. Bestimmung der maximalen Wachstumsrate

Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} ist abhängig von den Wachstumsbedingungen. Dazu gehören z.B. die Art des Substrates (C-Quelle), der N- oder der P-Quelle. Auch Parameter wie Belüftung, Temperatur oder pH-Wert der Nährlösung haben einen Einfluss. Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} wurde bestimmt, indem zunächst der Verlauf des Zellwachstums im geschlossenen System (Batch-Kultur) durch regelmäßige Probenentnahme photometrisch verfolgt wurde. Die gesammelten Daten dienten der Erstellung einer Wachstumskurve. In der logarithmischen Wachstumsphase (log-Phase) erfolgt ein Wachstum mit schnellstmöglicher Teilungsrate. In dieser Phase wurde die maximale Wachstumsrate μ_{\max} bestimmt. Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} in der log-Phase wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\mu = \frac{\log(x_1) - \log(x_0)}{t_1 - t_0}$$

wobei x_1 für die OD ($\lambda = 600$ nm) am Zeitpunkt t_1 , x_0 für die OD ($\lambda = 600$ nm) zum Zeitpunkt t_0 steht. Die berechnete maximale Wachstumsrate hat die Einheit 1/h.

9. Zellanzucht im Chemostat für die Transkriptionsanalyse

Die Untersuchung einer Regulation der Genexpression auf Grundlage eines DNA-Microarrays macht bereits bei der Anzucht der Zellen die reproduzierbare Einhaltung von Wachstumsparametern erforderlich. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Chemostat der Firma Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen, Deutschland, verwendet. Zum Einsatz kam das Modell BIOSTAT Bplus mit einem Kesselvolumen von einem oder zwei Liter (Abb.II.1). Hiermit war es möglich, die Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg unter definierten Versuchsbedingungen wachsen zu lassen. Eine solche kontinuierliche Kultur stellt ein offenes System dar. Durch den permanenten Mediumzufluss befinden sich die Zellen im dauernden Wachstum (*steady state*). Im selben Maß indem Medium zugeführt wird, wird Bakterienkultur aus dem Chemostatkessel abgepumpt. Dadurch bleibt die Zelldichte annähernd konstant, sofern sich die Kultur im sogenannten Fließgleichgewicht befindet. Diese *steady state* Zelldichte N bleibt nahezu unverändert, solange die maximale exponentielle Wachstumsrate μ größer ist als die Verdünnungsrate D , und D größer ist als die $\frac{1}{2}$ maximale exponentielle Wachstumsrate $\mu/2$. Die Verdünnungsrate D ist definiert als die Flussrate F (l/h), mit der das konstante Kesselvolumen V (l) ausgetauscht wird. ($D = F/V$). Entspricht die Verdünnungsrate D der Wachstumsrate μ spricht man vom *balanced growth*. Im Zustand des konstanten kontinuierlichen Wachstums lassen sich Parameter wie pH-Wert oder Sauerstoffpartialdruck konstant halten. Zudem sind während des balancierten Wachstums die Zellen gezwungen, alle Gene zu

expremieren, die sie zum Leben unter den eingestellten Milieubedingungen benötigen.

Die Fermentationseinheit, bestehend aus dem Chemostatkessel mit Zulauf- und Ernterohr, Belüftungspritte, Be- und Entlüftungswaschflasche, pH-Elektrode, pO₂-Elektrode, Temperaturfühler, Level- und Antischaumelektrode, sowie den Vorratsflaschen für Säure, Base und Antischaum, wurde bei 121 °C für 30 Minuten autoklaviert. Der Chemostatkessel wurde dazu mit 500 ml H₂O_{dest.} befüllt, damit die Elektroden beim Autoklavieren in Flüssigkeit eintauchten. Zudem wurden 8 l Medium in einer 20 l Steilbrustflasche mit G45 Schraubgewinde, und eine leere ebensolche Flasche für den Suspensionsabfluss während des kontinuierlichen Laufs autoklaviert.

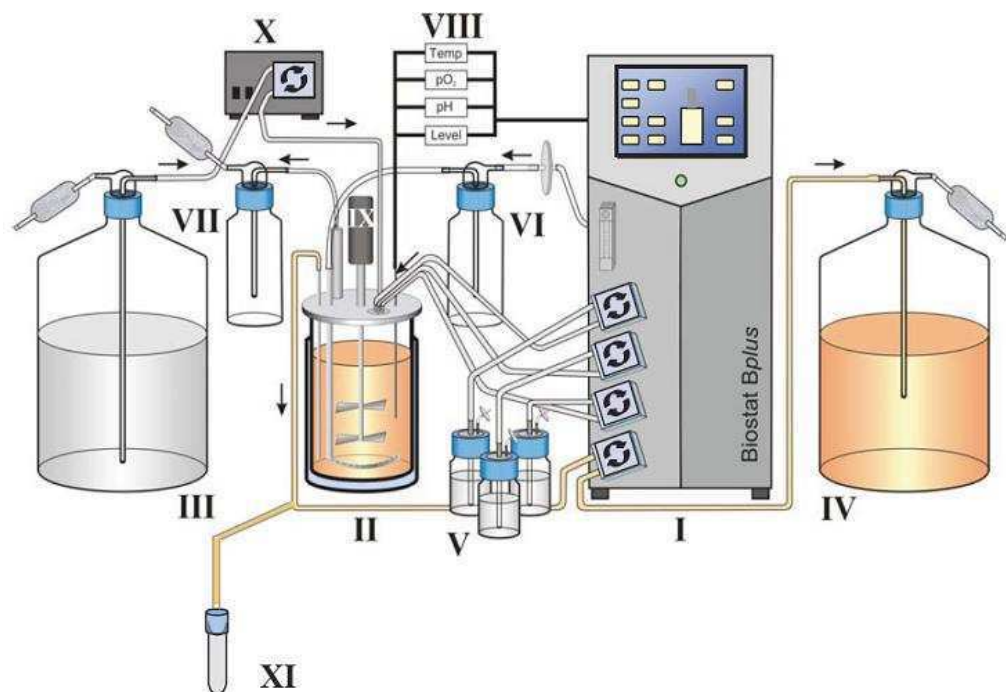


Abb.II.1) Aufbau des Chemostat Biostat *Bplus*, Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen (schematische Darstellung nach (Schmidt, 2005), **I** - Steuerungseinheit zur Regulation von Temperatur, pO₂- und pH-Wert, sowie Mediumzulauf und Kulturabfluss (*level*), **II** - Kulturgefäß mit Doppelmantel. Der Kessel wird zur Einstellung der vorgewählten Kulturtemperatur mit vorgeheiztem Wasser umspült (Anschlüsse zur Steuerungseinheit nicht dargestellt), **III** - Mediumvorratsflasche (Magnetrührer zur gleichmäßigen Verteilung von Komponenten im Medium nicht dargestellt), **IV** - Kultur-Erntefäß, **V** - Vorratsflaschen für Säure- (1M), Base- (1M) und Antischaum, **VI** - Pressluftversorgung mit 0,2 µm Filtereinheit und Waschflasche, **VII** - Abluft, **VIII** - Elektrodenanschlüsse zur Kontrolle von Temperatur, pH-Wert, pO₂ und des Flüssigkeitsvolumens (Level), **IX** - Rührerwelle mit Antriebsmotor (0-2000 Upm), **X** - Substratpumpe, **XI** - Probeentnahmesystem

Alle Schlauchverbindungen wurden mit Silikonschlauch (Fa. Masterflex AG, Gelsenkirchen, Deutschland) hergestellt, der vor jedem Autoklavieren auf Schäden kontrolliert und ggf. ausgetauscht wurde. Zur einfacheren Handhabung wurden die Schläuche mit Metall-Luer-Lock-Oliven miteinander verbunden. Nach dem Autoklavieren wurden die leeren Schraubdeckelflaschen für Säure, Base und Antischaum gegen befüllte Flaschen steril ausgetauscht, das Wasser vollständig aus dem Kessel gepumpt und durch 500 ml Medium ersetzt. Über den Doppel-Glasmantel des Chemostatkessels und den Thermostat der Steuerungseinheit wurde eine konstante Kesseltemperatur von 30 °C eingestellt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde die Sauerstoffelektrode kalibriert. Zur Nullpunkteichung durchströmten ca. 1,5 l/min Stickstoff (Reinheitsgrad 4.0, Messer-Group GmbH, Sulzbach, Deutschland) den Kesselinhalt. Zur besseren Verteilung des Gases wurde der Rührer dabei auf 850 Upm geschaltet. Der sich einstellende konstante Elektrodenstrom im nA- (nano Ampere) Bereich wurde als Nullpunkt festgesetzt. Zur Eichung des 100%-Wertes für Sauerstoff im Medium durchströmten 1,5 l/min Pressluft die Nährlösung, wiederum bis zum konstanten Elektrodenstrom. Auch Zellsuspensionen wurden mit 850 Upm gerührt, wobei in der Regel ein Sauerstoffpartialdruck von 80 % eingestellt wurde. Für das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* 621H wurde, soweit nicht anders angegeben, ein pH-Wert von 6,0 eingestellt. Das Kesselvolumen von 500 ml wurde angeimpft. Nachdem die Zellen zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 gewachsen waren, wurde die Substratpumpe (Watson Marlow 101 U/R; Falmouth, Cornwall, UK) zugeschaltet. Diese Pumpe wurde vor dem Chemostatenlauf mit dem verwendeten Schlauch auf ihr gefördertes Pumpvolumen pro Zeiteinheit geeicht. Die zum Abpumpen der im kontinuierlichen Betrieb anfallenden Zellsuspension eingesetzte Pumpe musste hingegen nicht kalibriert werden. Die Levelelektrode sensierte einen Stromfluss zum Temperaturfühler als Referenzelektrode und schaltete bei steigendem Kesselinhalt die Ablauf-Pumpe zu. Nach Einstellung des Fließgleichgewichtes änderte sich die OD₆₀₀ der Zellsuspension nicht mehr. Nach weiteren drei Volumenwechseln wurden die Zellen über das

Entnahmesystem in vorgekühlten 50 ml Schraubdeckelröhrchen geerntet. Die Zellsuspension wurde täglich lichtmikroskopisch und durch Ausstrich auf LB Agarplatten auf Reinheit überprüft.

10. Molekulargenetische Arbeitsmethoden

10.1 Behandlung von Lösungen / Geräten für Arbeiten mit Nukleinsäuren

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden zur Inaktivierung von Nukleasen bei 121°C für 20 min durch Autoklavieren sterilisiert. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol behandelt, hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

10.2 Isolierung von DNA

Zu der in TE-Puffer gelösten Zell-Suspension wurden 15 µl 20%iges SDS und 3 µl Proteinase K (0,6 U/µl, 20 mg/ml, Sigma, München, Deutschland) hinzupipettiert. Nach gründlichem Vortexen wurde dieser Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl RNase A hinzugefügt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl 5 M NaCl-Lösung und 80 µl CTAB hinzupipettiert und gevortext. Danach wurde die Suspension für 30 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Mit der verbleibenden wässrigen Lösung wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

10.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um bei der Präparation von DNA Proteinkontaminanten oder hydrophobe Substanzen abzutrennen, wurde die wässrige DNA-Suspension mit 1 Vol. Phenol-Lösung versetzt und kräftig gemischt. Das verwendete Phenol war mit 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) gesättigt. Zur Phasentrennung wurde 3 min bei 13000 Upm und Raumtemperatur

zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und mit Ethanol gefällt.

10.2.2 Fällung von Nukleinsäuren mit Isopropanol / Ethanol

Durch die Fällung mit Isopropanol/Ethanol wurde die DNA von anderen wasserlöslichen Komponenten getrennt und gleichzeitig aufkonzentriert. Die DNA-haltige Probe wurde zunächst mit einem 1/10 Volumen 3 molarer Natriumacetat-Lösung pH 4,6 und 0,8 Volumen Isopropanol versetzt und für fünf Minuten bei -20 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in $100\text{ }\mu\text{l}$ 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert und nochmals durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde möglichst rückstandsfrei abgenommen und getrocknet. Schließlich wurde das transparente DNA Pellet in $20 - 30\text{ }\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ oder TE- Puffer aufgenommen.

10.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentration von DNA Lösungen wurde anhand der Absorption von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Nanodrops (Nanodrop 1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt. Der Nullabgleich wurde mit dem Lösungsmittel vorgenommen, worin die DNA gelöst war. Für eine OD_{260} von 1,0 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ angenommen. Zusätzlich konnte die Reinheit der DNA durch Bestimmung der OD bei 230 und 280 nm abgeschätzt werden. Für reine DNA gilt:

$$\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280} = 1,8 \quad (\text{Sambrook } et\ al., 1989)$$

$$\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} = 0,45 : 1,0 : 0,515 \quad (\text{Marmur and Ts'O, 1961})$$

Verunreinigungen durch Proteine und Phenol sind durch eine deutlich stärkere Absorption bei 280 nm erkennbar, während Polysaccharide die Absorption bei 230 nm erhöhen.

10.4 Isolierung von Plasmid DNA

Um Plasmid-DNA zu erhalten, die auch für weiteres molekulares Arbeiten verwendet werden konnte (z. B. Restriktionsverdau, Ligation), wurde die Anionenaustausch-Chromatographie des QIAprep Spin Miniprep Kits genutzt (QIAGEN GmbH, Hilden). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers: 1,5-3,0 ml einer 5 ml Übernachtskultur in Selektivmedium wurden geerntet und in 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Zur Zell-Lyse wurden 250 µl P2 Puffer hinzugegeben und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Neutralisation durch Zugabe von 350 µl N3 Puffer wurden die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation (15000 Upm, 10 min, RT) pelletiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin Säule aufgetragen, und durch Zentrifugation (1 min, 13000 Upm, RT) wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden. Um besonders saubere DNA zu erhalten, wurde diese zunächst mit 500 µl PB Puffer gewaschen. Anschließend wurde die gebundene DNA durch Zugabe von 750 µl PE Puffer gereinigt. Zur Elution wurden 50 µl H₂O_{dest.} eingesetzt.

10.5 Agarose Gelelektrophorese

10.5.1 Analytische Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit der Agarose Gelelektrophorese. Negativ geladene Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente von mehreren Faktoren abhängt, wie z.B. der Größe der Gelporen (bestimmt durch die Agarosekonzentration), der angelegten Spannung und der Salzkonzentration des Puffers. Es erfolgt eine Auftrennung der DNA-

Fragmente entsprechend ihrer Größe, da deren Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Molekularmasse ist. Als Färbemittel diente Ethidiumbromid, welches an dsDNA bindet. Die als Banden erscheinenden DNA-Fragmente wurden im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht, fotografisch festgehalten, und analysiert. Der Vergleich mit einem Standard erlaubte sowohl eine Größen- als auch eine Mengenabschätzung der aufgetragenen DNA-Fragmente. Die 0,8 %ige Agarose wurde in 1x TAE unter kurzem Aufkochen in der Mikrowelle gelöst bis eine klare homogene Lösung entstand. Die Agaroselösung wurde unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt, in einen abgegrenzten Bereich (100 x 7 x 0,5 mm) einer Gellaufkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde dieses mit TAE-Puffer bedeckt. Erst dann wurde der Taschenkamm entfernt. Die mit mindestens 1/5 Vol Auftragspuffer versetzten Proben wurden in die Geltaschen gefüllt. Dieser diente einerseits zur Beschwerung der Proben als auch zur Markierung der Lauffront bei ca. 500 bp. Nach vollständiger Durchmischung der Ansätze mit dem Stop-Mix wurden diese in die Geltaschen pipettiert. Für die Auftrennung der DNA-Proben im Gel wurde die Spannung bei 90-110 V konstant eingestellt und diese für etwa 45-60 min beibehalten, bis die Lauffront ca. 1,5 cm vom unteren Rand des Gels entfernt war. Nach Beendigung des Laufes wurde die DNA für 10 min bei RT in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und das Gel anschließend in einem Wasserbad für 10 min bei RT entfärbt. In einer Gel-Dokumentationsanlage (BioRad® GelDoc 1000) wurde die DNA bei UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Zur Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente sowie der Menge der DNA wurde ein Standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas) mit einem Größenstandard von 0,25 – 10 kb benutzt.

50 x TAE-Puffer		
Tris	242 g	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,2 g	
Eisessig	57,1 ml	
H ₂ O _{bidest.} ad	1000 ml	pH 8,5

DNA-Auftragspuffer (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)		
Ficoll 400	7,5 g	
Bromphenolblau	50 g	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (0,5 M)	10 ml	
H ₂ O _{bidest.} ad	50 ml	

Ethidiumbromid-Färbebad (Sambrook *et al.*, 1989)

100 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung in 100 ml H₂O

10.5.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden mit Ethidiumbromid angefärbten Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution fand mittels QIAquick Gel Extraction Kit statt. Das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstückes wurde mit der Feinwaage bestimmt. Anschließend wurde das dreifache Gelvolumen des Puffers QX1 hinzugefügt und das Gemisch zum Auflösen des Gels unter mehrmaligem Schütteln bei 50 °C für 10 min inkubiert. Der Puffer QX1 enthält hohe Konzentrationen chaotroper Salze, was die Adsorption der zu eluierenden DNA an die Silicagel-Membran der QIAquicksäulen ermöglicht. Es folgten die Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol, vorsichtiges Mischen und das Beladen der QIAquicksäule mit der Lösung. Nach Zentrifugation (RT, 13000 Upm, 1 min in Biofuge 15, Fa. Heraeus, Osterode/Harz) wurde die an die Säule gebundene DNA mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (RT, 13000 Upm). Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers wurde nochmals zentrifugiert und die Säule anschließend in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA erfolgte nach 1

minütiger Inkubation mit 30-50 µl EB-Puffer oder H₂O_{dest.} und anschließender Zentrifugation (RT, 13000 Upm, 1 min).

10.5.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Amplifizierte PCR-Produkte mussten, ehe sie sequenziert werden konnten, aufgereinigt werden. Dieses erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen. Dazu wurden 5 Volumen des Puffers PB mit dem PCR-Produkt vermischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Durch Zentrifugation (1 min, 12000 Upm, RT) wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Um sämtliche Reste des Waschpuffers von der Säule zu entfernen, wurde diese zweimal zentrifugiert (14000 Upm, RT). Zur Elution der PCR-Produkte wurden 50 µl H₂O_{dest.} auf die Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und erneut 1 min zentrifugiert (14000 Upm, RT). Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

10.6 Polymerasekettenreaktion (Mullis and Faloona, 1987)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine *in vitro*-Methode, die es ermöglicht, spezifische DNA-Fragmente aus einem komplexen DNA-Gemisch (*Template*) enzymatisch zu amplifizieren. Im ersten Schritt der PCR wurde die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94-98 °C in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Durch Absenken der Temperatur im zweiten Schritt konnten sich zwei Oligonukleotid-Primer an zu ihnen komplementäre Abschnitte der *Template*-DNA anlagern (*Primer-Annealing*). Die Oligonukleotid-Primer wurden so ausgewählt, dass sie die zu amplifizierende Region flankieren. Im dritten Schritt der PCR wurden die beiden Primer mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum komplementär zur ursprünglichen doppelsträngigen DNA verlängert (Elongation). Es wurde zur

Amplifikation eine bestimmte Anzahl an Zyklen durchgeführt, wodurch die von den Primern flankierte Region exponentiell akkumuliert wurde. Diese Reaktionen lief in einem Thermocycler ab, bei dem es sich im Wesentlichen um einen programmierbaren Heizblock handelt, der sehr schnell die Temperatur ändern kann. Es wurden verschiedene PCR-Programme angewendet. Die *Annealing*-Temperatur wurde dabei so gewählt, dass sie ca. 5 °C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer lag. Die Elongationszeit hing von der Größe des erwarteten Produktes ab. Nach Abschluss der Amplifikation wurde ein Aliquot im Agarosegel überprüft.

Standardreaktionsansatz	
genomische DNA (100 ng/μl)	1μl
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer (10x)	2μl
dNTP mix (je 2 mM dATP, dCTP,dGTP,dTTP)	2μl
Forward Primer (10 pmol/μl)	2μl
Reverse Primer (10 pmol/μl)	2μl
H ₂ O _{bidest.}	12,8μl
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,2μl

Standard PCR-Programm		
Denaturierung	95°C	3min
Denaturierung	95°C	1min
Annealing	T _m - 3°C	1min
Elongation	72°C	2min/kb
Elongation	95°C	5min
30 Zyklen		

10.6.1 Kolonie-PCR zur Klonüberprüfung

Die Kolonie-PCR diente zur Überprüfung einer großen Zahl rekombinanter *E. coli* oder *G. oxydans* Klone. Dazu wurden in einem

PCR Gefäß 10 µl H₂O_{bidest.} vorgelegt. Zellmaterial gut gewachsener Kolonien der zu überprüfenden Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in das PCR-Gefäß überführt. Des Weiteren wurden dem Ansatz die folgenden Komponenten zugegeben:

PCR-Reaktionsansatz	
Taq Reaktionspuffer (10 x)	2µl
dNTP mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2µl
Forward Primer (10 pmol /µl)	2µl
Reverse Primer (10 pmol /µl)	2µl
Taq-Polymerase	0,5µl
H ₂ O _{bidest.}	1,5µl

In der Kolonie-PCR wurden plasmid- bzw. genspezifische Primer und das folgende PCR-Programm angewendet:

PCR-Programm		
Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	T _m - 3°C	1 min
Elongation	72°C	1 min/kb
Elongation	95°C	5 min
30 Zyklen		

10.6.2 Fusion von Homologieregionen mit der *Long Flanking Homology* (LFH) PCR (Wach, 1996) mod.

Die zur Deletion von chromosomalen Genen notwendigen Homologieregionen wurden mit der modifizierten *Long Flanking Homology* (LFH) Methode nach Wach (1996) miteinander fusioniert.

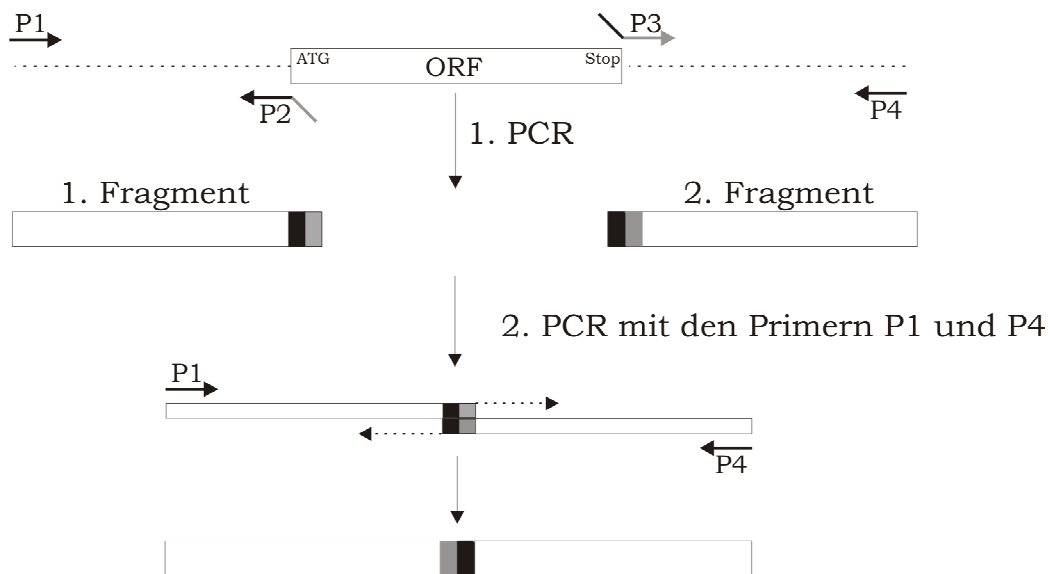


Abb.II.2: Schema der *Long Flanking Homology* PCR Methode (Wach, 1996; Wendland, 2003) mod.

Dazu wurden zunächst wie in Abb.II.2 gezeigt vier Primer abgeleitet. Primer P1 lag etwa 1000 bp stromaufwärts des Startcodons, Primer P4 etwa 1000 bp stromabwärts des Stoppcodons des zu deletierenden Gens. Primer 2 wurde so abgeleitet, dass ausgehend vom 5'-Ende des Primers, die ersten 15 Basen komplementär zu den 15 Basen unmittelbar nach dem Stoppcodon waren, während die folgenden 20 Basen komplementär zu den ersten 20 Basen unmittelbar stromaufwärts des Startcodons des zu deletierenden Gens waren. Entsprechend waren die ersten 15 Basen des Primers P3 komplementär zu den 15 Basen unmittelbar stromaufwärts des Startcodons und die folgenden 20 Basen komplementär zu den ersten 20 Basen unmittelbar stromabwärts des Stoppcodons des zu deletierenden Gens.

In separaten PCR-Reaktionen wurden zunächst die stromaufwärts-Homologieregion (H_{up}) mit dem Primerpaar P1 und P2 und die stromabwärts-Homologieregion (H_{down}) mit dem Primerpaar P3 und P4 mittels *Pfu*-DNA-Polymerase und genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Die Annealingtemperaturen ergaben sich dabei aus den Schmelztemperaturen der Primer und die Elongationszeiten aus der Größe der Homologieregionen. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt und die DNA Konzentration bestimmt. Zur Fusion der

stromaufwärts- und der stromabwärts-Homologieregionen wurden je 200 ng der PCR-Produkte mit dem folgenden Reaktionsansatz gemischt:

Reaktionsansatz	
Fragment 1 (H _{up}) (200 ng)	x µl
Fragment 2 (H _{down}) (200 ng)	y µl
10 x <i>Pfu</i> Puffer (+MgSO ₄)	5 µl
dNTP mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	3 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	8 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	8 µl
H ₂ O _{bidest.} Ad	50 µl

Durch das folgende PCR-Programm wurde die doppelsträngige DNA der PCR-Produkte zunächst in Einzelstrang DNA aufgeschmolzen, die sich nachfolgend an den durch die Primer P2 und P3 eingefügten komplementären Regionen zusammenlagert. Die *Pfu*-DNA-Polymerase füllte die Einzelstrangbereiche zu Doppelstrangbereichen auf und diente der Vermehrung der fusionierten Homologieregionen.

PCR-Programm		
Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	63°C	1 min
Elongation	72°C	2 min/kb
30 Zyklen		

Die Fusion PCR wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Bande mit der gewünschten Größe aus dem Agarosegel eluiert. Die Fusion der Homologieregionen wurde durch Sequenzierung des PCR Produktes überprüft.

10.7 Enzymatische Modifikation von DNA

10.7.1 Restriktionsverdau

Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen lieferte lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden. Der Verdau der DNA (1-3 U/ μ g) erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen. Die Inkubation erfolgte in der Regel bei 37 °C (siehe Empfehlung des Herstellers) für 2 h. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 10-50 μ l, wobei das Enzym (3-5 U Enzym/ μ g DNA) mindestens 1:10 verdünnt wurde, um eine Gesamtkonzentration von 5 % Glycerin nicht zu überschreiten, die sich störend auf die Spaltreaktion auswirken kann. Wurde mit zwei verschiedenen Enzymen, die unterschiedliche Pufferbedingungen benötigen, verdaut, so wurde erst die Restriktion in dem System mit niedrigerer Ionenstärke durchgeführt und diese anschließend für das zweite Enzym erhöht. Gegebenenfalls wurde eine Inaktivierung der Verdauansätze für 20 min bei 65 °C durchgeführt. Die Spaltprodukte wurden im Agarosegel überprüft.

10.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation von Vektor-DNA mit dem zu klonierenden DNA-Fragment wurde die 5'-Phosphatgruppe der Vektor- oder Insert-DNA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) (Sambrook *et al.*, 1989) abgespalten. Dadurch sollte die Ligation von Vektor-DNA oder die Ligation diskontinuierlicher, genomischer DNA-Fragmente verhindert werden. Die Dephosphorylierung wurde direkt im Verdauansatz durchgeführt. Nach dem Verdau wurde 1 U alkalische Phosphatase pro 10 μ g zu dephosphorylierender DNA zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und erneut 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65 °C für 15 min abgestoppt. Die DNA wurde mittels dem QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

10.7.3 Ligation von DNA

Bei einer Ligation wird eine Phosphodiesterbindung zwischen doppelsträngigen DNA Fragmenten, die mindestens ein freies 3'-Hydroxyende und 5'-Phosphatende besitzen, gebildet. Da der Erfolg einer Ligation unter anderem von Länge und Konzentration der Vektor- und der zu inserierenden DNA abhängt (Dugaicznyk *et al.*, 1975), wurde das zu ligierende DNA-Fragment in Überschuss eingesetzt. Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 15-20 μl mit 1 μl T4-DNA-Ligase (1 U/ μl , Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim) in dem vom Hersteller gelieferten Puffer durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde für etwa 16 h bei 16 °C inkubiert oder für 1 bis 3 h bei 22 °C. Anschließend wurde er direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

11. Transformationsverfahren

11.1 Herstellung kompetenter Zellen für das Hitzeschockverfahren

Eine Hauptkultur wurde mit einer exponentiell wachsenden *E. coli* Vorkultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 angezogen. Nach 10 minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 6000 rpm, 4 °C) geerntet, in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ vorsichtig resuspendiert, weitere 30 min auf Eis gestellt und noch einmal abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen, mit 2 ml 80 % Glycerin versetzt, sorgfältig gemischt, erneut auf Eis gestellt und in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße mit 200 μl verteilt. Die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

11.2 Transformation durch Hitzeschock

Eppendorf-Gefäße mit 200 μl der eingefroren kompetenten Zellen wurden fünf Minuten auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz (10-

150 ng DNA) vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42 °C wurden die Zellen nochmals für eine Minute auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µL LB-Medium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37 °C zur Ausprägung der Selektionsmarker inkubiert. Auf den Agarplatten wurden 100 µl unter Selektivbedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

11.3 Konjugation

Plasmide, auf denen eine *mob* Region kodiert ist, können durch Konjugation in *G. oxydans* übertragen werden. Voraussetzung für die Konjugation ist die Verwendung eines Donors, wie *E. coli* S17, der den RP4 Apparat ausbilden kann. *G. oxydans* wurde auf VM angezogen. Die im Vollmedium verwendete Kohlenstoffquelle wurde dem Substratspektrum der erwarteten Mutante angepasst.

Die Vorkultur diente als Inokulum für eine Hauptkultur. Sie wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln (150 rpm) bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase inkubiert (OD₆₀₀ ~ 0,9).

Gleichzeitig wurde der Donor *E. coli* S17 mit dem zu konjugierenden Plasmid in einer LB-Kultur, die das plasmidspezifische Antibiotikum enthielt, über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (150 rpm) angezogen. Aus dieser Vorkultur wurde eine LB-Kultur (mit Antibiotikum) angeimpft, die bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase inkubiert wurde. Dabei wurde das Inokulationsvolumen so berechnet, das der Donor *E. coli* S17 mit dem zu konjugierenden Plasmid und der Rezipient *G. oxydans* etwa zur gleichen Zeit die späte exponentielle Wachstumsphase erreichten. Sobald Donor und Rezipient die späte exponentiellen Wachstumsphase erreicht hatten, wurden 500 µl des Donors und 500 µl des Rezipienten durch Zentrifugation in einem Eppendorfreaktionsgefäß (4000 rpm, 10 °C, 5 min) pelletiert und das erhaltene Pellet in 2 ml frischem VM Medium gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet aus Donor und Rezipient in 1 ml frischem VM resuspendiert. Die

Suspension wurde auf eine VM Platte getropft, unter der Sterilbank getrocknet und nachfolgend bei 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Die gebildeten Zellen wurden mit 800 µl VM abgeschwemmt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf VM-Platten 50 µg/ml Cefoxitin und 50 µg/ml Kanamycin plattiert und danach für 48 bis 72 h bei 30 °C inkubiert. Durch die natürliche Resistenz von *G. oxydans* gegenüber Cefoxitin konnten auf diesen Platten nur *G. oxydans* Klone, die das Plasmid aufgenommen hatten, nicht jedoch *E. coli* wachsen.

12. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977; Ansorge *et al.*, 1987) wurde entweder von Eurofins (Ebersberg) oder durch das Göttingen Genomics Laboratory (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

13. Techniken für das Arbeiten mit RNA

13.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Um eine Verunreinigung der RNA Präparation mit RNAsen zu vermeiden, wurden alle benötigten Materialien wie z.B. Lösungen, Glaswaren und Pipettenspitzen, soweit möglich, zweimal bei 120 °C für 30 min autoklaviert. Des Weiteren wurden während der Arbeiten mit RNA die getragenen Handschule, Arbeitsflächen und Pipetten wiederholt mit 70 % (v/v) Ethanol benetzt.

13.2 Zellaufschluss von *G. oxydans* mit dem Dismembrator

Zur Präparation von RNA aus *G. oxydans* wurden gefrorene Zellen in einer Kugelmühle (Mikro-Dismembrator U, Braun Biotech, Melsungen) aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen bei 9000 rpm, -10 °C pelletiert, der Überstand abgenommen und die Pellets schnellstmöglich in

flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA Präparation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für den Aufschluss wurde der Zylinder der Zelmühle mit Chromstahl-Kugel in Flüssigstickstoff vorgekühlt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in $200\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer resuspendiert und dann in den mit Flüssigstickstoff gefüllten Zylinder pipettiert. Der Zylinder mit der erneut gefrorenen Zellsuspension wurde verschlossen und in den Halter des Dismembrators eingespannt. Der Zellaufschluss erfolgte bei einer Frequenz von 1600 rpm für 3 min . Das entstandene, feingemahlene Zellpellet wurde in 4 ml RLT-Puffer des RNeasy Midi-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen, welchem zuvor $40\text{ }\mu\text{l}$ Mercaptoethanol zugesetzt wurden. Dieser Puffer wirkt aufgrund einer hohen Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration stark protein-denaturierend und damit RNase inhibierend.

13.3 Isolierung der RNA

Die Isolierung und Reinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Für die Elution der RNA wurde ein Volumen von $2 \times 150\text{ }\mu\text{l}$ RNase freiem und sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verwendet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

13.4 Hydrolyse chromosomaler DNA in der RNA-Präparation

Zum Abbau von enthaltener chromosomaler DNA in der RNA Präparation wurde ein DNase-Verdau der RNA Lösung durchgeführt. Dazu wurden zu den maximal $300\text{ }\mu\text{l}$ wässriger RNA Lösung $65\text{ }\mu\text{l}$ 5x DNase-Puffer und $20\text{ }\mu\text{l}$ DNase ($10\text{ U}/\mu\text{l}$; Roche, Mannheim, Deutschland) gegeben. Nach der dreistündigen Hydrolyse der DNA durch Inkubation bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, wurde die DNase durch 10 minütige Inkubation bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inaktiviert. Die vollständige Hydrolyse der DNA wurde mittels PCR überprüft. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung sollte nur in der Positivkontrolle mit genomischer DNA von *G. oxydans*

als Matrize ein Amplifikat sichtbar sein. Anderenfalls wurde der DNase Verdau wiederholt.

13.5 PCR zur Kontrolle der DNA-Hydrolyse

Die hier beschriebene PCR diene zur Kontrolle des vollständigen DNase-Verdau der RNA-Präparation. Als Positivkontrolle diene die genomische DNA von *G. oxydans* als Template. Zur Amplifikation wurde Taq-DNA-Polymerase der Fa. Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland) verwendet.

Ansatz		
RNA-Präparation		3 µl
Taq-Reaktionspuffer, +(NH ₄) ₂ SO ₄ , -MgCl ₂ (10x)		2 µl
MgCl ₂ (25 mM)		1,6 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)		2 µl
Primer rev (10 pmol/µl)		2 µl
dNTP mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		2 µl
H ₂ O _{bidest.}		7,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)		0,2 µl
Programm		
Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	67°C	1 min
Elongation	72°C	2 min
Elongation	95°C	5 min
30 Zyklen		

13.6 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von RNA

In der RNA-Präparation verbliebene Proteine, wie z.B. die DNase, wurden durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Dazu wurde der RNA 1 Vol. saures Phenol (TE-gesättigt) zugegeben. Der Ansatz wurde 10 s auf dem Schüttler gründlich gemischt, und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Hierbei erfolgte eine Phasentrennung. In der oberen, wässrigen Phase war die gelöste RNA enthalten, in der Interphase befanden sich denaturierte Proteine. Die obere Phase wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die abgenommene RNA-haltige Phase wurde mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, ebenfalls 10 s gemischt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde erneut abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA-Konzentration erfolgte eine Fällung mit Ethanol. Die in Wasser gelöste RNA wurde mit 1/10 Vol. Na-Acetat (3,3 M, pH 5,0) und 2,5 Vol. -20 °C kaltem, unvergälltem Ethanol (96 %) versetzt und gemischt. Die Fällung erfolgte anschließend über Nacht bei -20 °C oder für eine Stunde bei -70 °C. Nach einem Zentrifugations-schritt (13.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Ethanol vorsichtig mit einer Pipette vom transparenten RNA-Pellet abgenommen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Alkohol wurde erneut vorsichtig abgenommen. Das geöffnete Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde in einem sterilen Becherglas bei 37 °C für ca. 15 min getrocknet. War der Ethanol verdampft, wurde das Pellet in 30 µl RNase freiem H₂O_{bidest} aufgenommen. Zum Lösen der RNA wurde 1 h auf Eis und anschließend 3 h bei RT unter gelegentlichem Mischen mit der Pipette inkubiert. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -70 °C.

13.7 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration von RNA erfolgte analog der Konzentrationsbestimmung von DNA. Dabei entsprach eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

13.8 Analyse der RNA-Integrität mit dem Bioanalyser 2100

Um die Integrität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde diese in einem Bioanalyser (Bioanalyser 2100, Agilent, Waldbronn) aufgetrennt. Die dazu verwendeten Chips enthalten Bohrungen für die Proben, zum Auftragen des Trenngels und für einen externen Standard. In die Glasplatte des Chips sind Mikrokanäle eingearbeitet, die die Bohrungen miteinander zu einem Netzwerk verbinden. Bei der Vorbereitung des Chips werden diese Mikrokanäle mit einem Trenngel und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt, so dass aus dem Chip ein integrierter elektrischer Schaltkreis wird. In dem angelegten Spannungsgradienten werden geladene Biomoleküle, wie RNA, DNA und Proteine, durch das konstante Masse/Ladungsverhältnis und die auftrennende Polymermatrix ihrer Größe nach aufgetrennt. Während des Laufes interkalieren Farbstoffmoleküle in die DNA- oder RNA-Stränge. Diese Komplexe werden durch Laser induzierte Fluoreszenz detektiert.

Die so gewonnenen Daten werden in Banden (*gel like images*) und Scheitelpunkte (Elektropherogramme) konvertiert. Anhand des externen Standards, der Fragmente bekannter Größe enthält, wird eine Standardkurve von Laufzeiten erstellt und somit der Laufzeit eines Fragments unbekannter Größe eine Größe zugeordnet. Alle zur Auftrennung der RNA notwendigen Reagentien sowie eine ausführliche Arbeitsvorschrift lagen dem hier verwendeten verwendeten Agilent RNA 6000 Nano Kit bei.

13.9 PCR durch Reverse-Transkription von RNA (RT-PCR)

Neben der Analyse der RNA mittels Bioanalyser diene eine PCR durch Reverse Transkription von RNA (RT-PCR) der Qualitätskontrolle der isolierten RNA. Dazu wird die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese anschließend amplifiziert. Das OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) ermöglicht die Reverse Transkription und PCR in einem Arbeitsschritt. Der PCR Ansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

PCR-Ansatz	
RNA (1 µg)	x µl
One Step RT PCR Puffer 5x	5 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTP mix	2,5 µl
One Step Enzym Mix	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	25-x µl

PCR Programm:		
Reverse Transkription	50°C	30 min
Denaturierung	95°C	15 min
Denaturierung	94°C	1 min
Annealing	67°C	1 min
Elongation	72°C	1 min
Elongation	72°C	10 min
30 Zyklen (Schritt 3 bis 5)		

13.10 Relative quantitative *real-time* RT-PCR

Grundlage der *real-time* RT-PCR sind Farbstoffe oder Fluorophore, deren Einbau in die DNA die Kinetik der Polynukleotid-Synthese durch PCR messbar macht. Dazu wird die mRNA der Zellen präpariert und in

einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. In der nachfolgenden PCR interkaliert das Fluorophor *SYBR green* unspezifisch in doppelsträngige DNA. Zunächst verläuft die PCR-Produktbildung annähernd linear. Limitierende Faktoren, z.B. die Abnahme der dNTP-Konzentration, eine verminderte Enzymaktivität und die Anhäufung von Pyrophosphat, verlangsamen jedoch die Produktbildung in der späten Phase der PCR-Reaktion. Die Quantifizierung bei der *real-time* RT-PCR erfolgte über den C_t -Wert (*cycle threshold*). Hierbei handelt es sich um die Zykluszahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal einer Probe eine Signifikanzgrenze überschreitet.

Bei der hier verwendeten relativen Quantifizierung wird die Expressionsänderung einer Nukleinsäuresequenz relativ zur Expression der gleichen Sequenz bei einer Referenzbedingung gemessen. Um Unterschiede in der eingesetzten RNA-Konzentration zu eliminieren, wird eine endogene Kontrolle mitgeführt, deren Expression unter den untersuchten Bedingungen konstant sein sollte. Die Expressionsänderung wird schließlich durch die $\Delta\Delta C_t$ -Formel (Talaat *et al.*, 2002) ausgedrückt. Diese lautet:

$$\text{Expressionsänderung} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

wo $\Delta\Delta C_t$ für Gen $j = (C_{t,j} - C_{t,\text{endogene Kontrolle}})_{\text{Bedingung1}} - (C_{t,j} - C_{t,\text{endogene Kontrolle}})_{\text{Bedingung 2}}$

Die zur Amplifikation verwendeten Primer hatten eine Länge von 20-23 bp, eine Schmelztemperatur von etwa 62 °C und wurden so gewählt, dass Amplifikate mit einer Größe von ca. 150 bp entstanden.

Sämtliche Arbeiten wurden unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Für den Ansatz der *real-time* RT-PCR wurde zuerst ein Mastermix, bestehend aus QuantiTect *Mastermix* (Kit-Inhalt) und dem Enzymmix (Kit-Inhalt) hergestellt. Dieser wurde dann auf die zu testenden RNAs aufgeteilt (*Premix*). Die Primer wurden in 96 Kalotten *thin-wall* PCR Platten, Kalottenvolumen 0,2 ml (Fa.

BioRad, München) vorgelegt und anschließend 20 μl des *Premix* zugegeben. Der PCR Ansatz hatte insgesamt die folgende Zusammensetzung:

PCR-Ansatz	
RNA (400 ng)	x μl
Primer 1 (5 pmol/ μl)	2,5 μl
Primer 2 (5 pmol/ μl)	2,5 μl
QuantiTect Mastermix	12,5 μl
Enzym Mix	0,25 μl
H ₂ O _{bidest.}	25-x μl

I-Cycler Programm			
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1 (Reverse Transkription)	50°C	30 min	1
2 (Aktivierung DNA-Polymerase)	95°C	15 min	1
3 (Real-Time PCR)	94°C	15 s	45
	62°C	30 s	
	72°C	30 s	
4 (Finale Elongation PCR)	72°	1 min	1
5 (Bestimmung Schmelzpunkt)	55°C +0,5°C Zyklus	10 s	80

13.11 Hybridisierung und Auswertung von Microarrays

Die Genexpressionsanalyse dient der Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung zellulärer mRNA, wofür typischerweise die relativen Expressionsstärken zweier Proben miteinander verglichen werden. Bei diesen Proben handelt es sich um RNA, welche aus Zellen gewonnen wird, die zum einen unter Standard- oder Referenzbedingungen und zum anderen unter den experimentell zu untersuchenden Bedingungen gewachsen sind.

Die für die Hybridisierung verwendete RNA (*targets*) wird mit den fluoreszierenden Cyanin Farbstoffen Cy3 und Cy5 (GE Healthcare, Cy3-

dCTP, Cat no. PA53021, Cy5-dCTP, Cat no. PA55021) markiert. Die jeweils korrespondierenden Fluoreszenzsignale der beiden Farbstoffe können nach der Hybridisierung der *probes* mit den *targets* unabhängig voneinander mit dem GenePix 4000B (AXON Instruments, Union City, USA) Scanner detektiert werden. Als *probes* werden in diesem Zusammenhang die immobilisierten Nukleinsäuresequenzen auf der Oberfläche des DNA-Microarrays bezeichnet. Die Verwendung von Fluoreszenz ermöglicht, im Vergleich zu einer radioaktiven Markierung, neben höherer Auflösung, das Auswerten von zwei oder mehreren verschiedenen Signalen in einem Experiment. Im Anschluss an eine Normalisierung der Daten kann die Intensität der Hybridisierungssignale miteinander verglichen werden. DNA-Microarrays geben keine Information über die absoluten Expressionsstärken in den untersuchten Proben, da die Fluoreszenzsignale auch von der Anzahl eingebauter Farbstoffmoleküle abhängt, der Markierungsdichte. Letztere wird in erster Linie durch die variable Nukleotidsequenz der Gene bestimmt.

Für die Transkriptionsanalysen von DNA-Microarrays standen PCR amplifizierte Fragmente zur Verfügung.

13.11.1 Markierung von RNA mit Cy3/Cy5 Fluoreszenzfarbstoff

Die Markierung der isolierten RNA erfolgte über eine reverse Transkription mit *random nonamers* als Primer. Für die Hybridisierung der als Kontrolle verwendeten *ScoreCard* wurde in Form eines *spike mix* spezifische RNA (*Lucedia Universal ScoreCard*, Amersham Biosciences) für beide Farbreaktionen mitgeführt. Während des Umschreibens der RNA werden CyDye markierte dCTPs in die cDNA eingebaut. Die restlichen dNTPs werden ohne eine Markierung als dCTP Nukleotid Mix zugegeben. Es kam hierbei der Cyscribe First Strand cDNA Labeling Kit (Amersham Biosciences) zum Einsatz.

Als erster Schritt des Markierens erfolgte das Annealing der *random nonamers* an die RNA, wofür 25 µg RNA benötigt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Markierungseffizienz der Farbstoffe wurden für eine

Hybridisierungsreaktion ein Ansatz Cy3 und zwei Ansätze Cy5 markiert. Es ist zu bemerken, dass die Cyanin Farbstoffe stark lichtempfindlich sind und daher die Reaktionsansätze der Markierung, sowie die markierten Proben möglichst lichtgeschützt behandelt wurden. Das Annealing fand im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg) statt:

Annealing-Ansatz			
25 µg		isolierte RNA	
1 µl		<i>spike mix</i> für Cy3 oder Cy5 Reaktion	
1 µl		<i>random nonamers</i>	
ad 11µl		H ₂ O	

Annealing-Programm			
1	HOLD	5 min / 70°C	
2	TEMP GRADIENT	3,0°C/min to 50°C	
3	TEMP GRADIENT	1,0°C/min to 40°C	
4	TEMP GRADIENT	0,3°C/min to 35°C	
5	TEMP GRADIENT	0,2°C/min to 30°C	
6	TEMP GRADIENT	0,1°C/min to 25°C	
7	TEMP GRADIENT	0,1°C/min to 22°C	
8	HOLD	20 min	22°C
9	TEMP	FOREVER	16°C

Im Anschluss wurden dem Annealing-Ansatz folgende Komponenten für die reverse Transkription hinzugefügt:

Ansatz für die reverse Transkription	
11 µl	Annealing Ansatz
4 µl	5x CyScript Puffer
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	dCTP Nukleotid Mix
1 µl	dCTP CyDye-markierte Nukleotide (Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP)
1 µl	CyScript Reverse Transkriptase (100 U/µl)

Die 20 µl Reaktionsansätze wurden kurz gemischt, abzentrifugiert und 1,5 h bei 42 °C im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf inkubiert. Um die Template RNA und nicht eingebaute CyDye Nukleotide zu entfernen, erfolgte anschließend eine zügige Aufreinigung der markierten cDNA. Zunächst wurde die RNA durch Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH in kurze Oligomere hydrolysiert. Die Ansätze wurden gevortext, kurz abzentrifugiert und 15 min bei 37 °C für die Hydrolyse im Mastercycler Gradient inkubiert. Um die Lösung zu neutralisieren wurden im Anschluss 10 µl 2 M HEPES hinzugegeben, gevortext und wiederholt zentrifugiert. Im Anschluss daran folgte eine Aufreinigung der markierten cDNA über eine Säule des illustra CyScribe GFX Purification Kits (GE Healthcare, Cat no. 27-9606-02).

13.11.2 Aufreinigung der markierten cDNA

Die Aufreinigung der markierten cDNA erfolgte mit dem illustra CyScribe GFX Purification Kit. Zunächst wurden hierzu 500 µl *Capture Buffer* auf die Säule pipettiert, die Markierungsansätze hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Cyanin Farbstoffe wurden die folgenden Schritte möglichst lichtgeschützt durchgeführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 sec bei 13000 U/min, wobei die cDNA an die Säulenmatrix bindet. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen und nach der Zugabe von 600 µl Waschpuffer wieder für 30 sec bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und der Waschschrift weitere zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Eluation der markierten *target* cDNA in ein neues Reaktionsgefäß, indem 70 µl 70 °C warmer Elutionspuffer auf die Säule gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert wurde. Das markierte cDNA enthaltende Eluat konnte bis zur Hybridisierung lichtgeschützt auf Eis gelagert werden.

13.11.3 Überprüfung der Markierungsreaktion

Um die Effizienz der Markierungsreaktion bewerten zu können, wurde ein *Wavelength scan* mit der markierten cDNA mit Hilfe des Nanodrops durchgeführt. Die Absorptionsmaxima von eingebautem Cy3/Cy5 liegen bei 550/650 nm, von freiem Cy3/Cy5 bei ca. 520/600 nm.

13.11.4 Hybridisierung der cDNA

Die Hybridisierung der *probes* mit der markierten *target*-cDNA erfolgte vollautomatisch mit dem *Automated Slide Processor* (ASP Lucidea, Amersham Pharmacia Biotech). Vorbereitend wurde die *target*-cDNA denaturiert und die benötigten Hybridisierungskammern des ASP gespült. Die Denaturierung der *target*-cDNA erfolgte durch 5 minütiges Inkubieren bei 95 °C, anschließender Abkühlung auf Eis und der Zugabe von 50 µl *Microarray Hybridization Buffer* des Cyscribe First Strand cDNA Labeling Kits (Amersham Biosciences), sowie 110 µl 100 % (v/v) Formamid. Der Ansatz wurde gemischt, bei 13000 U/min kurz abzentrifugiert und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 µl des Hybridisierungsansatzes mit einer Hamiltonspritze in die Hybridisierungskammer des ASP, in welche bereits ein gespotteter DNA-Microarray eingespannt wurde, injiziert.

13.11.5 Quantifizierung der Microarraydaten mit GenePix Pro 6.0

Zur Verarbeitung der Hybridisierungsdaten wurden diese mit dem Scanner GenePix 4000B (AXON Instruments, Union City) und dem Programm GenePix Pro 6.0 visualisiert. Bereits während des Scannens erfolgte bei Verwendung der PCR-basierenden DNA-Microarrays eine erste Normalisierung der Arraydaten über Kontroll-Proben der sog. *Scorecard*. Hierbei handelt es sich um spezifische DNA, welche mit den *probes* gespottet wurde. Diese DNA wurde mit spezifischer RNA, die als *spike mix* dem Markierungsansatz hinzugefügt wurde, hybridisiert. Da die beiden den Markierungsansätzen hinzugefügten Kontrollen eine

Fluoreszenzintensitätsverhältnis von 1:1 ergeben sollten, wurde bei dem Prescan die Scanstärke (PMT 635 nm – Cy5; PMT 532 nm – Cy3) für die beiden Farbstoffe anhand der Fluoreszenz der Kontrollen ermittelt. Anschließend erfolgte der Hauptscan. Für die Quantifizierung der Fluoreszenzwerte jedes einzelnen Spots in GenePix wurde zunächst mit der Software eine Art Schablone auf den Chip gelegt, womit jedem Spot die entsprechende Annotation zugewiesen und der auszuwertende Bereich festgelegt wurde. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Computerprogramms (Ehrenreich, unveröffentlicht) wurde die Schablone, basierend auf einer Excel-Tabelle (Microsoft, Redmond, USA), in Form eines *gal files* generiert. Die Ausrichtung dieser Schablone wurde für jeden einzelnen Spot manuell überprüft. Die Berechnung der Fluoreszenzwerte, des Hintergrunds und der Standardabweichung des Hintergrunds für beide Farbstoffe, sowie des *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* erfolgte für jeden Spot automatisch durch das Programm GenePix Pro. Bei den *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* handelt es sich um jeweils unterschiedliche mathematische Ansätze zu Ermittlung des mittleren Expressionswertes eines Spots. Jeder Spot besteht aus einer Vielzahl von einzelnen Bildelementen (Pixel), für welche jeweils ein Wert der Pixel-Intensität für die Wellenlänge 1 ($IP, \lambda 1$) und der Pixel-Intensität für die Wellenlänge 2 ($IP, \lambda 2$) vorliegt. Die Intensitäten der zwei Wellenlängen, der den definierten Spot umgebenden Hintergrund-Pixel werden ebenfalls mit einbezogen ($IB, \lambda 1$ und $IB, \lambda 2$). Das mittlere Fluoreszenzverhältnis eines Spots wird aus den einzelnen Pixel-Intensitäten berechnet. Der *Ratio of Medians*, der dem geometrischen Mittel entspricht, wird häufig zur Berechnung von Mittelwerten herangezogen, da starke Abweichungen einzelner Werte aus mathematischen Gründen das Endergebnis weniger beeinflussen.

Ratio of Medians:

$$\frac{\{(IP, \lambda 2)_n\}_{med} - \{(IB, \lambda 2)_n\}_{med}}{\{(IP, \lambda 1)_n\}_{med} - \{(IB, \lambda 1)_n\}_{med}}$$

Der *Ratio of Means* hingegen kann mehr von starken Abweichungen einzelner Werte beeinflusst werden.

Ratio of Means:

$$\frac{\sum_{i=1}^n \langle I_{P, \lambda 2} - \{(I_{B, \lambda 2})_m\}_{med} \rangle_i}{\sum_{i=1}^n \langle I_{P, \lambda 1} - \{(I_{B, \lambda 1})_m\}_{med} \rangle_i}$$

Für die Berechnung des *Regression Ratios* ist eine Definition von Pixel, die zu dem eigentlichen Spot gehören, und Hintergrund-Pixel durch die Schablone nicht nötig. Jeder Pixel innerhalb des zweifachen Spotdurchmessers, unabhängig von seiner Position, wird einbezogen. Das Verhältnis der beiden Wellenlängen zueinander wird mittels linearer Regression zwischen den zwei sich ergebenden Pixelwolken ermittelt.

Die Ergebnisse konnten in Form einer Datentabelle und eines *Scatterplots* eingesehen werden. An dieser Stelle erfolgte eine weitere Normalisierung der Daten. Unter der Voraussetzung, dass sich unter den zu vergleichenden Bedingungen nur die Expression einzelner Gene verändert und die Expression eines Großteils der Gene unverändert bleibt, wurde im *Scatterplot* die Hauptwolke der Gene auf die Winkelhalbierende gelegt, also in den Bereich eines Regulationsfaktors von 1. Eine logarithmische Auftragung der Expressionswerte vereinfacht dieses Verfahren zusätzlich, da Spots mit einem Expressionsfaktor von annähernd 1 gestaucht werden und sich die Dichte der Hauptwolke der Daten erhöht.

13.11.6 Analyse der Transkriptionsdaten

Für die weitere Bearbeitung und Analyse der normalisierten Transkriptionsdaten wurden diese aus GenePix Pro in das Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA) exportiert. Hier wurden sämtliche Daten auf Qualität und somit Aussagekraft überprüft. Alle Daten

wurden daraufhin gefiltert, dass die Fluoreszenzsignale für Rot und Grün selbst, und nach Abzug der Standardabweichung des Hintergrundes einen Wert größer Null besaßen. Ein weiteres Merkmal für die Qualität eines Spots war, dass die nach unterschiedlichen mathematischen Verfahren berechneten Expressionsverhältnisse, *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und der *Regression Ratio*, für einen Spot nicht mehr als 30 % voneinander abweichen. Bei starken Diskrepanzen dieser Werte, kann man methodische Artefakte nicht ausschließen. Im Anschluss an die Evaluation der Daten wurden alle ORFs, deren Expression sich unter den jeweiligen Bedingungen mindestens um einen Faktor 3 änderte, herausgefiltert.

14. Sequenzanalyse

Nachdem die Sequenzierung, Editierung und Überprüfung der Assemblierung durch das Göttinger Genomics Laboratory (G2L, Sonja Volland) abgeschlossen war, wurde versucht alle in *G. oxydans* DSM3504 vorkommenden Gene zu identifizieren. Die Vorhersage aller potentiellen Gene in einem Organismus wird als ORF-Vorhersage bezeichnet. Dieses wurde mit entsprechenden Computeralgorithmen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Annotation, wobei versucht wurde jedem ORF eine Funktion zuzuordnen, die das aus dem Gen resultierende Protein beschreibt.

14.1 ORF-Korrektur

Die ORF-Vorhersage ist der erste kritische Schritt, der die Grundlage der Annotation bildet. Da die Daten eines Genoms zu groß und zu vielfältig sind um dieses per Hand durchzuführen, wurden dafür Computer Programme herangezogen. Sämtliche ORF Vorhersageprogramme für Prokaryoten basieren auf dem Auffinden von Start- (ATG, GTG, TTG) und Stopcodons (TAA, TGA, TAG) in allen sechs Leserahmen. Mit Hilfe der Algorithmen werden solche Bereiche festgelegt, die zwischen Start und Stop auf demselben Leserahmen eine

bestimmte Größe erreichen (z. B. 90 bp, also 30 Codone). Darüber hinaus wird überprüft, ob eine potentielle Ribosomenbindestelle vorhanden ist.

Alle ORF-Vorhersageprogramme haben gemein, dass entweder zu viele (*overprediction*) oder zu wenig ORFs identifiziert werden, was eine manuelle Nachbearbeitung der identifizierten offenen Leserahmen unerlässlich macht. Das ORF-Finding wurde vom Göttinger Genomics Laboratory (G2L, Sonja Volland) durchgeführt. Für die anschließende ORF-Korrektur wurde die frei erhältliche Software Artemis (Rutherford *et al.*, 2000), <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>) eingesetzt. Artemis ist ein Programm zur Sequenzvisualisierung und Annotation. Es ist möglich, sich damit alle potentiellen ORFs darstellen zu lassen. Berücksichtigt wird dabei aber lediglich ein definierter Bereich (z. B. 30 Codons) zwischen einem Start- und einem Stopcodon, der in einem einzigen der sechs möglichen Leserahmen liegt. Mit Artemis ist es jedoch auch möglich, sich die aus dem potentiellen ORF ergebende Proteinsequenz anzeigen zu lassen und diese mit der NCBI-Sequenzdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) abzugleichen.

14.2 Genomweite Annotation mit ERGO

Die Annotation hat zum Ziel, jedem aus einem Gen resultierenden Protein eine Funktion zuzuordnen. Zur Erleichterung dieser Arbeit gibt es verschiedene Computerprogramme wie PEDANT, MAGPIE, oder ERGO. Im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen hat man das Programm ERGO etabliert (Fa. Integrated Genomics, Chicago; <http://www.integratedgenomics.com/>; (Overbeek *et al.*, 2003). Es handelt sich dabei um eine lokal installierte Version, so dass auch noch nicht veröffentlichte und sich noch in Bearbeitung befindende Projekte dort eingespeist werden können. Neben der Möglichkeit zur Annotation bietet ERGO noch eine Vielzahl weiterer Funktionen zur Sequenzanalyse. Bei der Annotation von *G. oxydans* wurden die ermittelten ORFs in ERGO eingelesen. Zum Einen berechnet

das Programm mittels FASTA die Ähnlichkeiten aller *G. oxydans*-ORFs zu Sequenzen der internen ERGO-Datenbank, wobei dieses sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Proteinebene geschieht. Darüber hinaus führt ERGO auch einen BLAST aller ORFs mit der externen NCBI-Datenbank durch. Der externe NCBI-Sequenzabgleich umfasst eine Vielzahl von Nukleotid- und Proteinsequenz-Datenbanken wie die PDB- (<http://www.rcsb.org/>), SwissProt- (<http://www.expasy.org/sprot/>), Pir- (<http://pir.georgetown.edu/>), EMBL- (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) und die GenBank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Auf diese Art und Weise wurde jedem ORF aus *G. oxydans* eine Funktion zugeordnet, basierend auf den Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Genen und Proteinen. Wenn keine Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen vorhanden waren, bezeichnete das Programm den entsprechenden ORF als hypothetisch. Diese automatische Annotation ist in der Regel jedoch nicht ausreichend und mit zu vielen Fehlern behaftet. Daher war es notwendig jeden einzelnen ORF zu überprüfen. Eine Fehlerquelle der automatischen Annotation ist z. B., dass ERGO dem betrachteten ORF die Funktion desjenigen Proteins zuwies, das den höchsten Ähnlichkeitswert (Smith-Waterman-Score) zum betrachteten ORF aufwies. Gerade bei geringer Homologie, also einem niedrigen Smith-Waterman-Score, zeigte sich jedoch, dass die dem ORF zugewiesene Funktion oft zu ungenau oder aber zu speziell war (Waterman, 1984). Bei der Überprüfung der automatischen Annotation wurde die dem ORF zugewiesene Funktion mit den Funktionen der homologen Proteine verglichen. Dabei wurden zunächst die Ähnlichkeitswerte überprüft. Um die Signifikanz eines Alignments zu bestimmen wurde ein weiterer Wert in Betracht gezogen - der E-Value. Der E-Value gibt die Anzahl der Sequenzen wieder, die bei einer zufälligen Datenbanksuche mit gleicher Querysequenzlänge und Datenbankgröße den gleichen Score, wie der beobachtete, erreicht. Je niedriger der E-Value, desto signifikanter ist das Alignment. Eine signifikante Homologie zwischen zwei Proteinsequenzen wird im allgemeinen definiert als eine Proteinidentität größer als 30 % bei einer Überlappung (*Alignment*), von mehr als 60 % der Eingabe (*query*)- und

der Vergleichssequenz (*subject*). Insbesondere wurde darauf geachtet, ob sich unter den homologen Proteinen eines betrachteten *G. oxydans*-ORFs auch eines (oder mehrere) befand, das bereits biochemisch charakterisiert war. Bei einer entsprechend hohen Homologie wurde dem ORF dessen Funktion vorrangig zugewiesen. Oft wurde auch noch einmal ein BLAST mit der NCBI-Datenbank durchgeführt und das Ergebnis mit der Annotation verglichen. Gegebenenfalls erfolgte eine manuelle Änderung der bestehenden Annotation.

III. Ergebnisse

1. Etablierung eines markerfreien Deletionssystems in *Gluconobacter oxydans* mittels des *upp*-Gens

Aufgrund der biotechnologischen Relevanz von *Gluconobacter oxydans* ist es von großer Bedeutung molekulare Mechanismen verstehen zu können. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung ist die Etablierung eines markerfreien Deletionssystems, welches Ziel dieser Arbeit war. Mit dessen Hilfe könnten konkrete Aussagen über den Zentralstoffwechsel sowie über die membranständigen Dehydrogenasen getroffen werden.

Bisher erfolgten Deletionen durch den Austausch des zu deletierenden Gens durch ein Antibiotika-Resistenzgen (Hölscher and Görlich, 2006; Hölscher *et al.*, 2007). Jedoch können durch diese Vorgehensweise polare Effekte auf die „*downstream*“ Region nicht ausgeschlossen werden. Hinzu kommt, dass Mehrfachmutationen erschwert werden, da die Anzahl von Antibiotika-Resistenzgenen begrenzt ist. Außerdem ist die Verwendung eines Antibiotikums in industriellen Fermentationen sehr selten.

In vielen Bakterien, Archaeen und in Eukaryonten werden in Deletionssystemen Gene aus dem Purin und Pyrimidin Stoffwechsel für Gegenselektionen eingesetzt. Darunter befinden sich die Gene *upp* (kodiert für eine Uracil-PRTase), *pyrE/ura5* (kodiert für eine Orotat-PRTase), *hprT* (kodiert für eine Hypoxanthin-PRTase) und *pyrF/ura3* (kodiert für eine Orotidin-5-Phosphat Decarboxylase). Mit Hilfe dieser Gene wurden in unterschiedlichen Organismen Deletionssysteme aufgestellt (Boeke *et al.*, 1984; Boeke *et al.*, 1987; Peck *et al.*, 2000; Fabret *et al.*, 2002; Bitan-Banin *et al.*, 2003; Pritchett *et al.*, 2004; Kristich *et al.*, 2005).

Das Prinzip beruht auf dem Einbau toxischer Basen-Analoga in den Nukleotidstoffwechsel. Dabei spielen die Phosphoribosyltransferasen (PRTase) eine entscheidene Rolle, indem sie freie Purin- oder

Pyrimidinbasen in ihre korrespondierende Nukleotid-Monophosphate umwandeln. Zusätzlich können PRTasen Basenanaloga (z.B. 5-Fluorouracil) in den Stoffwechsel einschleusen, was einen toxischen Effekt auf die Zelle ausüben kann (Abb.III.1).

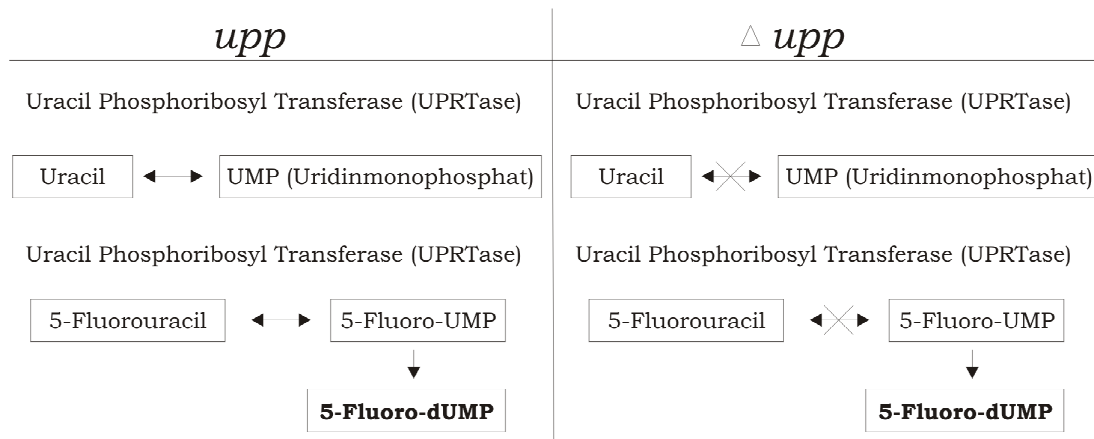


Abb.III.1: Übersicht der Wirkungsweise von der Uracil Phosphoribosyl Transferase (UPRTase); Uracil wird mittels der UPRTase zu Uridinmonophosphat (UMP) umgewandelt. Ist 5-FU im Medium enthalten, so kann dies durch die UPRTase zu 5-fluoro-UMP umgewandelt werden, welches zu 5-fluoro-dUMP reagiert. 5-dUMP ist ein starker Inhibitor der Thymidylat Synthase, welche essentiell für die DNA-Reparatur und Replikation ist.

Eine PRTase-Mutante ist resistent gegenüber dem Analogon, da der Antimetabolit nicht in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Durch das Einbringen einer funktionalen Kopie vom Gen der PRTase in die Zelle, mittels PCR-Produkt oder Plasmid, würde die Basis für eine Gegenselektion geschaffen werden.

In dieser Arbeit wird das Gen *upp* zur Gegenselektion verwendet. Das Gen *upp* kodiert dabei für die Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase), ein Schlüsselenzym für die Verwertung von Uracil. Mittels der UPRTase wird Uracil zu Uridinmonophosphat (UMP) umgesetzt, ein wichtiges Zwischenprodukt der Pyrimidinbiosynthese. Das toxische Basenanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) wird ebenso von der UPRTase verwertet, wodurch 5-Fluorouridinmonophosphat (5-Fluoro-UMP) entsteht (Abb.III.1). Dieses 5-Fluoro-UMP reagiert weiter zu 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (5-Fluoro-dUMP), welches an

das Enzym, die Thymidylat-Synthase, bindet und sie inaktiviert. Diese Enzyminaktivierung bewirkt, dass kein Thymidylat (dTMP) mehr aus Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) umgewandelt werden kann. Thymidylat ist ein wichtiges Zwischenprodukt für die Synthese von Thymidin, welches ein wichtiger Bestandteil der DNA ist. Infolgedessen ist die DNA-Reparatur sowie die Replikation gehemmt. Diese Gegenselektion durch 5-FU wird in dieser Arbeit als Grundlage für die Etablierung eines markerfreien Gen-Deletionssystems eingesetzt, indem das *upp*-Gen deletiert und in trans zur Gegenselektion verwendet wird.

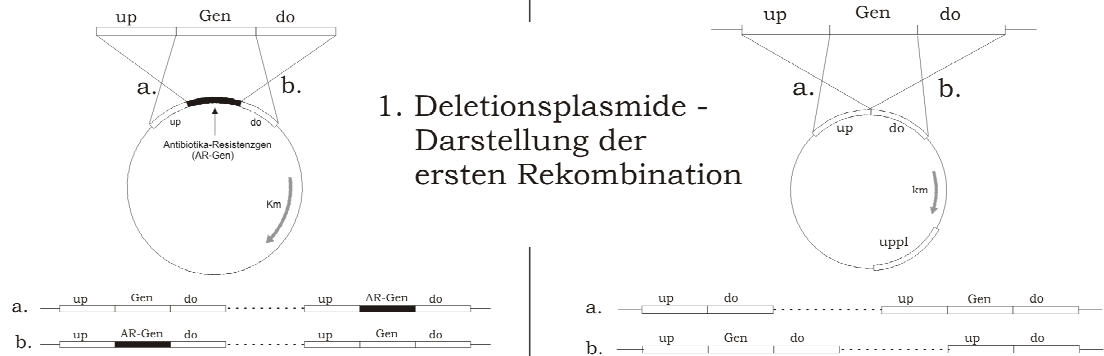
Mit diesem Prinzip konnte eine markerfreie Deletionsmethode für *G. oxydans* 621H sowie für den *G. oxydans* DSM7145 aufgestellt werden. In Abb.III.2 wurde die bisherige Insertions-Methode mit Hilfe einer Antibiotika-Resistenzgen-Kassette gegenüber der in dieser Arbeit neu entwickelten markerfreien-Gendeletions Methode dargestellt.

Wildtyp-Zustand



Strategie der bisherigen Deletionsmethode - Konstruktion von Insertionsmutanten
Ausgangsstamm: *G. oxydans*

In dieser Arbeit neu entwickelte Strategie zur Herstellung von Gen-Deletionen - Konstruktion von markerfreien Mutanten
Ausgangsstamm: *G. oxydans* Δupp



1. Deletionsplasmide - Darstellung der ersten Rekombination

2. zweite Rekombination

Selektion auf das Antibiotikaresistenzgen

Selektion auf 5-Fluorouracil

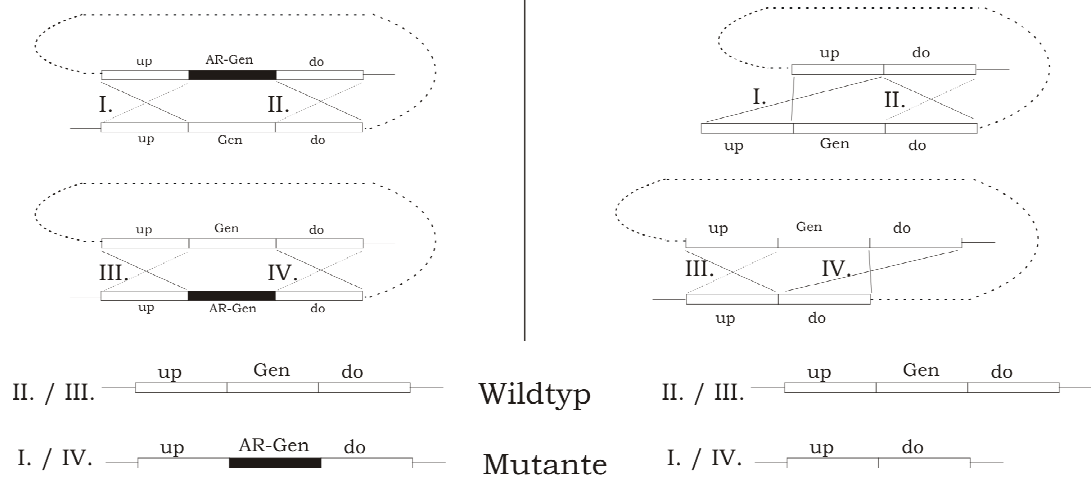


Abb.III.2: Gegenüberstellung der Insertionsdeletions-Methode mit der in dieser Arbeit entwickelten markerfreien-Gendeletions Methode; 1. Darstellung der Deletionsplasmide und der ersten Rekombination; 2. Schema der zweiten Rekombination, wobei II. / III. den Wildtyp und I. / IV. den gewünschten Mutantenzustand widerspiegelt

1.1 Überprüfung der Sensitivität von 5-Fluorouracil (5-FU)

Der erste Schritt zur Etablierung des *upp*-Deletionssystems war die Überprüfung der Sensitivität von 5-Fluorouracil in *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145. Dafür wurde eine Testreihe in Flüssig- sowie in Festmedium mit unterschiedlichen 5-FU Konzentrationen durchgeführt. Die gewählte Ausgangskonzentrationen von 5-FU betrug 1µg/ml, wobei eine Steigerung bis 200µg/ml erfolgte. Anhand der Ergebnisse der Testreihen (Daten nicht gezeigt) konnte eine toxische Endkonzentration von 50µg/ml 5-FU für *G. oxydans* 621H sowie 60µg/ml 5-FU für *G. oxydans* DSM7145 festgelegt werden.

1.2 Deletion des *upp*-Gens (Gox0327) in *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145

Nach der Überprüfung der Sensitivität von 5-FU wurde das *upp*-Gen in den beiden Stämmen *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145 deletiert. Die Deletion des *upp*-Gens bewirkt eine Resistenz gegenüber 5-FU und somit wurde eine Grundvoraussetzung für die Etablierung eines neuen markerfreien Deletionssystem in *G. oxydans* geschaffen. Für die Deletion von *upp* wurde als erstes eine Deletionsfusion konstruiert (s. 1.2.1).

1.2.1 Herstellung der Deletionsfusion (*upp-up/upp-do*) von *upp* (Gox0327)

Für die Deletion des *upp*-Gens (Gox0327) wurde das *upp-upstream* und das *upp-downstream* Fragment mittels getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Tab.III.1 beinhaltet die jeweiligen verwendeten Primer und die daraus entstehenden Größen der Flanken. Die Primer wurden so konstruiert, dass die jeweils äußeren Primer Restriktionsschnittstellen besaßen und die jeweils inneren Primer-Extensions, welche revers komplementär zueinander waren.

Tab.III.1: Primer für die Deletion von Gox0327 (*upp*)

Fragment	Primer	Größe in bp
<i>upp</i> -up	Gox0327do rev	1008
	Gox0327 <i>Xba</i> ldo fwd	
<i>upp</i> -do	Gox0327up fwd	1095
	Gox0327 <i>Hind</i> IIIup rev	

Nach der Amplifikation sowie der Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die up-/do-Fragmente in einer Fusions-PCR mit den äußeren Primern Gox0327*Xba*ldofwd / Gox0327*Hind*IIIuprev fusioniert. Da bei einer Fusions-PCR meist mehrere Produkte entstehen können, wurde die gewünschte Größe mit 2,1 kb ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt.

1.2.2 Herstellung des Plasmids pAJ35 für die Deletion von Gox0327 (*upp*)

Für den Transfer der Fusion Gox0327 zur Deletion des *upp*-Gens in *G. oxydans* 621H sowie *G. oxydans* DSM7145 wurde die Fusion Gox0327up/do in den Vektor pk19mobsacB kloniert. Als erstes wurde die Fusion sowie pk19mobsacB mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III verdaut. Nach dem Verdau des Vektors erfolgte eine Dephosphorylierung um eine Religation zu vermeiden. Im Anschluß wurden die verdauten Fragmente sowie der Vektor ligiert, der Ligationsansatz in *E. coli* S-17 transformiert und anschließend auf LB-Platten mit 50µg Kanamycin (LBkm) ausgestrichen. Die erhaltenen Transformanten wurden auf eine Insertion der *upp*-Fusion über eine Kolonie-PCR überprüft. Bei positiven Transformanten mit der richtigen Größe der Fusion wurde das Plasmid isoliert. Danach erfolgte ein Probeverdau mit den Enzymen *Xba*I und *Hind*III und die Sequenzierung der Gox0327up/do-Fusion. Das entstandene Plasmid wurde pAJ35 genannt (Abb.III.2).

1.2.3 Konjugation von pAJ35 in *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145

Im Anschluss an die Konstruktion des Plasmids pAJ35 erfolgte dessen Transfer in *G. oxydans* 621H sowie in *G. oxydans* DSM7145. Dazu wurde das Plasmid mit Hilfe des *diparentalen mating* in die beiden Stämme konjugiert. Die Überprüfung der ersten Rekombination erfolgte mittels eines plasmid- sowie Chromosomen spezifischen Primer. Danach wurde die zweite Rekombination eingeleitet, wobei die Integrate in Vollmedium mit 10µM Thymidin (VM(M)Thy) angezogen und den nächsten Tag auf VM(M)Thy-5-FU-Platten ausplattiert wurde. Die Inkubation der Platten erfolgte für 2-4 Tage bei 30°C. Die erhaltenen Konjuganten wurden anschließend auf die Deletion des *upp*-Gens überprüft. Dazu wurden die beiden Kontrollprimer Gox0327checkrev und Gox0327checkfwd verwendet. Die gewünschte PCR-Bande hatte eine Größe von 2,7 kb, wobei die Wildtypbande 3,4 kb aufwies (Abb.III.3). Die Konjuganten, mit den Fragmentgrößen der Mutanten, wurden im Anschluß sequenziert und Glycerinkulturen angelegt.

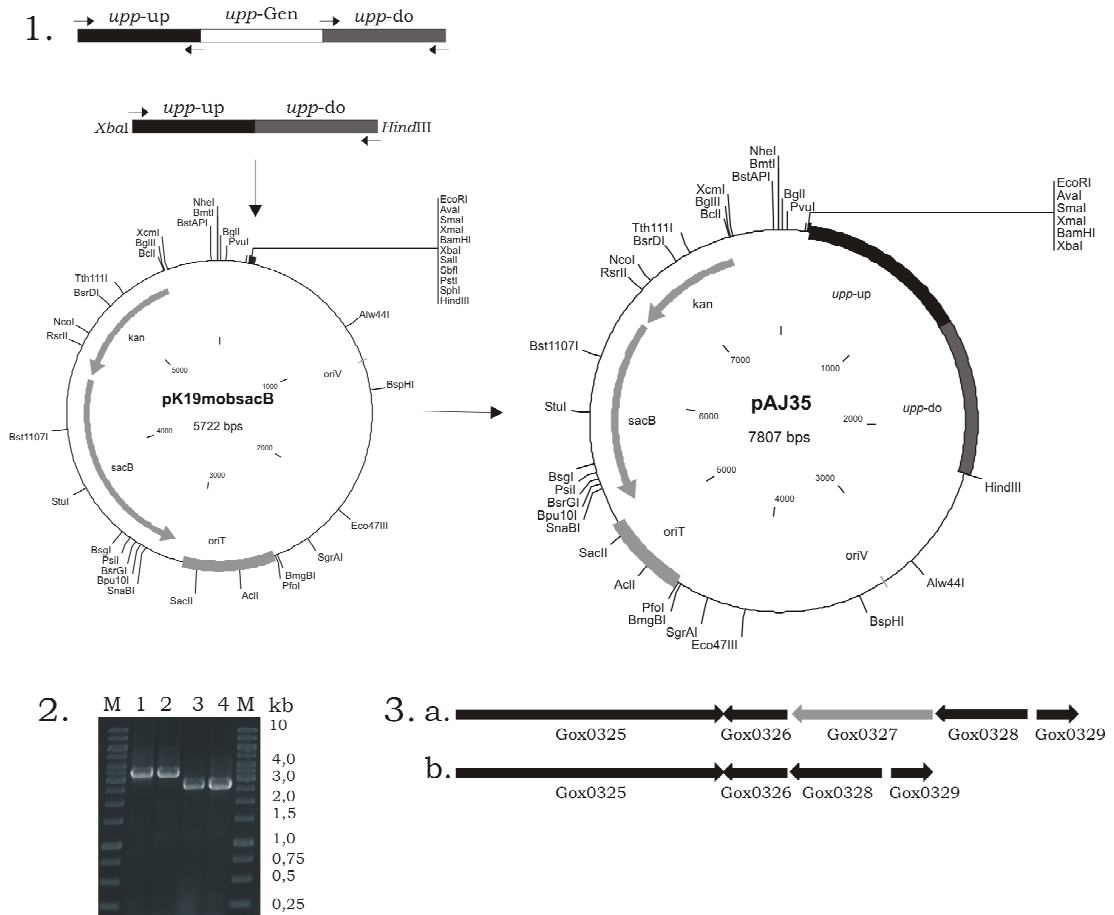


Abb.III.3: Konstruktion einer *G. oxydans* 621H Δupp sowie einer *G. oxydans* DSM7145 Δupp Mutante: **1.** Amplifikation der up / do Fragmente von Gox0327 (*upp*); Fusion der up / do Fragmente; Klonierung der Fusion in pK19mobsacB, das resultierende Plasmid wurde mit pAJ35 benannt. **2.** 1% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der Kontroll-PCR: Primerpaar Gox0327checkfwd - Gox0327checkrev; M=GeneRuler 1kb DNA Ladder; Spur 1: Template chromosomale *G. oxydans* 621H DNA; Spur 2: Template chromosomale *G. oxydans* DSM7145 DNA; Spur 3: Template *G. oxydans* 621H Δupp ; Spur 4: Template *G. oxydans* DSM7145 Δupp ; Wildtypbande bei 3,4kb (Spur 1/ 2), Mutantenbande (Spur 3/4) 2,7kb **3.** genetische Orientierung: a. zeigt den Wildtypzustand b. die Mutante

1.2.4. Wachstumsverhalten der Uracil-Phosphoribosyltransferase Mutanten (*G. oxydans* 621H Δupp und *G. oxydans* DSM7145 Δupp)

Die Thymidin-Biosynthese wurde in den beiden Uracil-Phosphoribosyltransferase Mutanten (*G. oxydans* 621H Δupp und *G. oxydans* DSM7145 Δupp) durch die Deletion des *upp*-Gens gehemmt. Dadurch ist der Organismus nicht mehr in der Lage

Thymidin selber zu synthetisieren. Dem Medium wurde deswegen stets Thymidin hinzugegeben. Um die Überlebensfähigkeit der Mutanten im Vollmedium zu untersuchen, wurden einige Testreihen mit unterschiedlichen Thymidin-Konzentrationen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde eine Endkonzentration von 10 μ M Thymidin festgelegt, die den *upp*-Mutanten mit ins Medium gegeben wurde. Jedoch ist hier anzumerken, dass ein Vollmedium, bestehend aus Hefeextrakt sowie Trypton, selber Thymidin enthält, wodurch die exakte Angabe von Thymidin schwanken kann.

Die Untersuchung, inwieweit sich die Wildtyp-Stämmen von den Uracil-Phosphoribosyltransferase Mutanten (Δupp -Stämmen) hinsichtlich des Wachstumsverhaltens im Vollmedium unterscheiden, war wichtig, da in vielen Folgeexperimente der Δupp -Stamm als Referenzstamm diente. Ein bereits genannter Unterschied war der Defekt der Thymidin-Biosynthese in der *upp*-Mutante und die daraus entstehende 5-FU Sensitivität.

Für weitere Untersuchungen wurden Wachstumsversuche mit den Wildtypen und den Uracil-Phosphoribosyltransferase Mutanten vorgenommen. Da fast alle Folgeexperimente im Vollmedium durchgeführt wurden, diente hier das Vollmedium mit unterschiedlichen Kohlenhydrat-Quellen als Basis.

Die Wachstumskurven mit den Wildtypen *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145 sowie deren Mutanten *G. oxydans* 621H Δupp und *G. oxydans* DSM7145 Δupp zeigten auf den verwendeten Medien mit den unterschiedlichen Kohlenhydrat-Quellen (Mannitol, Gluconat, meso-Erythritol, Xylose und Glycerin) keinen Wachstumsunterschied auf. Einige Wachstumskurven von *G. oxydans* 621H und deren *upp*-Mutante sind in (Abb.III.4) dargestellt. Da kein Wachstumsunterschied beobachtet werden konnte, diente die *upp*-Mutante als Ausgangstamm für weitere Deletionen.

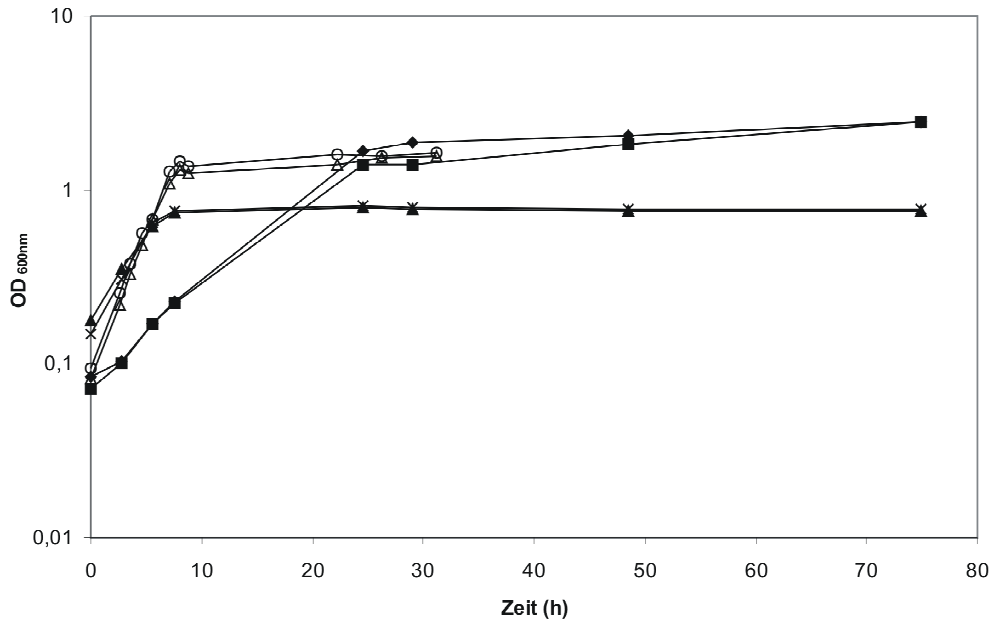


Abb.III.4: Wachstumskurven von *G. oxydans* 621H und der Uracil-Phosphoribosyltransferase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp); Wachstum auf Glycerin: *G. oxydans* 621H (◆), *G. oxydans* 621H Δupp (■); Wachstum auf meso-Erythritol: *G. oxydans* 621H (▲); *G. oxydans* 621H Δupp (×); Wachstum auf Mannitol: *G. oxydans* 621H (○), *G. oxydans* 621H Δupp (△)

1.3. Konstruktion eines Deletionsvektors mit Hilfe des *upp*-Gens

Der nächste Schritt zur Etablierung eines Deletionssystems war den Deletionsvektor zu konstruieren. Die wichtigste Eigenschaft dabei war, dass der Deletionsvektor das *upp*-Gen aus *G. oxydans* 621H besitzt, welches für eine aktive UPRTase kodiert.

Für die Konstruktion des Deletionsvektors wurden zuerst unterschiedliche Fragmentgrößen, welche das *upp*-Gen beinhalten, aus *G. oxydans* 621H amplifiziert und anschließend in die Vektoren pk19mobsacB und pk18mobGII kloniert. Danach wurde die Funktionalität der UPRTase (s.1.3.1) überprüft und das intakte *upp*-Fragment in den Vektor pk18mobGII kloniert (s.1.3.2).

1.3.1 Funktionalität der UPRTase

Ziel war es, das *upp*-Gen mit der eigenen Promotorregion aus *G. oxydans* 621H in den Deletionsvektor zu klonieren. Anhand der

DNA-Sequenz konnte mit Hilfe des Programms Softberry (Softberry Inc., Mount Kisco / USA, <http://www.softberry.com>) kein eigener Promotor vor dem *upp*-Gen (Gox0327) von *G. oxydans* 621H nachgewiesen werden. Eine genaue Betrachtung der *upp*-Region „*upstream*“ sowie „*downstream*“ ließ den Schluß zu, dass es sich hierbei um ein Operon bestehend aus drei Genen (Gox0328, Gox0327, Gox0326) handeln könnte. Hierbei wurde vor dem Gen Gox0328, welches für einen transkriptionellen Regulator kodiert, eine Promotorsequenz ermittelt (Abb. III.5). Diese wäre, wenn es sich um ein Operon handeln würde, auch die Promotorsequenz von dem *upp*-Gen.

```

gggtgcaggc caacaccgca accgccaccg gtctgcccgt tcgggcccga actctgggtc atgctgggtc
ccacagtccg gttgtggcgt tggcggtggc cagacgggca agcccggcgt tgagaccag tacgaccaag
<.....Gox0328.....<<
 p t l g v g c g g g t q g n p g c s q t m

tccggaaaat ctgaaaggcg tcttctgacg atgtatgaaa gcgcggccgt attttgtcac gcattttaag
aggcctttta gactttccgc agaagactgc tacatacttt cgcgccggca taaaacagtg cgtagaattc
                    -35                                -10

```

Abb.III.5: Vermutliche Promotorsequenz von Gox0328; dargestellt ist der DNA-Bereich vom Anfang des transkriptionellen Regulators (Gox0328) und die daraus resultierende Aminosäuresequenz; unterstrichen sind jeweils die -35 sowie die -10 Region,

Da vor dem *upp*-Gen (Gox0327) sowie Gox0326 keine Promotorsequenz nachgewiesen werden konnte, wurden erstmal unterschiedliche *upp*-Fragmentgrößen amplifiziert (Abb.III.6). Dadurch sollte die richtige Fragmentgröße bestimmt werden, die ausreicht, um das *upp*-Gen mit seinem eigenen Promotor korrekt zu exprimieren. Die Tab.III.2 beinhaltet die jeweils verwendeten Primerpaare sowie die Größe der entstehenden unterschiedlichen *upp*-Fragmente, die untersucht wurden.

Tab.III.2: Primerpaare zur Amplifikation und die daraus entstehenden Größen von uppI-uppIV

<i>Template</i> -DNA	Primerpaar	Fragment	Größe bp
chromosomale <i>G. oxydans</i> 621H DNA	Gox0328 <i>Xba</i> I fwd Gox0327 <i>Hind</i> III rev	uppI	1220
	Gox0328 <i>Xba</i> I fwd Gox0326 <i>Hind</i> III rev	uppII	1560
	Gox0328 <i>Xba</i> I fwd1 Gox0327 <i>Hind</i> III rev	uppIII	1640
	Gox0328 <i>Xba</i> I fwd1 Gox0326 <i>Hind</i> III rev	uppIV	2000

Das uppI-Fragment besteht aus Gox0328 mit der eigenen Promotorregion sowie aus dem *upp*-Gen (Gox0327). Damit weist es eine Größe von ca. 1,2 kb auf und zählt somit zu der kleinsten gewählten Fragmentgröße. Zusätzlich zu uppI besitzt das uppII noch das Gen Gox0326, welches für ein hypothetisches Protein kodiert und vermutlich Bestandteil des Operons ist. Das uppIII-Fragment setzt sich aus uppI und einer verlängerten *upstream*-Region von Gox0328 zusammen. Die letzte Fragmentgröße uppIV besteht aus uppIII sowie dem Gen Gox0326 (Abb. III.6).

Die unterschiedlichen Fragmentgrößen wurden in zwei Vektoren pk19mobsacB und pk18mobGII kloniert. Als Vereinfachung für die Klonierung wurden die Restriktionsschnittstellen so gewählt, dass mit den selben Restriktionsenzymen (*Xba*I, *Hind*III) gearbeitet werden konnte.

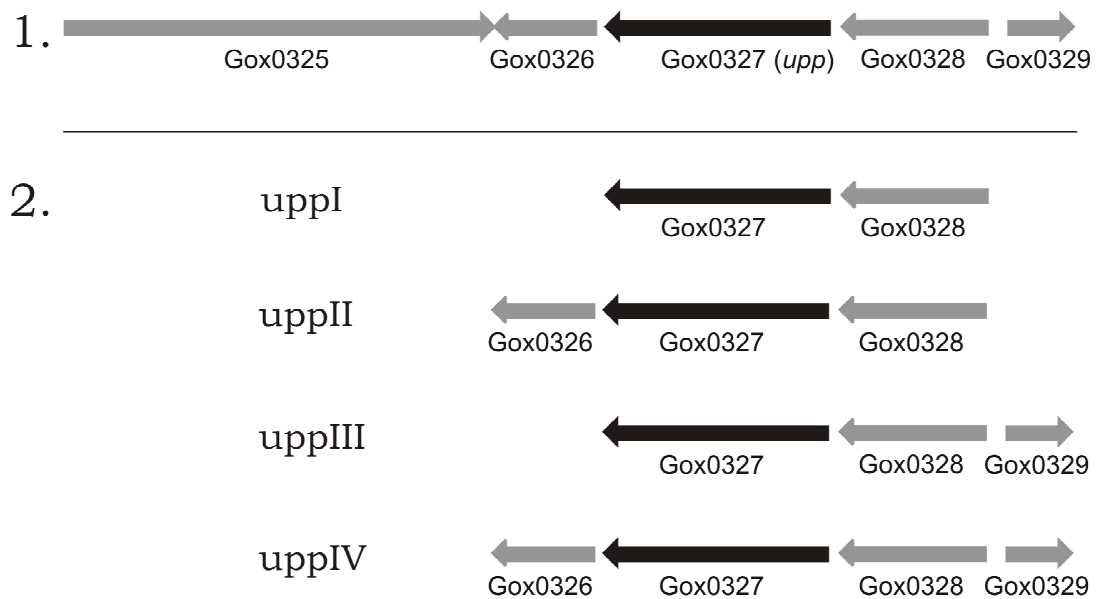


Abb.III.6: Schematische Darstellung der unterschiedlich gewählten Fragmentgrößen zur Untersuchung der Funktionalität der UPRTase für die Konstruktion des Deletionsvektors 1. Anordnung von Gox0327 2. die unterschiedlichen Fragmentgrößen von uppI - uppIV

Nachdem die *upp*-Fragmente sowie die Vektoren verdaut wurden, erfolgte die Ligation. Anschließend wurden die Ligationsansätze in *E. coli* DH5 α transformiert und das Inserts mittels PCR überprüft. Nach der Konjugation durch *triparentales mating* in *G. oxydans* 621H Δupp wurden die Konjuganten auf Vollmedium mit Kanamycin und Cefoxitin ausgestrichen. Die Überprüfung der Konjugation erfolgte mittels plasmidspezifischen Primern. Für den eingesetzten pk19mobsacB wurde das Primerpaar pK19mobsacBcheckfwd / pK19mobsacBcheckrev sowie für den pk18mobGII das Primerpaar 18GIIcheckfwd1 / 18GIIcheckrev1 verwendet. Die daraus resultierenden Stämme sind in der Tab.III.3 aufgelistet.

Anschließend wurde die Funktionalität der UPRTase mittels Wachstumstest auf unterschiedlichen Nährmedien überprüft. Es wurden drei unterschiedliche Plattentypen, mit und ohne Zugabe von Kanamycin sowie 5-Fluorouracil, für dieses Experiment verwendet (Tab.III.3). Durch die Zugabe von Kanamycin wurde auf das Plasmid selektiert. Die Stämme, die auf 5-Fluorouracil gewachsen sind, besitzen ein deletiertes bzw. ein defektes *upp*-Gen. Alle anderen

verfügen über eine intakte UPRTase. Als Kontrollen wurden die Wildtypstämme sowie die *upp*-Mutanten mitgeführt.

Tab.III.3: Wachstum auf unterschiedlichen Nährmedien; VM=Vollmedium, CEF=Cefoxitin, km=Kanamycin, FU=5-Fluorouracil. Aufgelistet sind die Stämme ohne und mit Plasmid; uppI-uppIV gibt die unterschiedlichen Fragmentgrößen von der *upp*-Region an

Stämme	VM	VM/CEF/Km	VM/CEF/FU
<i>G.oxydans</i> 621H	+	-	-
<i>G.oxydans</i> DSM7145	+	-	-
<i>G.oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i>	+	-	+
<i>G.oxydans</i> DSM7145 Δ <i>upp</i>	+	-	+
<u><i>G.oxydans</i> 621H Δ<i>upp</i></u>			
pAJ46 pkmobsacB uppI	+	+	-
pAJ47 pkmobsacB uppII	+	+	-
pAJ48 pkmobsacB uppIII	+	+	-
pAJ49 pkmobsacB uppIV	+	+	-
pAJ50 pkmobGII uppI	+	+	-
pAJ51 pkmobGII uppII	+	+	-
pAJ52 pkmobGII uppIII	+	+	-
pAJ53 pkmobGII uppIV	+	+	-

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte bei den konstruierten Stämmen mit den Plasmiden kein Wachstum auf 5-FU. Das bedeutet, dass eine intakte UPRTase vorliegen muss. Daraus wurde geschlussfolgert, dass alle gewählten *upp*-Fragmentgrößen für die Konstruktion des Deletionsvektors eingesetzt werden können. Es wurde die kleinste Größe mit uppI gewählt, da größere Fragmente gängige Restriktionsschnittstellen aufwiesen, die bei weiteren Klonierungen hinderlich wären.

1.3.2. Konstruktion des Deletionsvektors pAJ63a

Nachdem die Größe für das *uppI*-Fragment festgelegt wurde (s.1.3.1), erfolgte die Klonierung in den Ausgangsvektor *pk18mobGII* (Abb.III.7) (Katzen *et al.*, 1999).

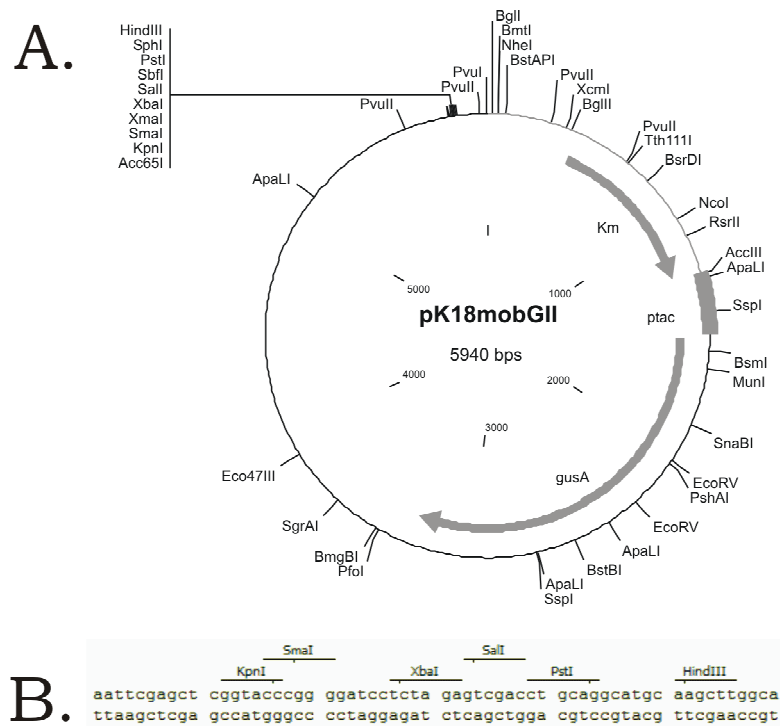


Abb.III.7: A) Plasmidkarte von *pK18mobGII*. Km, Kanamycin Resistenzgen; *mob*, *origin of transfer*; *oriV*, Replikationsursprung bei Plasmiden bei vertikaler Replikation innerhalb des Wirtes; *lacZa*, *lac* Fragment für eine α -Komplementation; *ptac*, *tac* Promotor; *gusA*, β -Glucuronidase Gen **B)** Nukleotidsequenz der MCS, entspricht dem Plasmid *pK18mob*. Quelle: (Katzen *et al.*, 1999)

Eine Strategie den Deletionsvektor zu konstruieren, war die Verkleinerung des Vektors, da je größer ein Vektor ist, desto schwieriger ist der DNA-Transfer in den entsprechenden Organismus. Dem Vektor *pk18mobGII* wurde zum großen Teil das *gusA* Gen, welches für eine β -Glucuronidase kodiert, entfernt. Dies wurde mittels dem Restriktionsenzym *SspI* durchgeführt und dadurch der 5,9 kb Vektor auf 4,5 kb verkleinert. Nachdem Restriktionsverdau wurde die 4,5 kb große Bande ausgeschnitten und aufgereinigt.

Anschließend erfolgte eine Dephosphorylierung sowie eine nochmalige Aufreinigung.

Für die Amplifikation des *uppI*-Fragments (1,3 kb) wurden Primer entworfen, die an ihren Enden *SspI* Schnittstellen besitzen. Nach der Amplifikation des *uppI*-Fragments mittels dem Primerpaar 0327GII*SspI*fwd / 0327GII*SspI*rev wurde das Fragment mit *SspI* verdaut und aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mit dem ebenfalls verdauten pK18mobGII. Im Anschluß wurde der Ligationsansatz in *E. coli* DH5a transformiert. Die Überprüfung des Inserts fand mittels PCR und anschließender Sequenzierung statt. Das daraus resultierende Plasmid besitzt ein Gen, welches für eine funktionale UPRTase kodiert und mit pAJ63a benannt wurde (Abb.III.8).

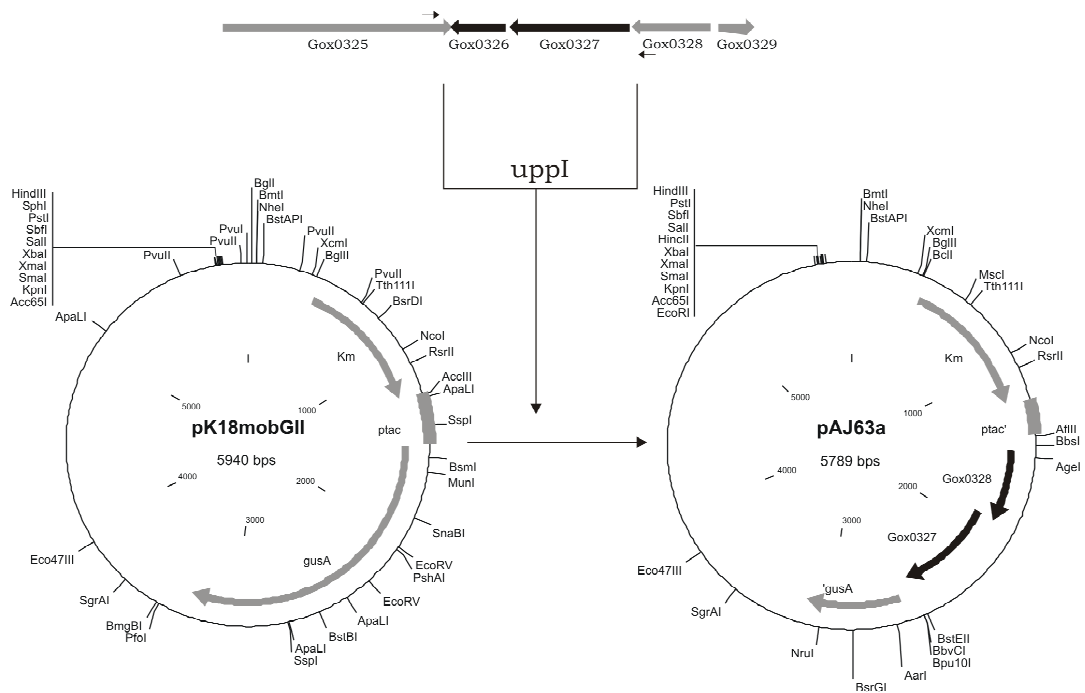


Abb.III.8: Konstruktion des Deletionsvektors pAJ63a; *uppI* wurde mit *SspI* Überhängen amplifiziert und in den geschnittenen pK18mobGII kloniert. Der so entstandene Vektor wurde mit pAJ63a benannt.

1.4 Gox2181 (putative Polyol Dehydrogenase)

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der *upp*-Methode wurde das Gen Gox2181, welches für eine putative Polyol Dehydrogenase kodiert, deletiert.

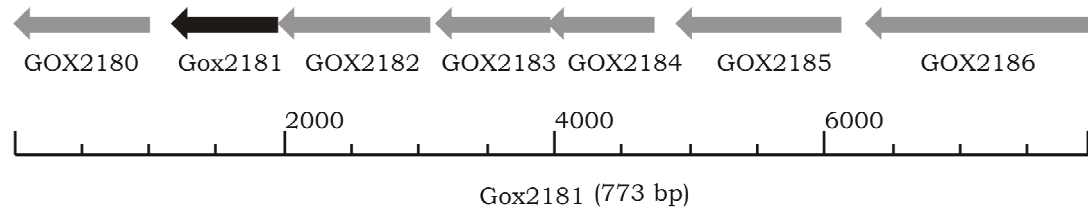


Abb.III.9: Genetische Orientierung von Gox2181

Die Basis für die Deletion von Gox2181 wurde bereits durch die Überprüfung der Sensitivität von 5-FU (s.1.1), die Deletion des *upp*-Gens in *G. oxydans* (s.1.2) sowie die Konstruktion des Deletionsvektors pAJ63a (s.1.3.2) geschaffen.

Das Gen Gox2181 liegt in einem potentiellen Operon (Abb.III.9) und besteht aus 7 Genen (Tab.III.4), wobei das Interessante dabei ist, dass viele dieser Gene am Transport von Polyolen beteiligt sind.

Tab.III.4: Gene des potentiellen Operons und deren Funktionen

Gen	Funktion
Gox2180	TonB-abhängiger Rezeptor
Gox2181	vermutliche Polyol-Dehydrogenase
Gox2182	Mannitol/Sorbitol ABC Transporter Permease Protein
Gox2183	Mannitol/Sorbitol ABC Transporter ATP-bindendes Protein
Gox2184	Mannitol/Sorbitol ABC Transporter Permease Protein
Gox2185	Mannitol/Sorbitol bindendes Protein
Gox2186	Ribokinase

1.4.1 Deletion von Gox2181 (putative Polyol-Dehydrogenase) mittels der *upp*-Methode

Als erstes wurden die Flanken zur Deletion von Gox2181 konstruiert. Diese Flanken waren ca. 1kb groß und lagen einmal *upstream* und *downstream* des zu deletierenden Gens Gox2181. Die Primerpaare für die Konstruktion der up-/down Fragmente sind in Tab.III.5 wiedergegeben. Zusätzlich beinhaltet die Tabelle die jeweils daraus entstehenden Größen der Flanken.

Tab.III.5: Primerpaare für die Konstruktion der Flanken von Gox2181

Fragment	Primerpaar	Größe
2181up	Gox2181upEcoRI fwd	1021bp
	Gox2181uprev	
2181do	Gox2181do fwd	841bp
	Gox2181doXbaI rev	

Nach der Amplifikation der up-/down Fragmente wurden die Flanken in einer PCR mit dem Primerpaar Gox2181upEcoRI fwd / Gox2181doXbaI rev fusioniert. Die Bande mit einer Größe von ca. 1,9 kb wurde ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde die Fusions-Bande mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* / *XbaI* verdaut und die aufgereinigte Fusion mit dem bereits verdauten, dephosphorylierten sowie aufgereinigten pAJ63a ligiert. Der Ligationsansatz wurde dann in *E. coli* DH5a transformiert. Die Kontrolle, ob die Klonierung erfolgreich war, wurde mit Hilfe einer Kolonie PCR überprüft und anschließend durch einen Kontrollverdau sowie Sequenzierung belegt. Das fertige Plasmid wurde mit pAJ70 benannt (Abb.III.10).

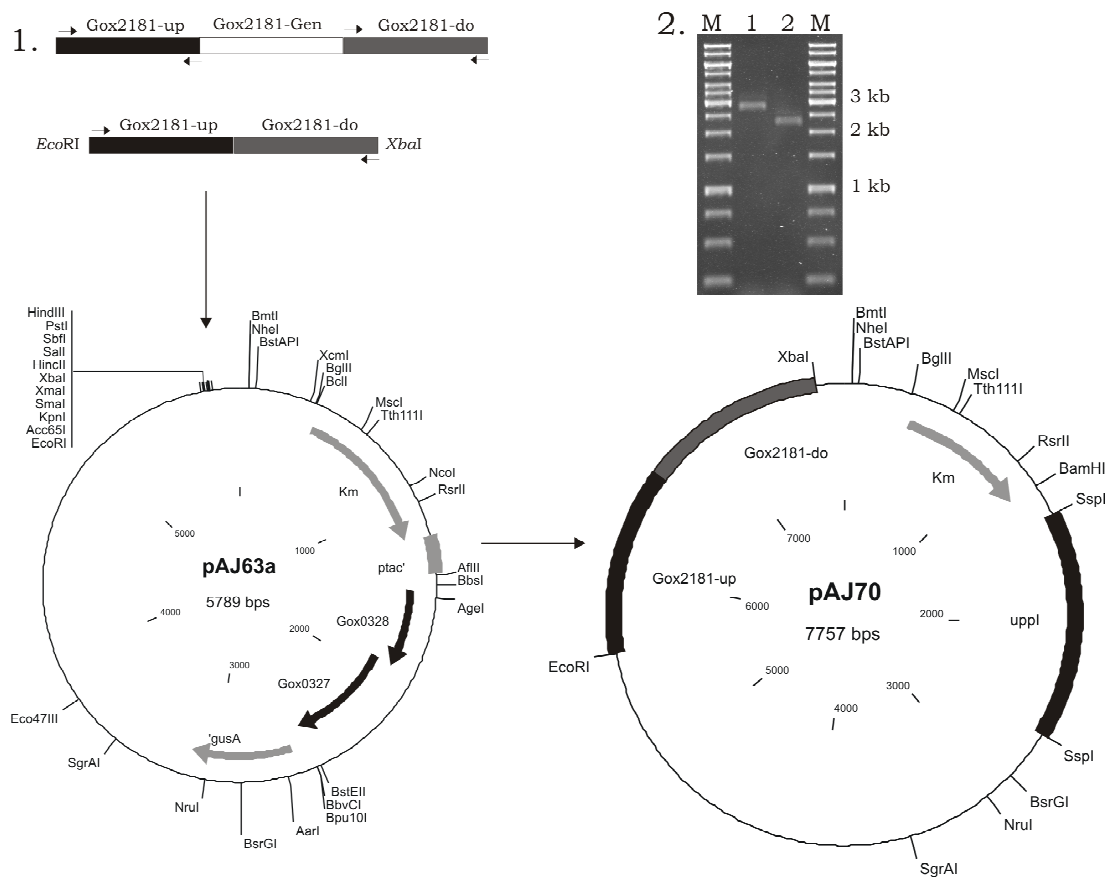


Abb.III.10: **1.** Konstruktion von pAJ70; **2.** 1% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der Kontroll-PCR: Wildtypbande von *G. oxydans* 621H liegt bei 2,97 kb; Polyol-Dehydrogenase Mutante (*G. oxydans* 621H Δ upp Δ Gox2181) bei 2,2 kb

Zur Deletion von Gox2181 wurde pAJ70 mittels *triparentalem mating* in *G. oxydans* 621H Δ upp konjugiert. Die erste Selektion auf das Vorhandensein des Plasmids erfolgte auf Kanamycin-Platten. Die erste Rekombination wurde anschließend mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die Klone, die die erste Rekombination enthielten, wurden in Vollmedium ohne Selektionsdruck angezogen und auf 5-FU Platten ausplattiert. Zur Überprüfung der Klone auf die Deletion von Gox2181 wurde mit dem Primerpaar Gox2181checkrev / Gox2181checkfwd eine Kolonie-PCR durchgeführt (Abb.III.10). Dabei zeigte der Wildtyp eine ca. 3 kb große Bande, wobei die Bande der Mutante bei 2,2 kb lag. Nach erfolgreicher Kontroll-PCR wurde die Mutante sequenziert.

1.4.2 Wachstumskurve der Polyol-Dehydrogenase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox2181$)

Wie bereits beschrieben, handelt es sich hierbei um eine putative Polyol-Dehydrogenase, die in einem interessant organisiertem Operon liegt. Da viele Gene anscheinend am Mannitol-Abbau bzw. Transport beteiligt sind, wurde die Mutante in Vollmedium mit 50mM Mannitol angezogen (Abb.III.11)

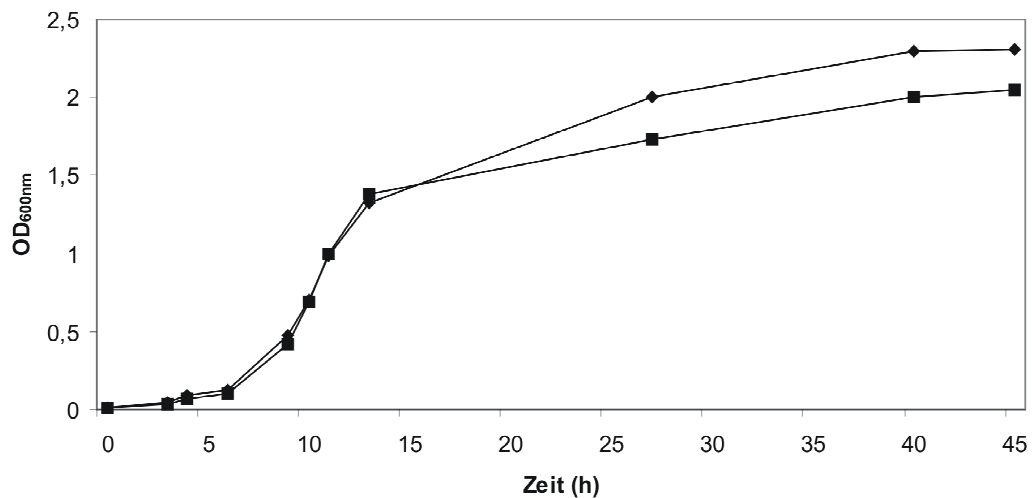


Abb.III.11: Vergleich der Wachstumskurven von *G. oxydans* 621H Δupp mit einer Polyol-Dehydrogenase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox2181$) in Vollmedium mit 50mM Mannitol; *G. oxydans* 621H Δupp (WT) (♦); *G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox2181$ (■)

Die Wachstumskurve der Polyol-Dehydrogenase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox2181$) sowie die des Wildtyps *G. oxydans* 621H Δupp verhalten sich im Vollmedium mit 50mM Mannitol sehr ähnlich (Abb.III.11). Des Weiteren ist ebenfalls kein Wachstumsunterschied in Vollmedium mit 10% Glycerin als Kohlenhydrat-Quelle erkennbar (Daten nicht gezeigt).

1.5. Modifizierte Klonierungsstrategie der *upp*-Methode

Neben der *upp*-Deletionsmethode mit Hilfe eines Deletionsplasmids gibt es eine weitere Variante um Gene zu deletieren. Diese Methode kann angewendet werden, wenn ein anderer Vektor als

Deletionsvektor eingesetzt werden soll. Dazu wird die uppl-Kassette (s.1.3.2) amplifiziert und mit der Fusion up / do des jeweiligen Gens, welches man deletieren möchte, fusioniert.

1.5.1 Deletion der α -Untereinheit der Transhydrogenase (Gox0310) mittels modifizierter Klonierungsstrategie

Die modifizierte Klonierungsstrategie wird anhand der Deletion der α -Untereinheit der Transhydrogenase (Gox0310) vorgestellt. Die Transhydrogenase katalysiert den reversiblen Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen NAD(H) und NADP(H). Die Abb.III.12 stellt die genetische Orientierung der α -Untereinheit der Transhydrogenase (Gox0310) dar.

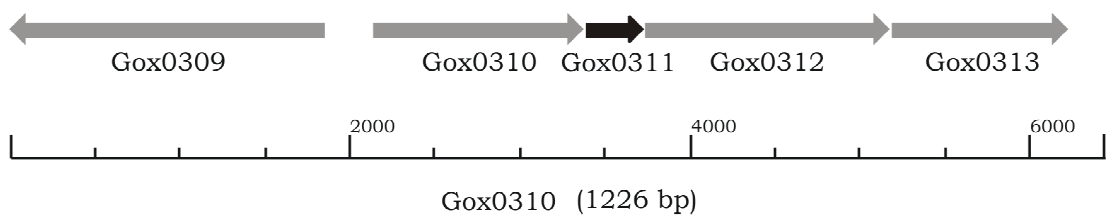


Abb.III.12: Genetische Orientierung von Gox0310

Als erstes wurde für die modifizierte Klonierungsstrategie die uppl-Kassette mit dem Primerpaar Gox0327*Hind*IIIrev und UppI0310Frev amplifiziert. Der UppI0310Frev Primer besitzt einen Überhang, welcher mit 0310upFfwd kompatibel ist. Die jeweiligen up und down Fragmente von Gox0310 wurden mit den Primerpaaren 0310upFfwd / 0310upFrev und 0310doFfwd / 0310do*Xba*Irev amplifiziert sowie miteinander fusioniert. Anschließend wurde das ca. 2,1 kb große up/do-Fragment mit der uppl-Kassette mittels Fusions-PCR verbunden, welches einer Gesamtgröße von 3,4 kb entspricht (Abb.III.13). Die Tab.III.6 gibt die jeweiligen verwendeten Primer sowie die Größen der Fragmente wieder.

Tab.III.6: Primer zur Konstruktion von pAJ55

Fragment	Primerpaar	Größe
0310up	0310upFfwd	1065bp
	0310upFrev	
0310do	0310doFfwd	1057bp
	0310doXbaIrev	
FU0310	Gox0327HindIIIrev	1247bp
	UppI0310Frev	

Im Folgenden wurde die Fusion mit den Restriktionsenzymen *XbaI/HindIII* geschnitten und in den ebenfalls verdauten Vektor, hier wurde als Beispiel der *pk19mobsacB* gewählt, kloniert. Das so entstandene Plasmid wurde mit pAJ55 benannt (Abb.III.13) und anschließend mit Hilfe des *triparentalem mating* in *G. oxydans* 621H Δ_{upp} und *G. oxydans* DSM7145 Δ_{upp} konjugiert. Nach erfolgreicher Überprüfung der ersten Rekombination wurde die zweite Rekombination durch die Zugabe von 5-FU in den Agar eingeleitet. Die erhaltenen Mutanten wurden zunächst mittels PCR mit dem Primerpaar 0310check1fwd / 0310ckeck2rev überprüft und anschließend sequenziert.

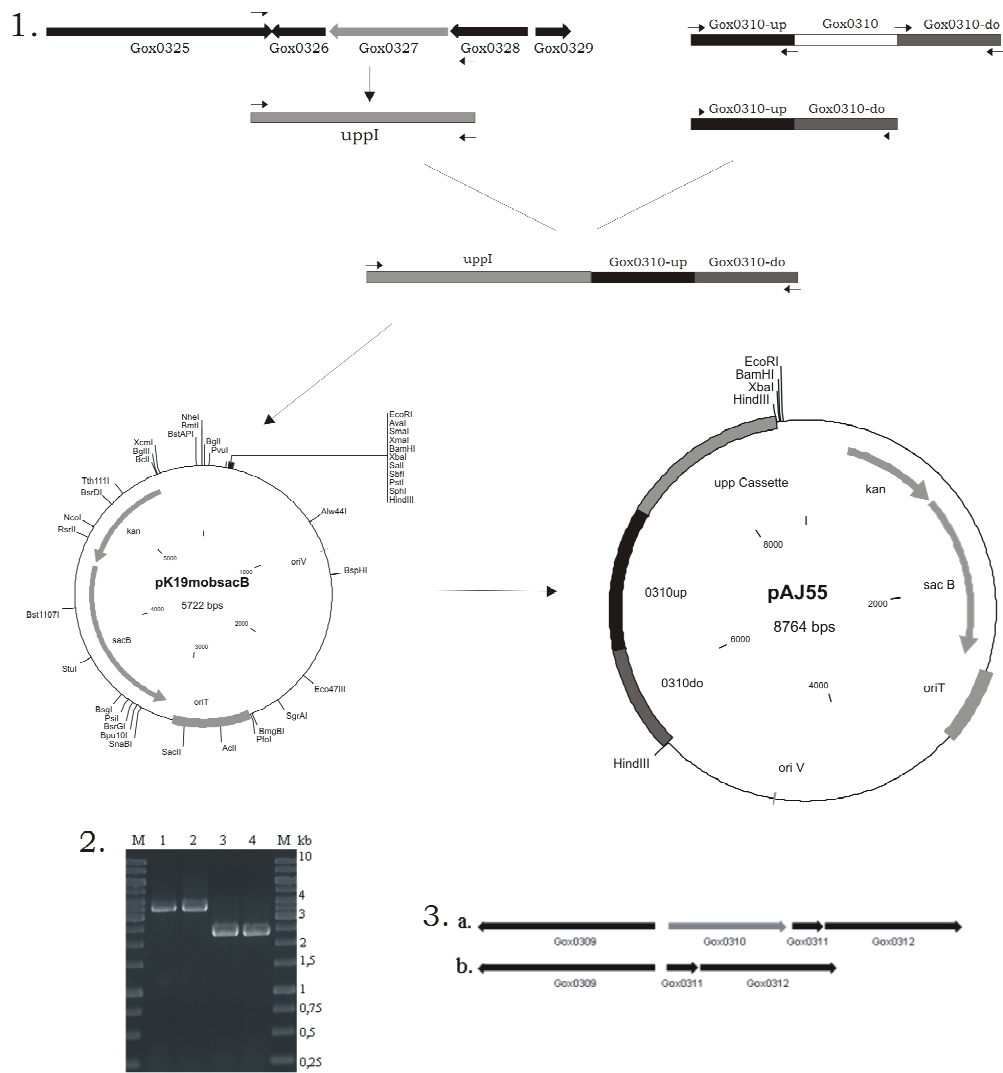


Abb.III.13: Modifizierte Klonierungsstrategie zur Deletion der Transhydrogenase (*Gox0310*): **1.** Amplifikation der *uppI*-Kassette und der *Gox0310up* / *Gox0310do* – Fusion. Fusionierung der *uppI*-Kassette mit den up- / do- Fragmenten von *Gox0310*. Klonierung der gesamten Fusion in *pk19mobsacB*. Erhalt von *pAJ55*. **2.** 1% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der Kontroll-PCR: M=GeneRuler 1kb DNA Ladder; Spur 1: Template chromosomale *G. oxydans* 621H DNA; Spur 2: Template chromosomale *G. oxydans* DSM7145 DNA; Spur 3: Template von *G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0310$; Spur 4: Template *G. oxydans* DSM7145 $\Delta upp \Delta Gox0310$; Wildtypbande bei 3,6 kb (Spur 1/ 2), Mutantenbande (Spur 3/4) 2,4 kb **3.** genetische Orientierung: a. zeigt den Wildtypzustand b. Mutante

1.5.2 Wachstumstests der Transhydrogenase Mutanten (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0310$ und *G. oxydans* DSM7145 $\Delta upp \Delta Gox0310$)

Im Genom von *G. oxydans* wurden drei ORFs identifiziert, die Homologien zu den Untereinheiten bekannter Transhydrogenasen aufweisen (Prust *et al.*, 2005). Es handelt sich um membrangebundene Enzyme, die protonentranslozierende Eigenschaften aufweisen. Sie sind in einem möglichen Operon organisiert, welches aus den Genen Gox0310, Gox0311 sowie Gox0312 besteht (Prust *et al.*, 2005). Die Domäne I der Transhydrogenase (Gox0310) enthält die Bindestelle für NAD(H), wobei die Bindestelle für NADP(H) in der Domäne III vorliegt (Bizouarn *et al.*, 1996; Bizouarn *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde die alpha-Untereinheit der Transhydrogenase (Gox0310), welche die Domäne I beinhaltet, deletiert.

Zur Untersuchung der Transhydrogenase Mutanten (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0310$ und *G. oxydans* DSM7145 $\Delta upp \Delta Gox0310$) wurden Wachstumsversuche auf verschiedenen Substraten (Mannitol, Glycerin, Sorbitol, Erythritol, Gluconat) durchgeführt. Mit den getesteten Substraten konnte kein Phänotyp der Mutanten beobachtet werden. Abb.III.14 zeigt eine Beispiel-Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0310$.

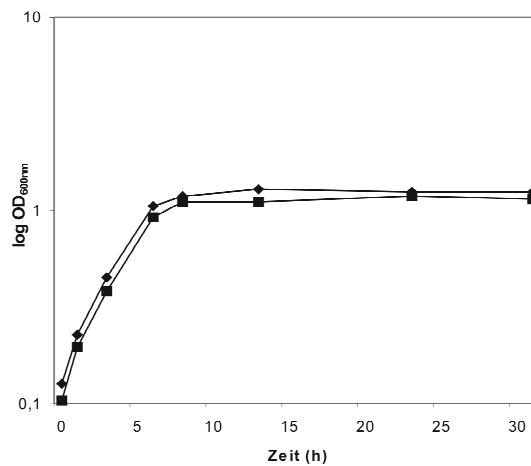


Abb.III.14: Vergleich einer Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H Δupp mit einer Transhydrogenase-Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0310$); angezogen wurden die Stämme in Vollmedium mit 50mM Mannitol (10 μ M Thymidin): *G. oxydans* 621H Δupp (◆), *G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0310$ (■)

2. Untersuchung des Entner-Doudoroff-Weges (ED-Weg)

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist der ED-Weg in *G. oxydans* noch nicht genauer untersucht worden. Es ist bekannt, dass der ED-Weg ebenso wie die Glykolyse zur Energieerzeugung und zur Bereitstellung von reduziertem NADP beitragen kann, jedoch mit einer geringeren ATP-Ausbeute im Vergleich zur Glykolyse. Des Weiteren wurde der ED-Weg bisher am häufigsten in Gram-negativen Bakterien nachgewiesen (Conway, 1992). Welche physiologische Funktion er in *G. oxydans* ausübt, soll in diesem Teil der Arbeit untersucht werden. Dazu wurde zu Beginn als erstes die 6-Phosphogluconat-Dehydratase (Gox0431) sowie die KDPG-Aldolase (Gox0430) deletiert und anschließend die Mutanten mit Wachstumsversuchen und *real-time* RT-PCR Experimenten näher charakterisiert.

2.1 Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydratase (Gox0431)

Die 6-P-Gluconat Dehydratase ist ein Schlüsselenzym im Entner-Doudoroff Weg. Sie wandelt 6-Phospho-D-Gluconat zu 2-dehydro-3-deoxy-6-phospho-D-Gluconat und Wasser um.

Zur Deletion der 6-P-Gluconat Dehydratase wurden als erstes die up-/down-Fragmente amplifiziert. Die verwendeten Primer sowie die Größen der Flanken sind in Tab.III.7 wiedergegeben.

Tab.III.7: Primerpaare zur Deletion von Gox0431

Fragment	Primerpaar	Größe
0431up	0431up <i>Hind</i> III fwd	1025bp
	0431upFrev	
0431do	0431doFfwd	930bp
	0431do <i>Xba</i> I rev	

Nach der Amplifikation der up-/down Fragmente erfolgte eine Fusions-PCR mit dem Primerpaar 0431up*Hind*III fwd / 0431do*Xba*I rev. Die entstandene Fusion sowie der Deletionsvektor pAJ63a wurden mit den Restriktionsenzyme *Hind*III/*Xba*I verdaut. Nach der Ligation und der darauffolgenden Transformation in *E. coli* DH5a wurde das Plasmid mittels Kolonie-PCR, Probeverdau sowie Sequenzierung überprüft. Das resultierende Plasmid wurde mit pAJ67 benannt (Abb.III.15).

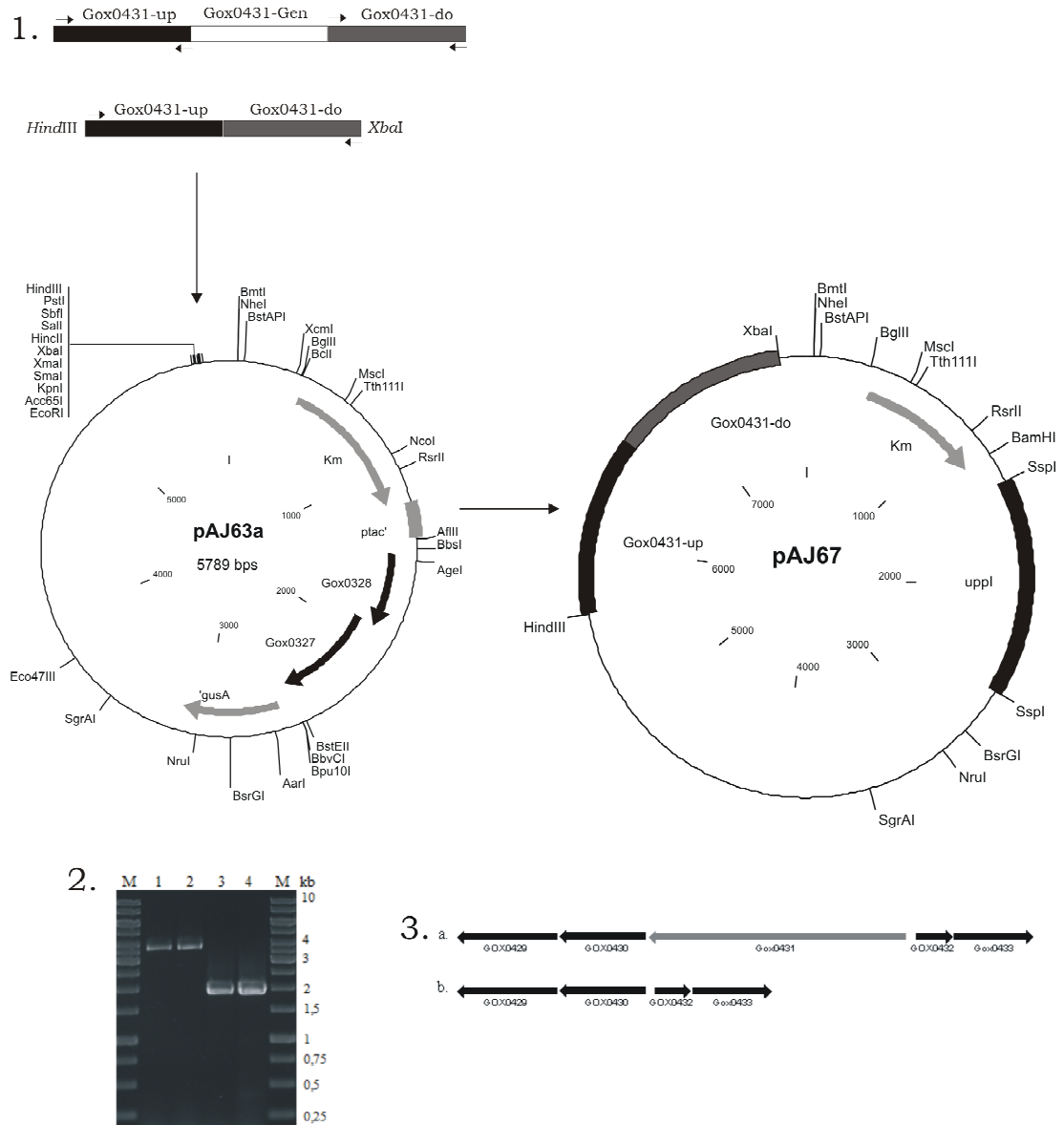


Abb.III.15: **1.** Konstruktion von pAJ67 für die Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydratase: Gox0431-up und Gox0431-do wurden mit den Überhängen von *HindIII* und *XbaI* amplifiziert und anschließend in den verdauten Deletionsvektor kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pAJ67 benannt. **2.** 1% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der Kontroll-PCR: Primerpaar 0431checkrev / 0431checkfwd2; M=GeneRuler 1kb DNA Ladder; Spur 1: *G. oxydans* 621H; Spur 2: *G. oxydans* DSM7145; Spur 3: *G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$; Spur 4: *G. oxydans* DSM7145 $\Delta upp \Delta Gox0431$; Wildtypbande bei 3,8kb (Spur 1/2), Mutantenbande bei 1,9 kb (Spur 3/4) **3.** genetische Orientierung vom WT und der Mutante a. zeigt den Wildtypzustand b. Mutante

Das Deletionsplasmid pAJ67 wurde anschließend mittels *triparentalem mating* in *G. oxydans* 621H Δupp und *G. oxydans* DSM7145 Δupp konjugiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die

Überprüfung der ersten Rekombination mit der Kolonie-PCR. Bei positiv getesteten Klonen wurde die zweite Rekombination eingeleitet. Dafür wurden die Zellen über Nacht in Vollmedium mit Thymidin angezogen und anschließend auf 5-FU Platten ausgestrichen. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Klone auf die Deletion von Gox0431 untersucht. Zur Überprüfung wurde das Primerpaar 0431checkrev / 0431checkfwd2 verwendet. Die Wildtypbande weist dabei eine Größe von 3,76 kb auf, wohingegen bei der Mutante ein 1,9 kb Fragment entsteht (Abb.III.15). Anschließend wurden die erhaltenen 6-P-Gluconat Dehydratase Mutanten sequenziert.

2.1.1 Charakterisierung der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$)

Zur Charakterisierung der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) wurden Wachstumsversuche auf unterschiedlichen Kohlenhydrat-Quellen sowie anschließende *real-time* RT-PCR Experimente durchgeführt.

2.1.1.1 Wachstumskurven der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$)

Da die 6-P-Gluconat Dehydratase ein Schlüsselenzym im Entner-Doudoroff Weg ist und sie 6-Phospho-D-Gluconat zu 2-dehydro-3-deoxy-6-phospho-D-Gluconat umwandelt, wurde zuerst das Wachstum auf Gluconat überprüft. Es konnte beobachtet werden, dass die 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante auf Gluconat eine deutlich geringere OD erreicht (Abb.III.16). Bei diesem Versuch wurde eine Vorkultur aus Vollmedium mit Mannitol als C-Quelle verwendet, um den Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante besser untersuchen zu können, da in einem Medium mit Gluconat das Wachstum über mehrere Passagen sehr schlecht verläuft bzw. kein Wachstum mehr ersichtlich ist.

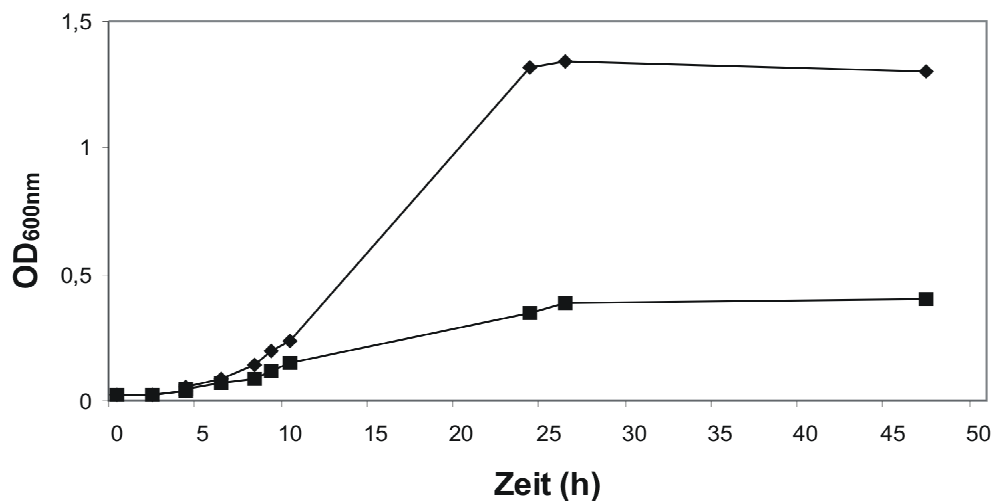


Abb.III.16: Vergleich des Wachstums vom Wildtyp mit der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante in Gluconatmedium – Vollmedium mit 50mM Gluconat; *G. oxydans* 621H Δupp (WT) (◆); 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$) (■)

Eine sehr interessante Beobachtung war, dass die Mutante ein wesentlich besseres Wachstum auf Vollmedium mit Mannitol aufwies im Vergleich zum Wildtyp (Abb.III.17). Dieselbe Beobachtung konnte in Vollmedium mit Glycerin festgestellt werden.

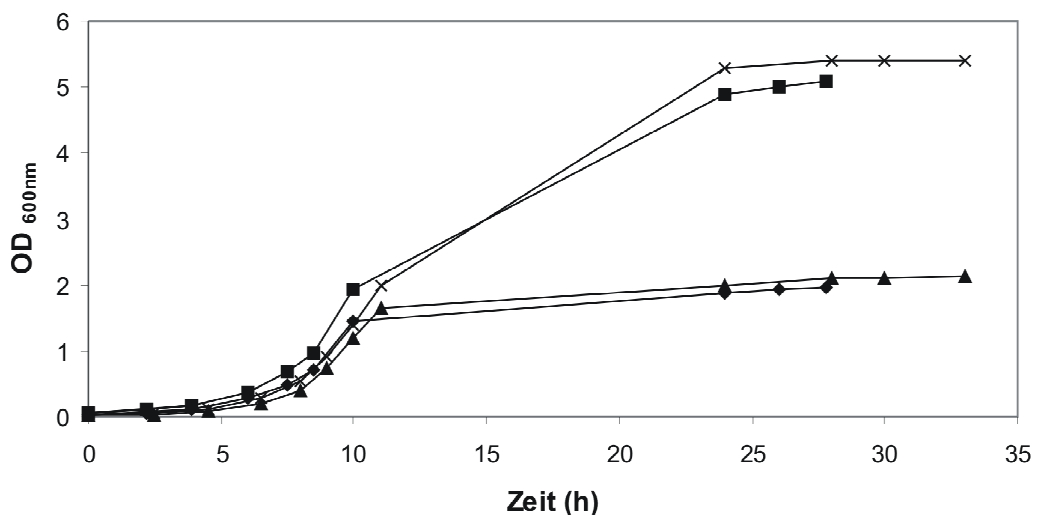


Abb.III.17: Wachstumskurve einer Gluconat-Dehydratase Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf Vollmedium mit 50mM Mannitol (10 μ M Thymidin) und mit 10% Glycerin (10 μ M Thymidin): *G. oxydans* 621H Δupp (◆ / ▲), *G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$ (■ / ×) Wachstumsversuche der Gluconat-Dehydratase Mutante zeigen ein wesentlich verbessertes Wachstum auf VM mit 50mM Mannitol sowie mit 10% Glycerin. Die Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$) zeigt eine wesentlich höhere optische Dichte zum Ende der Wachstumskurve als der Wildtyp

2.1.1.2 Expressionsanalysen einer 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) mittels *real-time* RT-PCR

Zur weiteren Untersuchung der Glukonat-Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) wurden *real-time* RT-PCR Experimente durchgeführt. Die Beobachtung der Wachstumskurve führte zum Ergebnis, dass sich das Wachstumverhalten erst Anfang der stationären Phase vom WT unterscheidet (Abb.III.17). Daher wurde die Expression der Gene Gox1352, Gox1516, Gox0431 und Gox0780 zwischen Mutante und WT einmal in der logarithmischen Phase sowie in der stationären Phase miteinander verglichen. Dazu wurden die beiden Stämme *G. oxydans* 621H Δupp sowie die 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) im Vollmedium mit 50mM Mannitol als Kohlenhydrat-Quelle angezogen. Die Anzucht erfolgte dabei in einer Batch-Kultur. Nach der Ernte folgte die RNA-Präparation sowie die Kontroll RT-PCR. Die Gene, die für die anschließende *real-time* RT-PCR verwendet wurden, sind in Tab.III.8 wiedergegeben.

Für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge im Zentralstoffwechsel erfolgte die Auswahl spezifischer Gene für dieses Experiment. Die Transkription von den Genen Gox1352, Gox1516, Gox0431 und Gox0780 wurde untersucht und die jeweiligen Funktionen der Gene sind in Tab.III.8 aufgelistet. Zur weiteren Verifizierung der Deletion von Gox0431 wurde ebenfalls ein Primerpaar für die Amplifikation des Gens Gox0431 verwendet.

Tab.III.8: *real-time* RT-PCR Ergebnisse von *G. oxydans* 621H Δupp und der 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$), ein Wert größer Null zeigt eine verstärkte Transkription beim Wildtyp, ein Wert kleiner Null zeigt eine verstärkte Transkription in der 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante

Gen	Funktion	1) log. Phase (C _T) log ₂ MW	2) stat. Phase (C _T) log ₂ MW
Gox1352	Ribulose-P-3-Epimerase	3,10	-0,97
Gox1516	Fructose-1,6-Bisphosphatase	-0,47	-3,45
Gox0431	6-P-Gluconat Dehydratase	11,4	9,3
Gox0780	Fructose-bisphosphat Aldolase	1,53	0,81

log₂MW – binärer Logarithmus des Mittelwertes von zwei biologischen unabhängigen Experimenten

Als endogene Kontrollen dienten in dieser Arbeit die β -Untereinheit der DNA-Gyrase (Gox0004) sowie die DNA-Topoisomerase I (Gox1263), deren Expression unter den untersuchten Bedingungen konstant sein sollte. Die Quantifizierung bei der *real-time* RT-PCR erfolgte über den Ct-Wert (*cycle threshold*). Die Expressionsänderung wurde schließlich durch die $\Delta\Delta ct$ Formel (Talaat *et al.*, 2002) berechnet, wobei anschließend der log₂ des Mittelwertes gebildet wurde. Die Ergebnisse der *real-time* RT-PCR sind in Tab.III.8 dargestellt.

Ein Wert größer null spiegelt dabei eine stärkere Expression des Gens in *G. oxydans* 621H Δupp wider, während ein Wert kleiner null für eine stärkere Expression in der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$) spricht.

Wie zu erwarten, war aufgrund der Deletion der 6-P-Gluconat Dehydratase (Gox0431), eine deutlich stärkere Expression im Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) für das Gen Gox0431 nachweisbar (log. Phase 11,4 / stat. Phase 9,4).

Die Deletion der 6-P-Gluconat Dehydratase führte zu einer drastischen Wachstumsabnahme auf Gluconat. Erstaunlicherweise führte diese Deletion jedoch zu einer deutlich höheren OD auf Mannitol und Glycerin. Anhand von *real-time* RT-PCR Experimenten konnte gezeigt werden, dass in der stationären Phase die 6-P-

Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) das Gen *Gox1516*, welches für die Fructose-1,6-Bisphosphatase kodiert, stärker transkribiert wird (-3,45). Im Gegensatz dazu wurde in der logarithmischen Phase ein Wert von -0,47 erhalten, was darauf hindeutet, dass das Gen etwa gleich stark unter dieser Bedingung in den beiden Stämmen exprimiert wird.

Für das Gen der Fructose-bisphosphat Aldolase wurden Werte in der log. Phase von 1,53 und in der stat. Phase von 0,81 erhalten, was eine leicht verstärkte Expression im Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) beinhaltet. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression des Gens *Gox1352*, welches für die Ribulose-P-3-Epimerase kodiert, mit einem Wert von 3,1 in der log. Phase im Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) nachgewiesen werden, wohingegen in der stat. Phase eine leicht erhöhte Expression in der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) mit einem Wert von -0,97 festgestellt wurde.

2.1.1.3 Ribose-inhibierender Effekt auf den Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) sowie auf die 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$)

Ein interessantes Phänomen konnte während des Wachstums beim Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) und der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) nach Zugabe von 10 mM Ribose beobachtet werden. Sowohl die Mutante als auch der WT erreichten nach Zugabe von 10 mM Ribose nur eine geringere OD. Dies wurde sowohl in Vollmedium mit 50 mM Mannitol als auch im Vollmedium mit 150 mM Mannitol beobachtet (Abb.III.18).

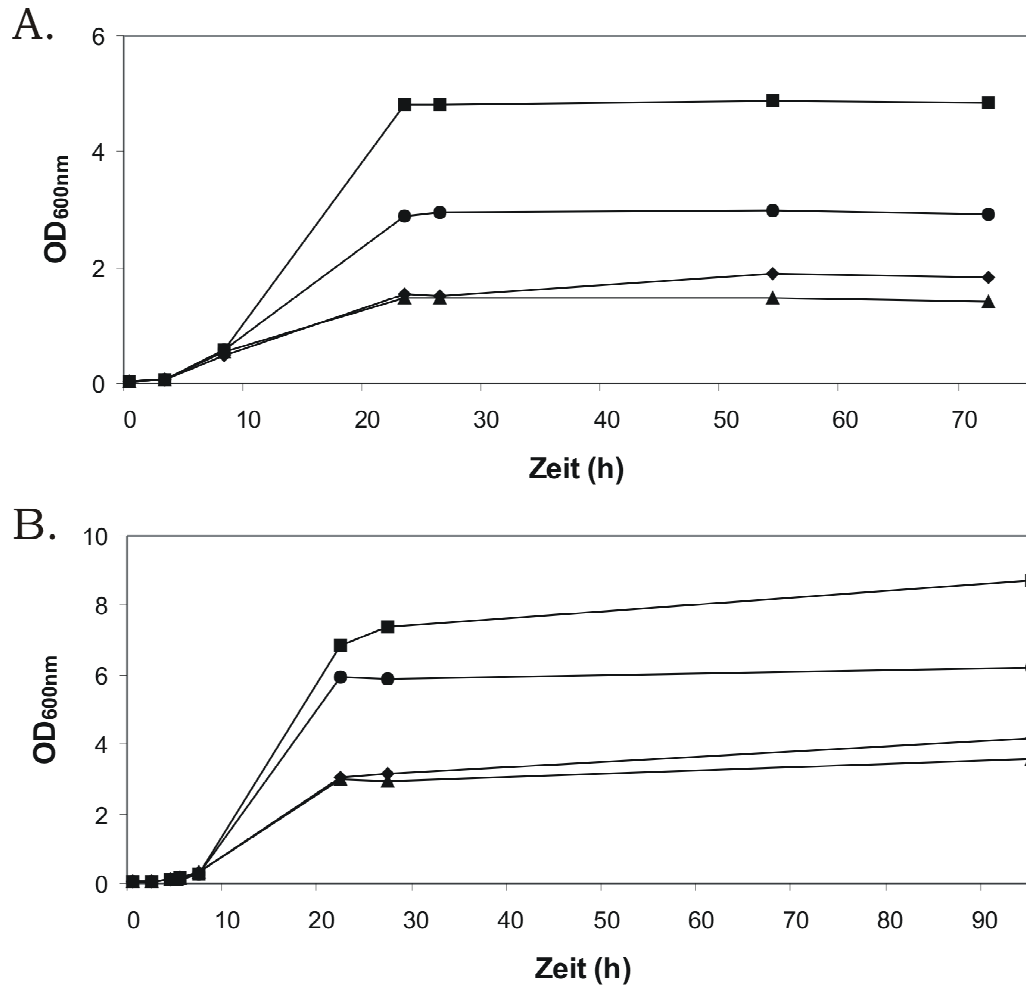


Abb.III.18: Inhibierender Effekt von Ribose auf den Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) und der 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$); dargestellt sind die Wachstumskurven einmal mit und ohne Induktion von 10 mM Ribose **A.** Wachstum in Vollmedium mit 50mM Mannitol **B.** Wachstum in Vollmedium mit 150mM Mannitol; 6-P-Gluconat Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0431$) (■) ohne Zugabe von Ribose, (●) mit 10 mM Ribose; Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) (◆) ohne Zugabe von Ribose, (▲) mit 10 mM Ribose

2.2 KDPG-Aldolase (Gox0430)

Die KDPG-Aldolase (Gox0430) liegt mit der 6-Phosphoglukonat Dehydratase in einem Operon (Abb.III.19). Um ein genaueres Bild über den Ablauf des Entner-Doudoroff Weges zu bekommen und das Verhalten der 6-Phosphoglukonat Dehydratase besser verstehen zu können, wurde auch die KDPG-Aldolase deletiert.

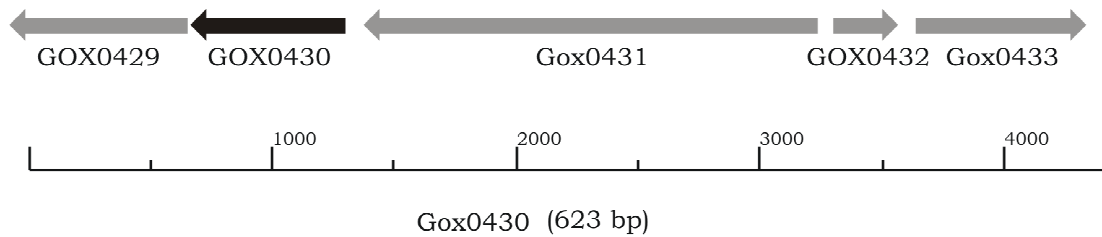


Abb.III.19: Genetische Orientierung der KDPG-Aldolase (Gox0430) und der 6-Phosphoglukonat Dehydratase (Gox0431)

2.2.1 Deletion der KDPG-Aldolase

Die KDPG-Aldolase wurde mittels der *upp*-Methode deletiert. Für die Amplifikation des up-Fragments wurde das Primerpaar 0430up*EcoRI*wd / 0430upFrev verwendet, wohingegen das down-Fragment mit dem Primerpaar 0430do*fwd* / 0430do*XbaI*rev erstellt wurde. Anschließend wurden die beiden Fragmente mittels einer Fusions-PCR verbunden und die Fusionsbande aufgereinigt. Die so erhaltene Gox0430-Fusion wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* / *XbaI* verdaut. Die Ligation erfolgte in den ebenfalls verdauten Vektor pAJ63a. Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* DH5 α transformiert. Die darauffolgende Überprüfung des Plasmids pAJ72 fand anschließend mit Hilfe der Kolonie-PCR und Sequenzierung statt. Nach der Konstruktion des Deletionsvektors pAJ72 wurde dieser in den *G. oxydans* 621H Δ *upp* durch *triparentalem mating* konjugiert. Die Überprüfung der ersten Rekombination erfolgte über Kolonie-PCR.

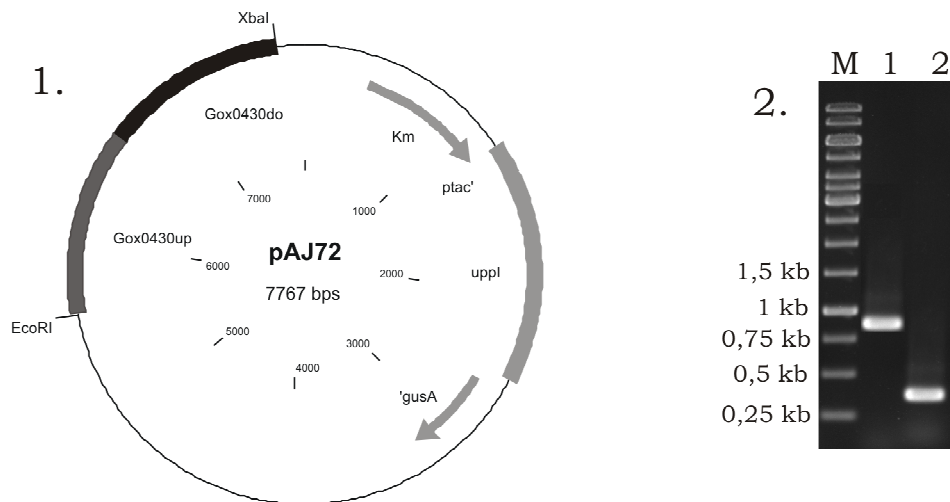


Abb. III.20: **1.** Deletionsvektor pAJ72 zur Konstruktion einer Gox0430 Mutante in *G. oxydans* 621H; **2.** 1% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der Kontroll-PCR: Spur 1: *G. oxydans* 621H - 839bp; Spur 2: *G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0430$ - 394bp

Nach der Integration des Plasmids in das Chromosom, konnte durch das Anziehen der Zellen über Nacht im Vollmedium mit 10 μ M Thymidin und anschließendem Ausstreichen auf 5-FU Platten, die zweite Rekombination eingeleitet werden. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C erfolgte die Überprüfung der Deletion von Gox0430 mit Hilfe des Primerpaars 0430checkfwd2 / 0430checkrev2. Die Wildtypbande läuft bei 839bp, wobei die Mutante eine Fragmentgröße von 394bp (Abb.III.20) aufzeigt. Anschließend wurde die erhaltene KDPG-Aldolase Mutante sequenziert.

2.2.2 Charakterisierung der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0430$)

Ebenso wie bei der 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante war es interessant zu erfahren, wie sich die KDPG-Aldolase Mutante auf Gluconat sowie auf Mannitol als Kohlenhydrat-Quelle verhält. Dazu wurden Wachstumsversuche durchgeführt (s.2.2.2.1)

2.2.2.1 Wachstumskurven der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0430$)

Anhand der Wachstumversuche auf Gluconat konnte ein ähnliches Verhalten der KDPG-Aldolase Mutante zur 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante festgestellt werden (Abb.III.21). Ausgehend von einer Vorkultur aus Vollmedium mit Mannitol als Kohlenhydrat-Quelle, nahm das Wachstum auf Gluconat rapide ab. Während des Passagierens der Mutante im Gluconat-Medium konnte kein Wachstum mehr auf Gluconat beobachtet werden.

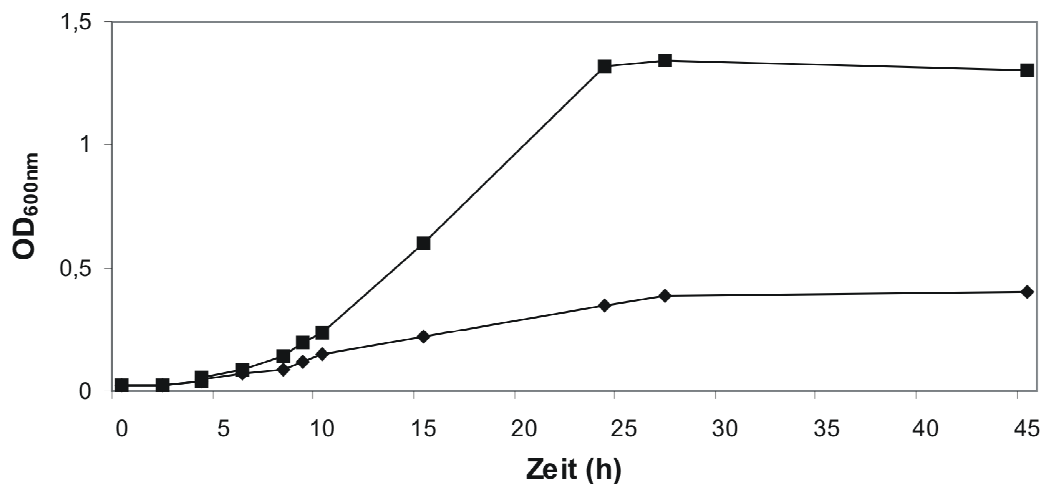


Abb.III.21: Wachstumskurve einer KDPG-Aldolase Mutante im Vergleich zum Wildtyp in Vollmedium mit 50mM Gluconat: *G. oxydans* 621H Δupp (■); *G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0430$ (◆)

Die KDPG-Aldolase Mutante wurde ebenso wie die 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante in Vollmedium mit 50 mM Mannitol angezogen. Allerdings konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0430$) und dem Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) festgestellt werden (Abb.III.22). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$), die eine wesentlich höhere End-OD erreicht als der Wildtyp (Abb.III.17).

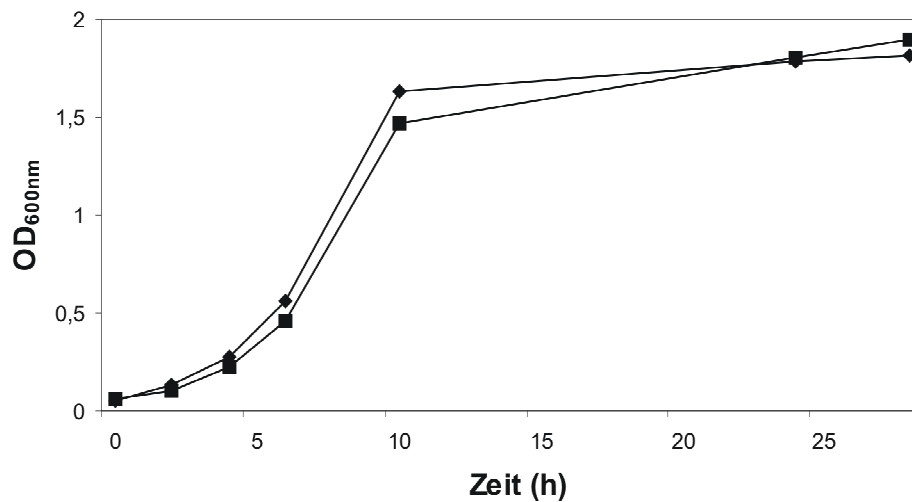


Abb.III.22: Wachstumskurve einer KDPG-Aldolase Mutante im Vergleich zum Wildtyp in Vollmedium mit 50mM Mannitol: Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) (■); KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0430$) (◆)

2.2.2.2 Expressionsanalysen einer KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0430$) mittels *real-time* RT-PCR

Es wurden wie bei der 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante *real-time* RT-PCR Experimente durchgeführt. Die Anzucht der beiden Stämme *G. oxydans* 621H Δupp sowie der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H $\Delta upp \Delta Gox0430$) erfolgte in einer Batch-Kultur im Vollmedium mit 50mM Mannitol. Dazu wurden Proben von der logarithmischen Phase sowie von der stationären Phase geerntet. Danach erfolgte die RNA-Preparation sowie die Kontroll RT-PCR. Die Gene, die für die anschließende *real-time* RT-PCR ausgesucht wurden, sind in Tab.III.9 wiedergegeben.

Die Expression von den folgenden Genen Gox1352, Gox1516, Gox0431 sowie Gox0430 wurde mit Hilfe der *real-time* RT-PCR untersucht. Die jeweiligen Funktionen der Gene sind in Tab.III.9 aufgelistet. Zur weiteren Verifizierung der Deletion der KDPG-Aldolase (Gox0430) wurde ebenfalls ein Primerpaar für die Amplifikation des Gens Gox0430 verwendet.

Tab.III.9: *real-time* RT-PCR Experimente der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0430$), ein Wert größer Null zeigt eine verstärkte Transkription beim Wildtyp, ein Wert kleiner Null zeigt eine verstärkte Transkription in der KDPG-Aldolase Mutante

Gen	Funktion	1) log. Phase (C _T) log ₂ MW	2) stat. Phase (C _T) log ₂ MW
Gox1352	Ribulose-P-3-Epimerase	0,4	-0,8
Gox1516	Fructose-1,6-Bisphosphatase	0,5	-0,67
Gox0431	6-P-Gluconat Dehydratase	-4,4	1,2
Gox0430	KDPG-Aldolase	18,4	17,8

log₂MW – binärer Logarithmus des Mittelwertes von zwei biologischen unabhängigen Experimenten

Als endogene Kontrollen dienten in dieser Arbeit die β -Untereinheit der DNA-Gyrase (Gox0004) sowie die DNA-Helikase II (Gox2390), deren Expression unter den untersuchten Bedingungen konstant sein sollte. Die Quantifizierung bei der *real-time* RT-PCR erfolgte über den Ct-Wert (*cycle threshold*). Die Expressionsänderung wurde durch die $\Delta\Delta ct$ Formel (Talaat *et al.*, 2002) ausgedrückt und anschließend der binäre Logarithmus des Mittelwertes von zwei biologischen unabhängigen Experimenten gebildet. Die Ergebnisse der *real-time* RT-PCR sind in Tab.III.9 dargestellt.

Ein Wert größer null spiegelt dabei eine stärkere Expression des Gens im Wildtyp (*G. oxydans* 621H Δupp) wider, während ein Wert kleiner null für eine stärkere Expression in der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0431$) spricht.

Es konnte, wie zu erwarten, in den Experimenten gezeigt werden, dass kein Transkript von dem Gen Gox0430 in der KDPG-Aldolase Mutante mehr vorhanden ist, da der Wildtyp eine deutlich stärkere Expression von Gox0430 aufwies (log. Phase 18,4 / stat. Phase 17,8). Für das Gen der Fructose-1,6-Bisphosphatase wurden Werte in der log. Phase von 0,5 sowie in der stat. Phase vom -0,67 erhalten, was darauf hindeutet, dass das Gen etwa gleich stark in den beiden Stämmen unter den untersuchten Bedingungen exprimiert wird. Ebenso wurde kein wesentlicher Unterschied in der Regulation des

Gens für die Ribulose-P-3-Epimerase nachgewiesen (log. Phase 0,4 / stat. Phase -0,8).

Jedoch konnte ein großer Unterschied in der Regulation der 6-P-Gluconat-Dehydratase beobachtet werden. Hierbei zeigte sich in der KDPG-Aldolase Mutante während der log. Phase eine wesentlich höhere Transkriptmenge des Gens mit einem Wert von -4,4, wohingegen in der stationären Phase eine leicht erhöhte Expression im Wildtyp mit einem Wert von 1,2 nachgewiesen wurde.

Durch die Sequenzierung der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0430$) wurden zwei Mutationen im *downstream* Bereich gefunden (Abb.III.23).

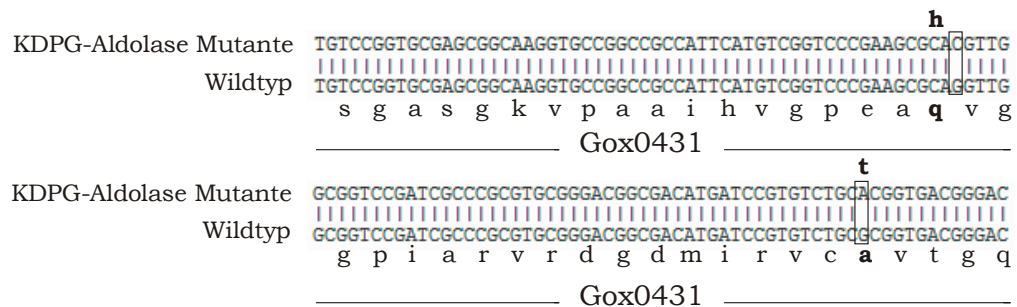


Abb.III.23: Vergleich der DNA-Sequenz der KDPG-Aldolase Mutante mit dem Wildtyp (*G. oxydans* 621H); eingerahmt sind die zwei Mutationen, welche sich *downstream* von Gox0430 befinden und somit in Gox0431 (kodiert für die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase) vorhanden sind, unter der DNA-Sequenz ist der Einbuchstabencode der Aminosäuren, die erste Mutation bewirkt die Veränderung von Glutamin zu Histidin und durch die zweite Mutation wird aus Alanin Threonin

Diese liegen direkt im Gen Gox0431, welches für die 6-P-Gluconat-Dehydratase kodiert. Da jedoch der Wachstumversuch auf Vollmedium mit 50 mM Mannitol einen anderen Phänotyp zeigte als die der 6-P-Gluconat-Dehydratase Mutante und die Expression in der *real-time* RT-PCR für das Gen Gox0431 nachgewiesen werden konnte, wurde mit der KDPG-Aldolase Mutante (*G. oxydans* 621H Δupp $\Delta Gox0430$) weitergearbeitet. Es wird daher davon ausgegangen, dass diese Mutationen (Abb.III.23) keinen Einfluß auf die Funktionsweise der 6-P-Gluconat-Dehydratase haben.

3. Transkriptionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums einer Batch-Kultur von *G. oxydans* 621H

In diesem Experiment wurden Transkriptionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums einer Batch-Kultur von *G. oxydans* 621H durchgeführt. Die Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H unterteilt sich in unterschiedliche Wachstumsphasen, wobei der Anfang der logarithmischen Phase, die mittlere logarithmische Phase sowie die stationäre Phase untersucht wurden. Ziel dieses Experimentes war es zu erfahren, welche bzw. ob Gene in den verschiedenen Phasen unterschiedlich reguliert werden.

Dabei wurde der Stamm *G. oxydans* 621H in einem Chemostat angezogen, um sowohl eine gute Belüftung als auch die gleichzeitige Kontrolle des pH-Wertes gewährleisten zu können. Des Weiteren wurde dadurch eine größere Zellernte ermöglicht. In diesem Experiment wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben aus dem Chemostaten entnommen und bei -4°C abzentrifugiert. Die Falcons mit dem Zellpellet wurden in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Es wurden insgesamt drei unterschiedliche Zeitpunkte untersucht, der Beginn der logarithmischen Phase ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,15), die logarithmische Phase und die stationäre Phase. Nach 6h ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,15 = Anfang logarithmische Phase), 11h ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,7 = mittlere logarithmische Phase) und nach 20h ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 3,8 = stationäre Phase) wurde die Zellen aus dem Chemostaten geerntet.

3.1. Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H im Chemostaten

Wie bereits beschrieben erfolgte die Anzucht in einem Chemostaten. Der Kurvenverlauf von *G. oxydans* 621H in Vollmedium mit 50mM Mannitol ist Abb.III.24 dargestellt.

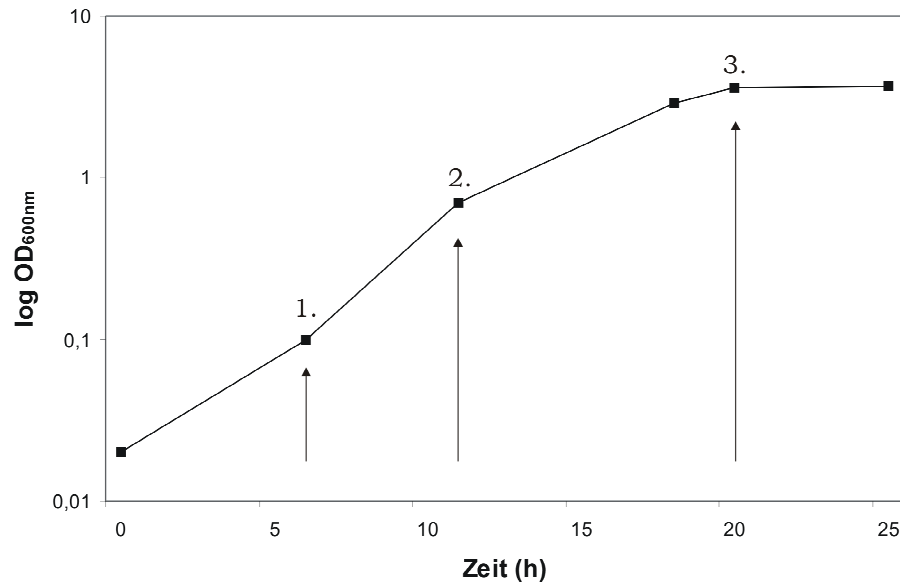


Abb.III.24: Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H im Chemostat (Batch-Kultur) für die Transkriptionsanalysen zu verschiedenen Wachstumsphasen; Anzucht erfolgte in Vollmedium mit 50mM Mannitol. Pfeile geben jeweils die Zeitpunkte der Ernte an. 1. Anfang der logarithmischen Phase nach 6h (OD_{600nm} 0,15); 2. mittlere logarithmische Phase nach 11h (OD_{600nm} 0,7); 3. stationäre Phase nach 20h (OD_{600nm} 3,8)

3.2 Transkriptionsanalysen mit Hilfe eines DNA-Microarrays vom Wachstumsverlauf von *G. oxydans* 621H

Als *common reference* für die Transkriptionsanalysen der drei unterschiedlichen Wachstumsphasen diente eine kontinuierliche Kultur des Stammes *G. oxydans* 621H. Diese Kultur wurde im Chemostat angezogen, dabei erfolgte das Wachstum bei einer Durchflussrate von 0,30 h⁻¹, die somit zwischen der maximalen und der halbmaximalen Wachstumsrate lag. Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurde mit sterilfiltrierter Pressluft auf 80 % des Luftsauerstoffgehaltes eingestellt, der pH-Wert betrug 6,0 und die Temperatur 30 °C. Die Ernte erfolgte nach dem Einstellen einer konstanten OD, wobei mindestens drei Volumenwechsel abgewartet wurden.

Die aus den Hybridisierungsexperimenten erhaltenen und gemittelten Expressionsverhältnisse der ORF's (*open reading frame*) sind in den

nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Werte um etwa 1,0 zeigten unter beiden untersuchten Bedingungen keine Regulation. Der Schwellenwert einer signifikanten deutlichen Transkriptionsänderung unter einer der Bedingungen wurde bei mindestens 2,5 bis 3 facher Regulation gelegt.

3.2.1 Transkriptionsanalyse zu Beginn der logarithmischen Phase

Tab.III.10: Transkriptionsanalyse einer Batch-Kultur von *G. oxydans* 621H zu Beginn der logarithmischen Phase; dargestellt sind die Gene die signifikant verändert sind, verglichen wurden die Werte mit einer kontinuierlichen Kultur von *G. oxydans* 621H, ein *ratio of medians* > 1 zeigt eine verstärkte Transkription bei der kontinuierlichen Kultur, ein *ratio of medians* < 1 die verstärkte Transkription zu Beginn der logarithmischen Phase

NCBI-Nr.	Bezeichnung	<i>Ratio of Medians</i>
GOX1483	capsule polysaccharide export protein	0,238
GOX1799	protein translocase subunit YajC	0,175
GOX0376	SSU ribosomal protein S19P	0,274
GOX0363	rpsE; 30S ribosomal protein S5	0,276
GOX0378	LSU ribosomal protein L23P	0,248
GOX0402	cell division inhibitor MinE	0,284
GOX1109	dolichol-phosphate mannosyltransferase	0,202
GOX0383	30S ribosomal protein S7	0,292
GOX0259	tryptophanyl-tRNA synthetase	0,238
GOX0370	LSU ribosomal protein L14P	0,271
GOX1288	biopolymer transport ExbD protein	0,237
GOX1780	rpsD; 30S ribosomal protein S4	0,226
GOX0380	rplC; 50S ribosomal protein L3	0,29
GOX0964	ribose-phosphate pyrophosphokinase	0,248
GOX0379	rplD; 50S ribosomal protein L4	0,269
GOX0867	SAM-dependent methyltransferase	0,147
GOX0192	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	0,284
GOX0371	SSU ribosomal protein S17P	0,251

NCBI-Nr.	Bezeichnung	<i>Ratio of Medians</i>
GOX0435	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	0,17
GOX1607	ipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase II	0,283
GOX0356	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0,269
GOX1179	putative sugar uptake ABC transporter permease protein	0,271
GOX0365	rplF; 50S ribosomal protein L6	0,198
GOX1141	LSU ribosomal protein L25P	0,263
GOX1966	hypothetical protein	0,29
GOX0784	multidrug resistance protein A	0,296
GOX0105	protein translation elongation factor G (EF-G)	0,225
GOX1686	hypothetical protein	0,242
GOX1112	ATP synthase C chain	0,13
GOX1819	hypothetical protein	0,293
GOX1993	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	0,24
GOX1867	putative processing protease protein	0,272
GOX0377	rplB; 50S ribosomal protein L2	0,249
GOX1113	F0F1 ATP synthase subunit A	0,266
GOX0599	hypothetical protein	0,286
GOX1008	hypothetical protein	3,84
GOX1988	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	3,004
GOX2295	hypothetical protein	8,795
GOX2676	putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	13,417
GOX1024	heat shock protein 90	6,602
GOX1748	bacterioferritin	9,12
GOX0726	hypothetical protein	18,189
GOX0974	transcriptional regulator AadR (cyclic AMP receptor protein)	5,342
GOX1329	small heat shock protein	9,702
GOX1675	NADH dehydrogenase type II	3,017
GOX0978	bifunctional riboflavin biosynthesis protein RibD	6,421
GOX0679	conserved protein of the SAM superfamily	4,437
GOX0313	NAD-dependent alcohol dehydrogenase	17,863
GOX2181	putative polyol dehydrogenase	5,62
GOX1615	putative oxidoreductase	3,253

NCBI-Nr.	Bezeichnung	<i>Ratio of Medians</i>
GOX1177	D-aminoacylase	4,676
GOX0278	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	8,187
GOX1079	hypothetical protein	6,07
GOX0762	thioredoxin	3,196
GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	4,107
GOX2407	putative RNA polymerase sigma-E factor (sigma-24) protein 2	3,155
GOX1991	chorismate synthase	3,06
GOX1703	transketolase	3,554
GOX2151	hypothetical protein	5,105
GOX1458	putative oxidoreductase	4,877
GOX0506	RNA polymerase factor sigma-32	6,519
GOX1253	D-lactate dehydrogenase	5,313
GOX2231	putative sugar transporter	12,966
GOX1499	hypothetical protein	4,468
GOX0023	Mce related protein	3,469
GOX0026	hypothetical membrane-spanning protein	5,141
GOX2684	NAD(P)H-dependent 2-cyclohexen-1-one reductase	10,235
GOX0234	lysine 2,3-aminomutase	4,027
GOX1067	alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit precursor	13,756
GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	22,603
GOX1432	NADP-D-sorbitol dehydrogenase	3,635
GOX2184	probable mannitol/sorbitol ABC transporter permease protein	8,275
GOX0973	outer membrane channel lipoprotein	4,004
GOX1068	alcohol dehydrogenase	8,394
GOX1050	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	4,463
GOX1300	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	3,169
GOX1952	hypothetical protein	4,012
GOX0576	hypothetical protein	4,662
GOX1087	acetolactate synthase	3,086
GOX0148	hypothetical protein	6,907
GOX0352	hypothetical protein	4,669
GOX2203	hypothetical protein	3,88

NCBI-Nr.	Bezeichnung	<i>Ratio of Medians</i>
GOX2203	hypothetical protein	4,494
GOX2085	hypothetical protein	4,635
GOX1660	hypothetical protein	3,366
GOX0985	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC	4,135
GOX1540	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	6,977
GOX1837	small heat shock protein HspA	3,685
GOX2493	peptide methionine sulfoxide reductase	4,041
GOX0946	putative oxidoreductase	3,183
GOX0975	hypothetical protein	4,012
GOX0478	putative oxidoreductase	3,051
GOX0404	hypothetical protein	5,292
GOX0515	hypothetical protein	3,716
GOX0875	AtaE protein	3,36
GOX1691	cell division protein	3,835
GOX0943	hypothetical protein	16,443
GOX2540	hypothetical protein	8,433
GOX1328	hypothetical protein	7,662
GOX0291	putative ferredoxin subunit of ring-hydroxylating dioxygenase	5,414
GOX0928	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	7,009
GOX0475	hypothetical protein	3,365
GOX0741	hypothetical protein	3,854
GOX0424	fliF; flagellar MS-ring protein	6,37
GOX1640	amidophosphoribosyltransferase	3,359

Am Anfang der Tabelle (Tab.III.10) sind die ORF's aufgelistet, die eine stärkere Transkription während des Beginns der logarithmischen Phase aufweisen, dabei war der *ratio of medians* kleiner gleich 1. Darunter waren viele Gene von ribosomalen Proteinen hochreguliert, wie z.B. Gox0376 (ribosomales Protein S19P) oder Gox0378 (ribosomales Protein L23P). Im Tabellenbereich, in dem der *ratio of medians* größer gleich 1 war, waren die ORF's aufgeführt, deren Transkription in der kontinuierlichen Kultur stärker waren. Darunter

waren einige Gene von Oxidoreduktasen, wie z.B. Gox2676 (vermutliche Alkohol/Aldehyd Dehydrogenase) mit einem *ratio of medians* von 13,4, Gox0313 (NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase) mit 17,9, Gox2181 (vermutliche Polyol-Dehydrogenase) mit 5,6, Gox1615 (vermutliche Oxidoreduktase) mit 3,3, Gox1458 (vermutliche Oxidoreduktase) mit 4,9, Gox1253 (D-Lactat-Dehydrogenase) mit 5,3 und Gox1432 (NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase) mit 3,6. Außerdem waren viele Gene von hypothetischen Proteine darunter. Hinzukommen noch zwei interessante Gene die im Zentrallstoffwechsel von Bedeutung sind, Gox1540 (Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase) mit einem *ratio of medians* von 7,0 und die Transketolase (Gox1703) mit einem Wert von 3,6. Des Weiteren waren die Gene der beiden Untereinheiten der NAD(P) Transhydrogenase hochreguliert und die NADH Dehydrogenase vom TypII mit einem *ratio of medians* von 3,0.

3.2.2 Transkriptionsanalyse der logarithmischen Phase

Tab.III.11: Transkriptionsanalyse einer Batch-Kultur von *G. oxydans* 621H in der mittleren logarithmischen Phase; dargestellt sind die Gene die signifikant verändert sind, verglichen wurden die Werte mit einer kontinuierlichen Kultur von *G. oxydans* 621H, ein *ratio of medians* > 1 zeigt eine verstärkte Transkription bei der kontinuierlichen Kultur, ein *ratio* < 1 die verstärkte Trankription in der logarithmischen Phase

NCBI-Nr.	Bezeichnung	Ratio of Medians
GOX1799	protein translocase subunit YajC	0,162
GOX0376	SSU ribosomal protein S19P	0,283
GOX0363	rpsE; 30S ribosomal protein S5	0,292
GOX0378	LSU ribosomal protein L23P	0,251
GOX0402	cell division inhibitor MinE	0,292
GOX1109	dolichol-phosphate mannosyltransferase	0,186
GOX0758	porin	0,299
GOX0383	30S ribosomal protein S7	0,295
GOX0370	LSU ribosomal protein L14P	0,278

NCBI-Nr.	Bezeichnung	Ratio of Medians
GOX1780	rpsD; 30S ribosomal protein S4	0,26
GOX2042	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	0,25
GOX0379	rplD; 50S ribosomal protein L4	0,235
GOX0867	SAM-dependent methyltransferase	0,127
GOX0371	SSU ribosomal protein S17P	0,266
GOX0357	30S ribosomal protein S11	0,299
GOX1314	ATP synthase epsilon chain	0,298
GOX1607	lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase II	0,223
GOX1151	hypothetical protein	0,293
GOX0356	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0,273
GOX1179	putative sugar uptake ABC transporter permease protein	0,247
GOX0365	rplF; 50S ribosomal protein L6	0,218
GOX1141	LSU ribosomal protein L25P	0,241
GOX1966	hypothetical protein	0,276
GOX0784	multidrug resistance protein A	0,299
GOX0105	protein translation elongation factor G (EF-G)	0,215
GOX1111	ATP synthase B' chain	0,29
GOX1686	hypothetical protein	0,187
GOX1112	ATP synthase C chain	0,16
GOX0242	hypothetical protein	0,293
GOX1819	hypothetical protein	0,299
GOX1993	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	0,265
GOX1857	uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 1	0,253
GOX1867	putative processing protease protein	0,251
GOX0348	HlyD family secretion protein	0,29
GOX0377	rplB; 50S ribosomal protein L2	0,239
GOX0599	hypothetical protein	0,21
GOX0889	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,401
GOX1008	hypothetical protein	3,409
GOX1988	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	3,007
GOX2295	hypothetical protein	10,101
GOX2676	putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	11,244

NCBI-Nr.	Bezeichnung	Ratio of Medians
GOX1898	hypothetical protein	3,19
GOX1024	heat shock protein 90	8
GOX1748	bacterioferritin	11,039
GOX0726	hypothetical protein	22,669
GOX0900	hypothetical protein	5,558
GOX0974	transcriptional regulator AadR (cyclic AMP receptor protein)	4,742
GOX0679	conserved protein of the SAM superfamily	3,389
GOX0313	NAD-dependent alcohol dehydrogenase	10,494
GOX2181	putative polyol dehydrogenase	4,036
GOX0347	hypothetical protein	5,731
GOX1615	putative oxidoreductase	3,393
GOX1177	D-glutamate deacylase	5,492
GOX0278	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	10,036
GOX1079	hypothetical protein	6,814
GOX0762	hioredoxin	3,541
GOX1766	non-heme chloroperoxidase	3,029
GOX1617	hypothetical protein	4,559
GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	3,872
GOX1991	chorismate synthase	3,56
GOX2151	hypothetical protein	4,26
GOX0506	RNA polymerase factor sigma-32	5,923
GOX2231	putative sugar transporter	5,656
GOX1499	hypothetical protein	3,537
GOX0026	pothetical membrane-spanning protein	4,008
GOX2684	NAD(P)H-dependent 2-cyclohexen-1-one reductase	13,771
GOX1712	aldehyde dehydrogenase	8,756
GOX1067	alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit precursor	6,002
GOX1538	short chain dehydrogenase	3,055
GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	12,53
GOX1351	putative isomerase	6,311
GOX1432	NADP-D-sorbitol dehydrogenase	3,709
GOX2184	probable mannitol/sorbitol ABC transporter permease protein	5,556

NCBI-Nr.	Bezeichnung	Ratio of Medians
GOX0973	outer membrane channel lipoprotein	3,757
GOX1068	alcohol dehydrogenase large subunit	5,065
GOX1050	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	4,152
GOX1300	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	3,025
GOX1952	hypothetical protein	5,932
GOX0576	hypothetical protein	3,669
GOX1600	two component response regulator	3,721
GOX0148	hypothetical protein	5,256
GOX1625	chloride channel protein	3,379
GOX0352	hypothetical protein	3,601
GOX2203	hypothetical protein	4,061
GOX1358	hypothetical protein	8,007
GOX1660	hypothetical protein	3,457
GOX2183	probable mannitol/sorbitol ABC transporter ATP-binding protein	8,156
GOX0985	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC	3,864
GOX1462	putative oxidoreductase	15,417
GOX1540	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	4,102
GOX1837	small heat shock protein HspA	5,246
GOX1633	hypothetical protein	48,731
GOX2493	peptide methionine sulfoxide reductase	4,963
GOX0946	putative oxidoreductase	3,172
GOX0975	hypothetical protein	3,597
GOX1632	hypothetical protein	18,669
GOX1356	oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	10,999
GOX0404	hypothetical protein	4,375
GOX0875	AtsE protein	3,405
GOX1691	cell division protein FtsH	3,639
GOX0943	hypothetical protein	15,84
GOX2540	hypothetical protein	8,312
GOX1328	hypothetical protein	6,358
GOX0291	putative ferredoxin subunit of ring-hydroxylating dioxygenase	5,253
GOX1357	putative electron transport protein	11,436

NCBI-Nr.	Bezeichnung	Ratio of Medians
GOX0928	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	5,537
GOX0475	hypothetical protein	3,415
GOX0741	hypothetical protein	3,83

Die Tabelle mit den Expressionsverhältnissen aus den Transkriptionsanalysen der logarithmischen Phase spiegelt ein ähnliches Bild zu der Tabelle zu Beginn der logarithmischen Phase wider (Tab.III.10). Im ersten Teil der Tabelle sind die ORF's aufgelistet, die eine stärkere Transkription während der logarithmischen Phase aufweisen, dabei war der *ratio of medians* kleiner gleich 1. Darunter waren viele Gene von ribosomalen Proteinen hochreguliert, wie z.B. Gox0363 (ribosomales Protein S5) oder Gox0378 (ribosomales Protein L23P). Im Tabellenbereich, wo der *ratio of medians* größer gleich 1 war, waren die ORF's dargestellt, deren Transkription in der kontinuierlichen Kultur stärker waren. Darunter waren einige Gene von Oxidoreduktasen, wie z.B. Gox2676 (vermutliche Alkohol/Aldehyd Dehydrogenase) mit einem *ratio of medians* von 11,2, Gox0313 (NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase) mit 10,5, Gox2181 (vermutliche Polyol-Dehydrogenase) mit 4,0, Gox1712 (Aldehyd-Dehydrogenase) mit 8,8, Gox1432 (NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase) mit 3,7 und Gox1462 (vermutliche Oxidoreduktase) mit 15,4. Außerdem war das Gen Gox1540 (Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase) mit einem *ratio of medians* von 4,1 hochreguliert. Des Weiteren waren die Gene der beiden Untereinheiten der NAD(P) Transhydrogenase sowie viele Gene von hypothetischen Proteinen gegenüber der kontinuierlichen Kultur verstärkt transkribiert.

3.2.3 Transkriptionsanalyse der stationären Phase

Tab.III.12: Transkriptionsanalyse einer Batch-Kultur von *G. oxydans* 621H in der stationären Phase; dargestellt sind die Gene die signifikant verändert sind, verglichen wurden die Werte mit einer kontinuierlichen Kultur von *G. oxydans* 621H, ein *ratio of medians* > 1 zeigt eine verstärkte Transkription bei der kontinuierlichen Kultur, ein *ratio* < 1 die verstärkte Transkription in der stationären Phase

NCBI-Nr.	Bezeichnung	Ratio of Medians
GOX1660	hypothetical protein	0,101
GOX2219	ribose ABC transporter, periplasmic binding protein	0,299
GOX1857	uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 1	0,118
GOX0182	hypothetical protein	3,165
GOX1748	bacterioferritin	5,921
GOX2015	NAD(P)-dependent glucose 1-dehydrogenase	3,98
GOX0973	outer membrane channel lipoprotein	3,232
GOX1002	bacterial protein translation initiation factor 1 (IF-1)	4,681
GOX0352	hypothetical protein	3,495
GOX0985	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC	4,546
GOX1462	putative oxidoreductase	3,678
GOX0943	hypothetical protein	3,016

In der letzten Transkriptionsanalyse wurde die stationäre Phase mit der kontinuierlichen Kultur von *G. oxydans* 621H verglichen. Während der stationären Phase ist das Gen einer PQQ-abhängige Dehydrogenase mit einem *ratio of medians* von 0,12 stärker transkribiert. In der kontinuierlichen Kultur zeigte sich eine erhöhte Expression der Gene einer NAD(P)-abhängigen Glucose-1-Dehydrogenase mit 4,0 sowie einer vermutlichen Oxidoreduktase mit 3,7.

Alle gemachten Transkriptionsanalysen basieren auf Microarrays mit PCR-Produkten, die sehr empfindlich sind. Durch eine längere Lagerung der Microarray-Chips kam es zu einem starken Hintergrund, wodurch nur Teile des Genoms miteinander verglichen werden konnte.

4. Annotation von *G. oxydans* DSM3504 mit anschließendem Genomvergleich zu *G. oxydans* 621H

Als erstes wurde das Genom von *G. oxydans* DSM3504 im Göttinger Genomics Laboratory (G2L, Sonja Volland) sequenziert. Anschließend wurde in dieser Arbeit das Genom von *G. oxydans* DSM3504 annotiert und mit dem Genom von *G. oxydans* 621H verglichen. Da sich beide Stämme in ihrem Wachstumsverhalten (Abb.III.25) unterscheiden, ist es ein interessanter Ansatzpunkt zu erfahren, warum das so ist. Der Genomvergleich der beiden Stämme sollte nähere Informationen liefern.

Bei der Annotation von *G. oxydans* DSM3504 wurde versucht jedem aus einem Gen resultierenden Protein einen Namen zugeben bzw. möglichst vielen Genen eine Funktion zuzuordnen. Anschließend wurde das Genom mit dem von *G. oxydans* 621H verglichen.

4.1 Wachstumskurve von *G. oxydans* DSM3504 und *G. oxydans* 621H

Bei Untersuchungen auf unterschiedlichen C-Quellen (Sorbitol, Mannitol, Glukose) zeigte *G. oxydans* DSM3504 im Gegensatz zu *G. oxydans* 621H eine höhere Wachstumsrate und bildete mehr Biomasse (Bremus, 2006). Jedoch setzte *G. oxydans* 621H im Vergleich zum *G. oxydans* DSM3504 die Substrate schneller um, was sich in einer höheren spezifischen Substratbildungsrate und höheren spezifischen Produktausbeute von Sorbose, Fruktose sowie Glukonat, 5-Ketoglukonat und 2-Ketoglukonat widerspiegelte (Bremus, 2006).

In der Abb.III.25 ist eine Wachstumskurve der beiden Stämme auf Vollmedium mit Mannitol als Kohlenhydrat-Quelle dargestellt, welche den unterschiedlichen Wachstumverlauf widerspiegelt. Dabei erreicht *G. oxydans* DSM3504 im Vergleich zu *G. oxydans* 621H eine wesentlich höhere EndOD.

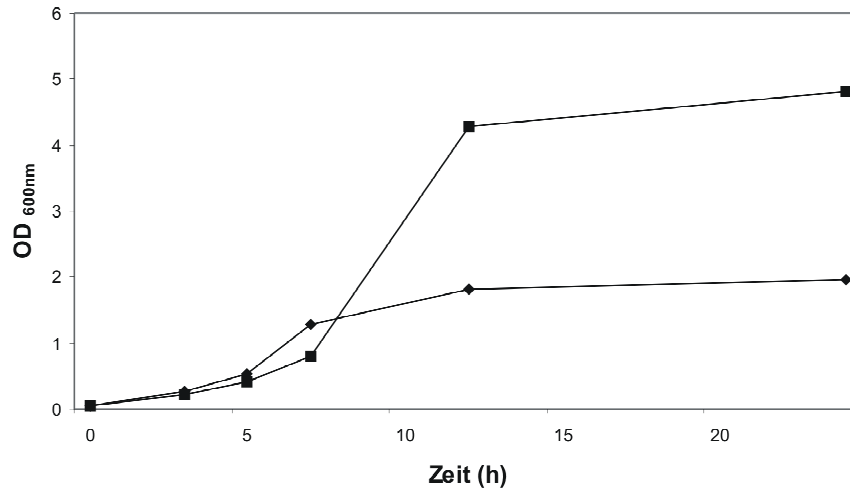


Abb.III.25: Vergleich des Wachstums der Stämme *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 in Vollmedium mit 50mM Mannitol; *G. oxydans* 621H (◆); *G. oxydans* DSM3504 (■)

4.2 Vergleich der Organisation der Genome von *G. oxydans* DSM3504 und *G. oxydans* 621H

Der GC Gehalt der beiden Stämme *G. oxydans* 621H sowie *G. oxydans* DSM3504 ist mit 60,82% sowie 61,03% sehr ähnlich.

In *G. oxydans* 621H wurden fünf Plasmide identifiziert (Prust *et al.*, 2005), wohingegen keine Plasmide in *G. oxydans* DSM3504 vorhanden sind. Dadurch besitzt *G. oxydans* DSM3504 im Gegensatz zu *G. oxydans* 621H auch weniger ORF's mit 2465 anstatt 2668.

4.3 Zentralstoffwechsel

In dieser Arbeit wurde der Zentralstoffwechsel von *G. oxydans* DSM3504 mit dem von *G. oxydans* 621H verglichen. Dabei wurden die Gene der Glykolyse, des Pentose-Phosphat-Weges, Entner-Doudoroff Weges sowie die des Zitronensäurezyklus gegenübergestellt und ihre prozentualen Unterschiede bezogen auf die Aminosäuren festgestellt.

4.3.1 Glykolyse

Frühere Experimente wiesen bereits in *G. oxydans* auf eine unvollständige Glykolyse hin (Stouthamer, 1959; Leisinger, 1965). Durch die Sequenzierung des Genoms von *G. oxydans* 621H konnte das Fehlen des Schlüsselenzyms, der Phosphofruktokinase, festgestellt werden (Prust *et al.*, 2005). Die Auswertung der Sequenzierung von *G. oxydans* DSM3504 deutete ebenfalls auf das Fehlen dieses Enzyms hin. Es konnte keine Phosphofruktokinase nachgewiesen werden, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die Umwandlung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat, katalysiert. In der Tab.III.13 sind die ORF's von *G. oxydans* 621H sowie *G. oxydans* DSM3504 gegenübergestellt und deren prozentuale Übereinstimmung auf Aminosäurebasis dargestellt. Die prozentuale Übereinstimmung setzt sich aus dem Grundwert, die Anzahl der Aminosäuren des Proteins von *G. oxydans* 621H, und dem Prozentwert, die abweichenden Aminosäuren des Proteins von *G. oxydans* DSM3504 zusammen.

Tab.III.13: Vergleich der offenen Leserahmen (ORF's) und ihrer Größe im Genom von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 die man der Glykolyse zuordnen kann

Enzym	Bezeichnung ERGO-Nr.	Anzahl der Aminosäuren (AS)	unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Hexokinase	RGLU2424	322	0	100
	RGOX1170	322		
Glucose-6- Phosphat- Isomerase	RGLU1746	957	3	99,69
	RGOX0315	957		
Aldolase	RGLU1597	299	3	99,00
	RGOX0136	299		
	RGLU0832	358	1	99,72
	RGOX2146	358		
Triosephosphat- Isomerase	RGLU2277	275	9	96,73
	RGLU0548	262	74	68,36
	RGOX0900	275		

Enzym	Bezeichnung ERGO-Nr.	Anzahl der Aminosäuren (AS)	unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Glycerin-3- Phosphat- Dehydrogenase	RGLU2337	266	1	99,62
	RGOX1013	266		
	RGLU1917	324	7	97,84
	RGOX0520	324		
Glycerinaldehyd- 3-Phosphat- Dehydrogenase	RGLU2275	569	9	98,42
	RGOX0898	569		
	RGLU0580	352	1	99,72
	RGOX1847	352		
Phosphoglycerat- Kinase	RGLU0579	404	2	99,50
	RGOX1846	404		
Mutase	RGLU0329	510	6	98,82
	RGOX1622	510		
Enolase	RGLU2333	426	0	100
	RGOX1007	426		

Beim Vergleich der beiden Stämme, *G. oxydans* DSM3504 und *G. oxydans* 621H, wurde eine unterschiedliche Anzahl an Triose-P-Isomerasen festgestellt. Es konnten drei Triose-P-Isomerasen in *G. oxydans* DSM3504 identifiziert werden, wohingegen *G. oxydans* 621H über lediglich zwei dieser Isomerasen verfügt. Die Triose-P-Isomerase katalysiert die reversible Reaktion zwischen Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat und spielt somit eine wichtige Rolle in der Glykolyse.

In der Tab.III.13 sind die unterschiedlichen Triose-P-Isomerasen dargestellt. Dabei ähneln sich die ersten beiden Triose-P-Isomerasen von *G. oxydans* 621H (RGOX0900, RGOX1013) sowie von *G. oxydans* DSM3504 (RGLU2277, RGLU2337) mit einmal 96,7 % und 99,6 % sehr stark. Wohingegen die dritte Isomerase von *G. oxydans* DSM3504 verglichen mit der Triose-P-Isomerase von *G. oxydans* 621H mit der Nummer RGOX0900 nur eine Ähnlichkeit von 68,4 % aufweist und somit deutlich geringer ist. Der Vergleich der restlichen

Enzymen der Glykolyse spiegelt eine sehr hohe Ähnlichkeit der entsprechenden Isoenzymen mit mind. 97 % wider (Tab.III.13).

4.3.2 Pentose-Phosphat-Weg

Durch die Sequenzierung des Genoms von *G. oxydans* 621H konnten alle Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges identifiziert werden (Prust *et al.*, 2005). Die entsprechenden Gene konnten auch in *G. oxydans* DSM3504 gefunden werden (Abb.III.26). In Tab.III.14 sind alle ORF's von beiden Stämmen dargestellt. Dabei zeigte sich bei dem Vergleich der ORF's eine hohe Übereinstimmung mit über 97% der Aminosäuresequenz der Enzyme des PPW (Tab.III.14).

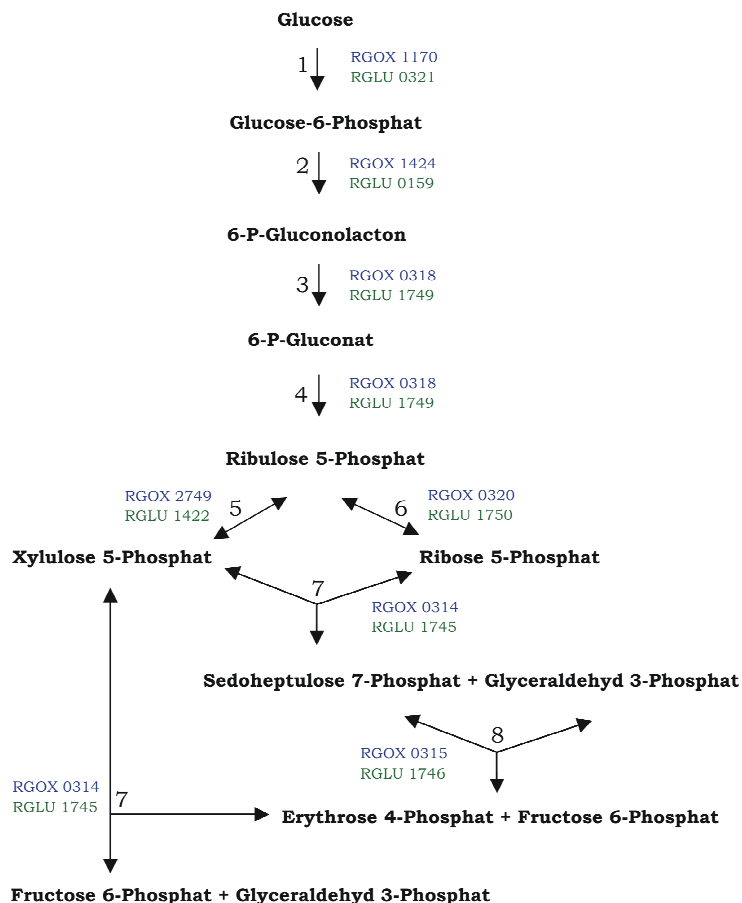


Abb.III.26: Schematische Darstellung des Pentosephosphat-Wegs: 1. Glucokinase 2. Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase 3. Gluconolactonase 4. 6-Phosphogluconat Dehydrogenase 5. Ribulosephosphat-Epimerase 6. Ribosephosphat-Isomerase 7. Transketolase 8. Transaldolase

Tab.III.14: Vergleich der ORF's und ihre Größe im Genom von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 die man dem PPW zuordnen kann

Enzym	Bezeichnung	Anzahl der Aminosäuren (AS)	unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Gluconokinase	RGLU 1751	178	4	97,75
	RGOX 0321			
Glucose-6-P-Dehydrogenase	RGLU 1424	489	3	99,39
	RGOX 0159			
Gluconolactonase	RGLU 1749	246	4	98,37
	RGOX 0318			
6-Phosphogluconat Dehydrogenase	RGLU 1747	332	1	99,70
	RGOX 0316			
Ribulosephosphat-Epimerase	RGLU 1750	225	1	99,56
	RGOX 0320			
Ribosephosphat-Isomerase	RGLU 1422	231	1	99,57
	RGOX 2749			
Transketolase	RGLU 1745	685	2	99,71
	RGOX 0314			
Transaldolase	RGLU 1746	957	0	100
	RGOX 0315			

Sowohl in *G. oxydans* 621H als auch in *G. oxydans* DSM3504 befanden sich die Mehrzahl der Gene des PPW in einem Cluster (Prust, 2004) (Abb.III.27). Die Gene des Clusters der beiden Stämme sind in Tab.III.15 aufgelistet.

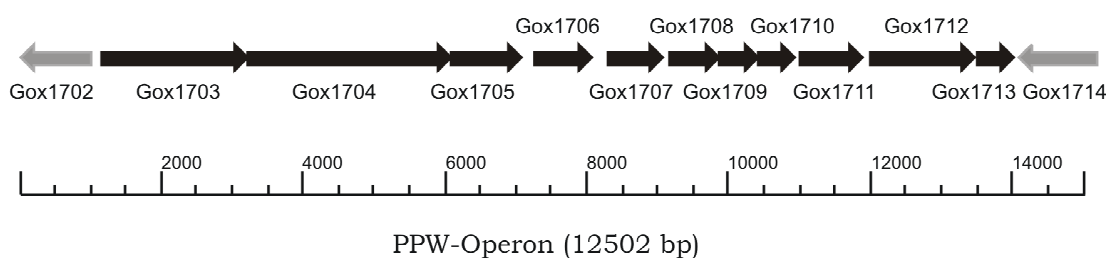


Abb.III.26: genetische Orientierung des vermutlichen Operons des Pentosephosphat-Weges; Angegeben sind von *G. oxydans* 621H die RGOX-Nr. sowie für *G. oxydans* DSM3504 die RGLU-Nr.

Es wurde in der Tab.III.15 die Enzyme des vermutlichen Operons des PPW von *G. oxydans* 621H mit den Isoenzymen aus *G. oxydans* DSM3504 verglichen. Dabei zeigte sich bei fast allen Enzymen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit über 97 %. Die beiden Ausnahmen bildeten die zwei ORF's RGLU1753 (transkriptioneller Regulator, LysR Familie) und RGLU1752 (cytoplasmatisches Protein). Der Vergleich zu ihren Isoenzymen zeigte nur eine Übereinstimmung von 92,8% für den transkriptioneller Regulator und 94,9% für das cytoplasmatische Protein.

Tab.III.15: Vergleich der ORF's und ihre Größe im Genom von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 die man dem vermutlichen Operon des PPW zuordnen kann

Enzym	Bezeichnung	Anzahl der Aminosäuren (AS)	unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Transketolase	RGLU 1745	685	2	99,71
	RGOX 0314			
Transaldolase	RGLU 1746	957	0	100
	RGOX 0315			
6-Phosphogluconat Dehydrogenase	RGLU 1747	332	1	99,70
	RGOX 0316			
putative hydrolyse of the HAD superfamily	RGLU 1748	266	2	99,25
	RGOX0317			
6-Phosphogluconolactonase	RGLU 1749	246	4	98,37
	RGOX 0318			
Ribosephosphat-Isomerase	RGLU 1750	231	1	99,57
	RGOX 2749			
Gluconokinase	RGLU 1751	178	4	97,75
	RGOX 0321			
putative cytoplasmic protein	RGLU 1752	175	9	94,86
	RGOX 0323			
transkriptioneller Regulator, LysR Familie	RGLU 1753	290	21	92,76
	RGOX 0324			

Enzym	Bezeichnung	Anzahl der Aminosäuren (AS)	unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Aldehyd-Dehydrogenase	RGLU 1754	480	3	99,38
	RGOX0325			
Protease I	RGLU 1755	175	2	99,86
	RGOX 0326			

4.3.3 Entner-Doudoroff-Weg

Im Genom von *G. oxydans* 621H konnten durch Prust *et. al.* alle Gene für den ED-Weg identifiziert werden. Gleichermäßen sind orthologe Gene auch in *G. oxydans* DSM3504 vorhanden (Abb.III.28).

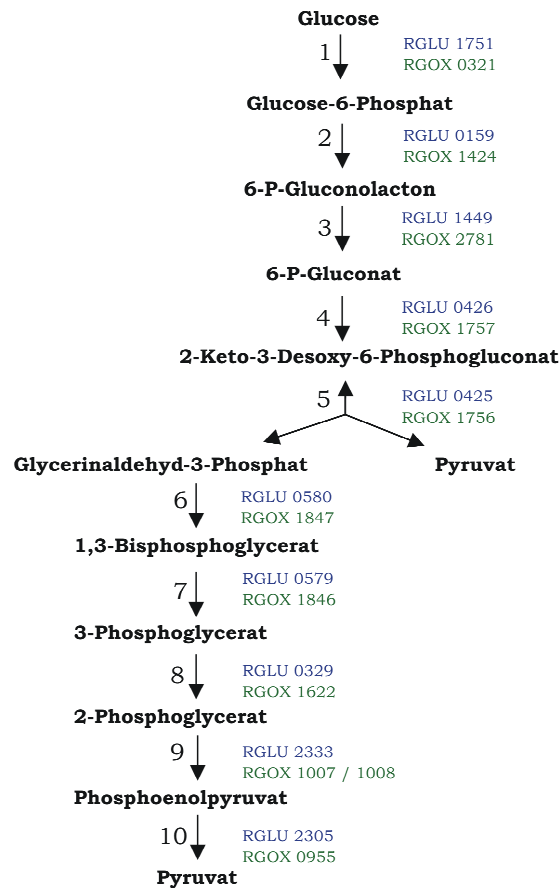


Abb.III.28: Schematische Abbildung des Entner-Doudoroff-Wegs; Angegeben sind die RGOX-Nr. von *G. oxydans* 621H sowie die RGLU-Nr. von *G. oxydans* DSM3504
 1. Hexokinase 2. Glucose-6-P-Dehydrogenase 3. Gluconolactonase 4. 6-Phosphogluconat-Dehydratase 5. KDPG-Aldolase 6. Glycerinaldehyd-Dehydrogenase 7. Phosphoglycerat-Kinase 8. Phosphoglycerat-Mutase 9. Enolase 10. Pyruvat-Kinase

In der Tab.III.16 sind die ORF's von *G. oxydans* 621H sowie *G. oxydans* DSM3504 und deren prozentuale Unterschiede auf Aminosäurebasis dargestellt.

Tab.III.16: Vergleich der ORF's und ihrer Größe im Genom von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 die man dem ED-Weg zuordnen kann

Enzym	Bezeichnung	Anzahl der Aminosäuren (AS)	der unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Gluconokinase	RGLU 1751	178	4	97,75
	RGOX 0321			
Glucose-6-P-Dehydrogenase	RGLU 1424	489	3	99,39
	RGOX 0159			
Gluconolactonase	RGLU 1449	406	6	98,52
	RGOX 2781			
6-Phosphogluconat-Dehydratase	RGLU 0426	615	9	98,54
	RGOX 1757			
KDPG-Aldolase	RGLU 0425	207	2	99,03
	RGOX 1756			
Glyceraldehyd-Dehydrogenase	RGLU 0580	352	1	99,72
	RGOX 1847			
Phosphoglycerat-Kinase	RGLU 0579	404	2	99,50
	RGOX 1846			
Phosphoglycerat-Mutase	RGLU 0329	510	6	98,82
	RGOX 1622			
Enolase	RGLU 2333	426	0	100
	RGOX 1007			
Pyruvat-Kinase	RGLU 2305	476	2	99,58
	RGOX 0955			

Der Vergleich der Entner-Doudoroff ORF's zwischen den beiden Stämmen, *G. oxydans* DSM3504 und *G. oxydans* 621H, zeigt eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit über 97%.

4.3.4 Zitronensäurezyklus

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, belegen Beobachtungen einen unvollständigen Zitronensäurezyklus. Unter anderem wurde anhand der Genomsequenz von *G. oxydans* 621H kein Gen, welches für die Succinat-Dehydrogenase kodiert, nachgewiesen (Prust *et al.*, 2005). Ebenso konnte das für den Stamm *G. oxydans* DSM3504 bestätigt werden. In der Tab.III.17 sind die Enzyme und die ORF's des Zitronensäurezyklus von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 aufgelistet. Zusätzlich wurde der prozentuale Unterschied der Aminosäuresequenz berechnet, bei der sich eine sehr hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von über 98% zeigte.

Tab.III.17: Vergleich der ORF's und ihre Größe im Genom von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 die man dem Zitronensäurezyklus zuordnen kann

Enzym	Bezeichnung	Anzahl der Aminosäuren (AS)	unterschiedl. AS	Übereinstimmung der AS in %
Zitrat-Synthase	RGLU2029	431	2	99,54
	RGOX0650	431		
Aconitase	RGLU1407	897	15	98,33
	RGOX2730	897		
Isozitrat-Dehydrogenase	RGLU1408	340	4	98,82
	RGOX2731	340		
2-Ketoglutarat-Dehydrogenase	RGLU0931	885	15	98,31
	RGOX2260	885		
	RGLU1102	369	6	98,37
	RGOX2460	369		
Malat-Dehydrogenase	RGLU2097	500	8	98,40
	RGOX3459	500		
Fumarase	RGLU1689	467	4	99,14
	RGOX 0242	467		
Putative Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	RGLU0097	945	3	99,68
	RGOX3479	945		

4.4 Unterschiede zwischen *G. oxydans* DSM3504 und *G. oxydans* 621H

Für einen weiteren Vergleich der Genome *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM3504 wurden die Gene, die nicht in *G. oxydans* 621H vorkommen, aber in *G. oxydans* DSM3504 ermittelt. Dazu wurde zuerst jeder einzelne ORF in *G. oxydans* DSM3504 mit den ORF's von *G. oxydans* 621H in ERGO miteinander verglichen. Anschließend wurde zur Verifizierung der Daten aus dem ERGO-Vergleich ein BiBlast mit Hilfe des G2L (Göttinger Genomics Laboratory) unter Mitarbeit von Sonja Volland durchgeführt (siehe Anhang Tab.VII.2). Einige unterschiedliche ORF's sind in der folgenden Tab.III.18 enthalten.

Tab.III.18: Aufgelistet sind die ORF's, die in *G. oxydans* DSM3504 vorkommen, aber nicht in *G. oxydans* 621H

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU00139	DNA-cytosine methyltransferase (2.1.1.37)
RGLU00477	adhB: Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit
RGLU00478	Gluconate 2-dehydrogenase alpha chain (1.1.99.3)
RGLU00479	Gluconate 2-dehydrogenase gamma chain (1.1.99.3)
RGLU00483	Sorbitol dehydrogenase small subunit (1.1.99.21)
RGLU00484	glucose-methanol-choline oxidoreductase
RGLU00485	Gluconate 2-dehydrogenase (acceptor) (1.1.99.3)
RGLU00493	beta-lactamase
RGLU00495	D-amino-acid dehydrogenase (1.4.99.1)
RGLU00496	penicillin amidase
RGLU00497	beta-lactamase
RGLU00498	dipeptidyl aminopeptidas (3.4.14.11)
RGLU00500	dac: D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (3.4.16.4)
RGLU00524	glycosyltransferase
RGLU00537	Acyl-CoA dehydrogenase
RGLU00539	celB: Phosphoglucomutase (5.4.2.2)
RGLU00540	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] (1.2.1.16)

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU00541	NADH dehydrogenas (1.6.99.3)
RGLU00548	Triosephosphate isomerase (5.3.1.1)
RGLU01182	nitrilase
RGLU01346	nagB: Glucosamine-6-phosphate deaminase (3.5.99.6)
RGLU01360	Gluconate 2-dehydrogenase cytochrome c subunit
RGLU01362	Leucyl aminopeptidase (aminopeptidase T)
RGLU02184	L-sorbose 1-dehydrogenase (1.1.99.32)
RGLU02195	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I (1.2.1.12)
RGLU02256	sldB: Glycerol dehydrogenase small subunit (1.1.99.22)
RGLU02257	glucose dehydrogenase

Insgesamt wurden 345 offene Leserahmen identifiziert, die in *G. oxydans* DSM3504 vorhanden sind, jedoch nicht in *G. oxydans* 621H vorkommen (siehe Anhang Tab.VII.2). Interessanterweise besitzt *G. oxydans* DSM3504 einen zusätzlichen ORF, welcher für eine NADH-Dehydrogenase vom TypII (RGLU0541) kodiert. Des Weiteren besitzt er einige zusätzliche Dehydrogenasen wie z.B. eine L-Sorbose 1-Dehydrogenase (RGLU2184) sowie eine Glucose Dehydrogenase (RGLU2257). Unter den identifizierten ORF's sind eine Vielzahl, die für hypothetische Proteine kodieren (siehe Anhang Tab.VII.2).

5. Einfluß einzelner Gene auf das Wachstumsverhalten von *G. oxydans* DSM3504

Eine interessante Fragestellung ist, warum *G. oxydans* DSM3504 eine höhere optische Dichte als *G. oxydans* 621H erreicht? Dazu wurden die Genome miteinander verglichen. Durch die Genomanalyse wurden Gene ermittelt, die nur in *G. oxydans* DSM3504 vorkommen. Von diesen Genen wurden vier Gene zur weiteren experimentellen Untersuchung ausgewählt. Dabei sollte festgestellt werden, ob diese Gene Einfluß auf das unterschiedliche Wachstumsverhalten haben.

Unter den ausgewählten Genen befanden sich die Gene einer Nitrilase, Gluconat 2-Dehydrogenase, NADH-Dehydrogenase TypII und eine Triosephosphat-Isomerase. Die Tab.III.19 gibt die jeweiligen Gene und ihre ERGO-Nummern an.

Alle vier Gene wurden jeweils in den Expressionsvektors pBBR1-MCS2 kloniert, mit Hilfe von Kolonie-PCR und Sequenzierung überprüft und anschließend in *G. oxydans* 621H konjugiert. Ziel dieses Experimentes ist die genaue Untersuchung des Wachstumsverhalten aller konstruierter *G. oxydans* 621H Stämme.

Tab.III.19: Zusammenstellung der Gene, Primer und die jeweils daraus resultierenden Plasmide für die Konstruktion der Expressionsplasmide in *G. oxydans* 621H

	ERGO-Nr.	Genbezeichnung	Primer	(kb) Plasmid
A.	RGLU00478	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Untereinheit	RGLU479 <i>Xba</i> rev	2,86 pAJ75
	RGLU00479	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Untereinheit	RGLU478 <i>Hind</i> III fwd	
B.	RGLU01182	Nitrilase	RGLU1182 <i>Xba</i> fwd RGLU1182 <i>Hind</i> III rev	1,3 pAJ76
C.	RGLU00541	NADH Dehydrogenase	RGLU541 <i>Xba</i> fwd RGLU541 <i>Hind</i> III rev	1,5 pAJ78
D.	RGLU00548	Triosephosphat Isomerase	RGLU548 <i>Xba</i> rev RGLU548 <i>Hind</i> III fwd	1,0 pAJ79

5.1 Konstruktion sowie Wachstumsversuche der Expressionsplasmide mit den Genen aus *G. oxydans* DSM3504

Die Expressionsplasmide wurden mit den Genen aus *G. oxydans* DSM3504 konstruiert, welche für eine Nitrilase, Gluconat 2-Dehydrogenase, NADH-Dehydrogenase TypII und eine Triosephosphat-Isomerase kodieren.

Die Tab.III.19 gibt die Gene, die amplifiziert wurden sowie deren jeweiligen Primerpaare und deren entstehenden Größen in kb, an.

Dabei wurde die jeweilige, zugehörige Promotorregion mit amplifiziert. Die Sequenzen der betreffenden Gene sind in den nächsten Abbildungen (Abb.III.29-32) aufgeführt.

```

1  cataacctga agggccgagc ttcaaatctt gcccccgcga ccatgatctc ctgcaccagg tgccctgaac ccccacgaaa ccaacaggtt cgtgggggtt ttccgatttg aaggccgggg
   gatttgact tccggctctc aagtttaga cggggggctt ggtatctagg gacgtgtgct ccggactttg ggggtgcttt ggttgtccaa gcacccccac aagcgttaac tccgcggccc
   RGLU1182XbaIrwfwd -35
121 ggagggagagc agatttgctt catcgctttg ggtcttaacg cttcggsaag gaaattaca ctacgtatgc tccggttctt gtaatgagca agttactcgt caggactgag ccgcgctgaa
   cctctctctg tctaacagaa gttagcgaac cctagattgc gaagcctctc cttttaatgt gatgcatac agcgcgaagg cattactcgt tcaatgagca gtcctgactc ggcgcgactt
   -10
241 tattcggagc aatcatctat gaccaagctg cgtgttgcg tttatcagc cgaactagc ctgttccata ccctccaac tcttctcgc atgaaagcgc actccgagcc tctctctgag
   ataagccctc ttagtacata ctggtctgac gcacaacgc aataagtcgc ccctctatgc gacaagctat gcggagcttg agaaactgag taactctcgc tgacgtctcc agcagcagc
   >>.....RGLU01182 Nitrilase.....>>
   m t k l r v a v i q a g s s l f d t p a t l d r m e a h c e a a a a
361 caggggattg atttagcagt ttcccccggg ccttatattg gcggatattc taaaggactg accctttgtg cgtttttggg aagccgtttt cctgaaggac gggatgatta tctgcggtac
   gtcccatac taatctgca aaagggcctc cgtatatac gccttatagg attctctgac tgaaaaccac gcaaaaacc tccggcaaaa ggactctctg cctactaat agacgccatg
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   q g i d l a v f p e a y i g g y p k g l t f g a v l g s r f p e g r d d y l r y
481 tggaaatcag ccaatttggt tccgggctt gaacagagc ggtcggctc ttttgcacc aaatgacac cacacttggg cgttgggggt atcgagcggg atgtgtcaac cctctactgt
   accctcagtc ggtaacacca agcccgggaa ctttgtctcg cctagcccag aaaaacgggtc ttttactgct ggtggaacca gcaacccccac tagctcgccc taccacgttg ggatgagaca
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   w k s a i v v p g l e t e r i g s f a q k m t a h l v v g v i e r d g a t l y c
601 acagcaactt tttttggccc tgacggagcg cttttgggca agcatcgcaa gtaaatgccc scgggtaccg agcgttttag cttggggcac ggaatgggtt ccaccattcc ggttttctgt
   tctgtgaga aaaaaccogg actgcctcgc gaaaaccogt tctgtagcgt caattaccgc tgcccattgc tgcacaatca gaccctctgc cctctaccac ggtggttaag ccaaaagtca
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   t a l f f g p d g a l l g k h r k l m p t g t e r l v w g q g d g s t i p v f s
721 accgagtgag gacgcctggg tgctgcgatt tgctgggaaa actatattgc ggaactccgt cagagctatg accgcggggg gatcaacctt tggctgcgac ctacgttggc cgagcgtgca
   tggctctaac ctgcggaccc acgagcctaa acgacccttt tgatatacgg ccttagagga gctctgtaca tgccgcctcc ctagtggaaa accacggcgg gatgcctact cctgtactca
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   t e i g r i g a a i c w e n y m p d i r q s m y a r g i n i w c a p t v d e r d
841 atctggagcg cctctactgc tcatattgct tatgaagtc ggaacttctg tctgagtccc tgctcagttc tgacgctgac agacgccccg gaaactagc cgtgtctaca agaaataac
   tagaccctcc gaagtgacc agtataacga atactctcag cctgaagaca agactcaagc actgcgcaag cctgcggggc cttttagtgc gacagctagt tctctattg
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   i w q a s m r h i a y e g r t f v l s a c q f m t r a d a p e n y a c h q g n n
961 cccgaaacgg tcttattcgc gggagcgagc attattgtca gccattggg agagatcac gcgggaccgg tttatgacc ggaagcaatt ctgacagccg atatcgatct ggaagcatt
   ggccttgccc aagaatagc ccctccgctc taataacagt cgggtaaccc tctctagtgc gcctccggcc aaactactgc cctctgttaa gactgcgccc tatagctaga cctctgtgaa
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   p e t v l i r q g s i i v s p l q e i i a q p v y d r e a i l t a d i d l e d i
1081 atccgggcaa aatatgactt ggatgttgcg ggtcattatg cccgcccoga tattttccgt ctgcgctgta acgagcttcc acaaaatcca gttcttttt cagaacagc tcaggctgctc
   tagcccgctt ttactatgaa cctacaacgt ccagtaaacg ggcgcgctc ataaagtca gcgcgcaat tgctgcaagg tgtttttagt caaagaaaaa gctcttccg agtccgacag
   >.....RGLU01182 Nitrilase.....>
   i r a k y d l d v a g h y a r p d i f s l r v n d v p q n p v s f s e q a q a v
1201 tccgaaagtg accaaagcga atag
   agtccctcac tggttctgct tctc
   RGLU1182HindIIIrev
   >...RGLU01182 Nitrilase...>
   s g s d q s e -

```

Abb.III.29: DNA-Sequenz der Nitrilase aus *G. oxydans* DSM3504

```

1  tccagcatcc accctggcag agaccagcgt cctgacgctg tgcgatctat tctgaaatc ccgaggtctc cagctctgac gcccagctag cactccctcc accgtccgca gcgcagata
   agtccgttag tgggaccgtc tctgtgcgca cgaactgcgac agctagtcac agtactttag ccctccagag gtcgcccagc ccggctagtc gtagggcagg tgcagggcct cgcctgctat
   RGLU548HindIIIrwfwd
   <<.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<<
   - a d v r a s v i t s v s d l l k m r d a p e w g a r g l i l v g d v d p i a v y
121 gtcgcgata ttgcctcgc acagctgccc gccatagagc agcggatccc gcaagctgct gtcggggccc gtagatctct gcatcagccc gcgcagtttc gtaggtatct gcgacagcaa
   cagcctctac aaccggccc gctgcgagcg cgttatctcg tgcctcagc cgtgcacaqa cagcccgcgc cactacagga cgtagtgcgc cgtctcaag catacctaga cgtctgtctt
   <.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<
   d r i n a q s v s g g y l l p i r v t s d p g t i d q m v a r l k t h i q s v f
241 cgggctctt cgcggggcgc ctgcgcacc aatggcccag accggtctat agcgatcag aaccggggcg aaatcctctt gcgacagccc gtagcgtgct atttctgctt gccggcgag
   gcccccagaa cgcggccgcg gacggcgtg ttaccgggct tggccgagta tccgtctgct ttgggcccgc tttaggagga cgtctcggg cagctcaagc taaaagcga cggcccgtct
   <.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<
   p a e a p r g a a g i a w v p e y a i l v r a f d e q s l g h l a i k a q r a l
361 cgttctctgc gagaccocga actcgaactc gcccagccta tgcggatgc agaccagcgc ctgcagaccg tgtttcagcg ccgcgggac cttgaggttc accgtccagt cgtctctcc
   qcaaaagcag cctctgggct ttagcttagc caagtcgcat accgcctcag tctgtctccc cagctctgcc acaaaatcgc ggcgcctcct gaactccaag taccagctca gccaagaagg
   <.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<
   t e q s v g f e f e d l t d g i c v l p q l g h k l a a r v k l n v t w d t e g
481 gaaatgctgc cggcgttccg aatggccgat caccacatg gacgcggcgc attcggcgtat catcggcgcg gaaatttccc cgttccagcg ccagctgctt tcccagaaca tgttctgccc
   ctttctcagc gccgcagccc ttaccggcta gctgtgctac ctgcggggcg taaagccta gtagccgccc ctttaaaagg gccaggtccc cggcgacaga aggtctctgt acaagacagc
   <.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<
   f h q r r e s h g i v v m s a g c e a i m p a s i e g t w a g s d e w f m n q a
601 ccccagctgc atagcctgac cctgaagcgc cgcctcagc tcttccagcg acgtaacgag cagattcagc aaggtccgaa cgcctccggg ggaacaaag gccccaaggg cccggccccc
   cgggtgctag tatcccagc ggaactcctg gcgcgagctc agaaagctcc tgactctgccc gcctaatgctc ttccaggttt cggggagccc cctctcttcc cggcgttccc gggcccggcg
   <.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<
   g v i m p s g q l v a s v d k l s t f p p n v f t r v g e p p r f a a l a r a a
721 cgaacagctc tccggggggc ccttctctat tttccagctc gtcocgatcc agacgtctct ctgatccagc gttaacctca cgcagaggtt tcaactggcc gggcactcat gccgattctc
   cgttctgca agcccggcc ggaacaagta aaaggtcaag cagggctagg tctgccaaga gactagctgc caattggagt cctgtcccaa agttgaccgg cccgtgagta cggctaagag
   <.....RGLU00548 Triose-P-Isomerase.....<
   a v a e a p g k n m k w n t g i v v t k q d v
841 cggatcccgc acttctccgg aatatcttta ccgctaatac ataacagaaa aaatggcagc cgtcccataa ataacgatac atctctccc cctgaaaca gcccccgggg cggggatgct
   ggcttagggc tgaagagccc ttatagaaat ggcgattttg tattgtcttt ttaccctcgc gcagggctact tattgctatg tagagagggc gggactttgt cggggccccc gccocctaca
   -35 -10
961 ccttgagtaa agcgtctggt tgccaatccc gttcc
   gggactcatt tgcagcaca acggttaggc caag
   RGLU548XbaIrev

```

Abb.III.30: DNA-Sequenz der Triose-P-Isomerase aus *G. oxydans* DSM3504


```

1  cgctctttat tacagtcacc tgaatatgat ttccggcata tccggaattc ccataacagt ctgtgcccag tctaccgttt aataagcgcg tttactgccc ccattgcccgg taaacgtctc
   gcggaataa atgtccgtgg acttatacta aaagccgtat aggccttaag ggtattgtca gacacgcctg agatggcaaa ttattcgcgc aatatgcgcg ggtaccgccc atttgacag
   RGLU541XbaI fnd -35 -10
121 ttccctcgtg tctttttctg ttgcccatcc cctgaecgga ggectgaaaa ccgatggcgt ctcgatctga aattctgatt gtccgttgccg gtgttgcggg tctttccctt goaacccgcc
   aaggggagac agaaaagac aacgggtagg ggacttgctt ccggactttt ggctaccgca gggctagact ttaagactaa cagcccgcgc cacaacggcg agaaagggaa cgttggcgcg
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   m a s r s e i l l i v g g v a g l s l a t r
241 tgggcaatc aatgggaaaa tccgaaaggg cgcgcatacc gctgatcgac aagagctttt cccatgtctg gaaaccgatg ctgcactgct ttgcctccgg caggtcagc aacgaaaacg
   agccgttcag ttaccctttt agcctttccc gcgcgtatgt cgcactagct ttctcgaaaa gggtagacag ctttggctac gacgtgacga aacggaggcc gtgcccagtc ttgcttttgc
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   l g k s m g k s g k a r i t l i d k s f s h v w k p m l h c f a s g t v s n e n
361 acaagtgaa cttcatctcc caggccaagc ggcaccattt cgagtctctg cccggcgagg ttgcctccat tgaccgcgag aaccggcggg tcgtttccag cccgttctgt gaagccagc
   ttttccactt gaagtagagg gtccgctgac ccgtggtaaa gctcaagacc gggccgctcc aaccgaggtt actggcgctc ttggcgctcc agcaagagtc gggcgaagc cttcggctgc
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   d k v n f i a q a a g h h f e f w p g e v a a i d r e n r e v v l a p l l e a d
481 gcaccgtcat tctggaaagc cggcgcatac aatacagcac gatcgtcacc gcatcgcca gtaccgcaa tgattctggc acgcccggcg tcaaggaaca ctgcatgtcc atcgacaac
   cgtgcaagta agaccttttg gcccgctact ttatgctgtg ctacagatag cgtacgcgtt catggcggtt actaaagccg tcggggcgcc agttctctgt gacgtacagc tagctgttag
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   g t v i l e s r r m k y d t i v i a i g s t a n d f g t p g v k e h c m s i d n
601 tctgtgagc caatggcttc aacgagaagt tccggatgga gctgctccc gccttcgcca acatttccga actggacatc gcatgctgct cggggggggc caccgggtgt cagctcggc
   agcacctgag gttaccgaag ttgctcttca agccttacct cgacgaggcg cggaaagcgt tgttaaggct tgacctgtag cgttagcagc cgcgcgcccg gttggccacac gtcagcggcg
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   l v d a n a f n e k f r m e l l r a f a n n s e l d i a i v g g g a t g v q l a
721 ccgagcttca caaggcctg gaattcgtgg gccatacaaa cctgcatgct ttccgcaagg ccccgcccaa gctccatgct acgctcctgc agtccggcgc ggcgatccctg cccgttttc
   ggctcgaagt gtcccgagc ctttagcaac ccggtatggt ggacgtacga aagccgttcc gggcggggtt cgaggtacag tgcgaggagc tcaggccgcg cgcgtaggac gggcgaagaa
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   a e l h k a l e i v g p y n l h a f g k a p p k l h v t l l q s g a r i l p a f
841 cggaaatcgt cctccgcccg gcacagcagg aactcgaaca tctcggcgtt accgtccgca ccaatgcgcg cgtcggcgcg gccgatgagc atggtttcac gctcaaggac ggatcctatg
   gctttagaca gaagggcgcc cgtatctctc ttgagcttct atagccgcaa tggcaagcgt ggtttaccgc gtagccgccc cggctactcc taccaaaagt cagatctctg ccagatgac
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   p e s v s a a a q q e l e h i g v t v r t n a r v a a a d e h g f t l k d g s y
961 ttctggcaa gctgcgcgct tggcgcgctg gcgtccgagc cctgaggtc acgactgct atgggtgctt gacgatcaac aaaaccggtc agatctctgt caatccgaac ctgtctcca
   aaagccggtt agacgcgag acccgccgac cgcagcctcg gggactccag tctgtagcga taccaccgga ctgctagtgt ttttggccag tctaggagca gttaggcttg gacagaggt
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   l v d a n a f n e k f r m e l l r a f a n n s e l d i a i v g g g a t g v q l a
721 ccgagcttca caaggcctg gaattcgtgg gccatacaaa cctgcatgct ttccgcaagg ccccgcccaa gctccatgct acgctcctgc agtccggcgc ggcgatccctg cccgttttc
   ggctcgaagt gtcccgagc ctttagcaac ccggtatggt ggacgtacga aagccgttcc gggcggggtt cgaggtacag tgcgaggagc tcaggccgcg cgcgtaggac gggcgaagaa
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   a e l h k a l e i v g p y n l h a f g k a p p k l h v t l l q s g a r i l p a f
841 cggaaatcgt cctccgcccg gcacagcagg aactcgaaca tctcggcgtt accgtccgca ccaatgcgcg cgtcggcgcg gccgatgagc atggtttcac gctcaaggac ggatcctatg
   gctttagaca gaagggcgcc cgtatctctc ttgagcttct atagccgcaa tggcaagcgt ggtttaccgc gtagccgccc cggctactcc taccaaaagt cagatctctg ccagatgac
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   p e s v s a a a q q e l e h i g v t v r t n a r v a a a d e h g f t l k d g s y
961 ttctggcaa gctgcgcgct tggcgcgctg gcgtccgagc cctgaggtc acgactgct atgggtgctt gacgatcaac aaaaccggtc agatctctgt caatccgaac ctgtctcca
   aaagccggtt agacgcgag acccgccgac cgcagcctcg gggactccag tctgtagcga taccaccgga ctgctagtgt ttttggccag tctaggagca gttaggcttg gacagaggt
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   v s a k l r v w a a g v r a p e v t t a y g g l t i n k t g q i l v n p n l s s
1081 ttoatgaca cggatctttc gccatggagc actgctcctt catccaagac gatccctcgc ccgccacgc gcaagtttcc ccgcaacgag cccggcatct gccccgccat ctcccgccct
   aactactgct cgcctaaaag cgttaccctc tgacagagaa gttagtctctg ctaggggagc gggcggtgccc cgtccaaagg gcctcgtccc gggccgtaga ccgcgcgga gacggccgga
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   i d d e r i f a m g d c s f i q d d p l p a t a q v a r q q a r h l a r h l p a
1201 ggatcgagca tggccagaaa gtcccgggct gatttttcca caacaagggc gcatgctggt cctctgggaaa atacaatggc tggcgcgctc ttcccggcgg tacggtctgg gggaggagca
   cctagctgct accggtcttt caggggccga cataaaaagt gttgttcccg cgttagcacc gagaaccttt tatgttacag acccgccgag aaggggccgc atgccagacc cctcctcctg
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   w i e h g q k v p g c i f h n k g a i v a l g k y n g w a a l p g g t v w g g g
1321 ttctgcacgg cttctcggcg cggatgccc atctcigt ctatcgccag caccagatcg actcgttcgg ctattaccgg gggctgatgt ccttttactc cgaactggc gacacttgc
   aaagccgtcc gaagagccc gcttaccggg tagaatacga gatagcggtc gtggtctagc ttgacaagcc gataatggcc cccgactaca ggaataatg gctgacccag cctcgtgaagc
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase.....>>
   i s h g f s a r m a h l m l y r q h q i e l f g y y r g l m s f y s d w v e t f
1441 tccggcttcc cgtgcgctg gactgagcac catccgcgcc tgagcaacc cctgacagc aaaaaaaaa cccgcgccc acgccaaggg ctttttctgc tagaagctcc cccgtaccgt
   agcccggaag gcacccgagc ctgactcgtg gttagcggcg actcgttggg cggactcgtc ttttttttc gggcgccgga tgcggtgccc gaaaacagc atcttcagc ggcctcga
   >>.....RGLU00541 NADH-Dehydrogenase
   v r p s v r l d -
1561 gccgaagaac a
   cggcttcttg t
   NALHoo rev

```

Abb.III.32: DNA-Sequenz der NADH-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM3504

Die Fragmente wurden mit den in Tab.III.19 aufgeführten Primern amplifiziert und anschließend mit *Xba*I und *Hind*III verdaut. Im Anschluß erfolgte deren Ligation mit dem gleichermaßen verdauten Vektor pBBR1-MCS2. Nach der Transformation in *E. coli* DH5a erfolgte die Überprüfung mittels Kolonie-PCR und anschließender Sequenzierung. Die fertigen Plasmide sind in Abb.III.33 dargestellt.

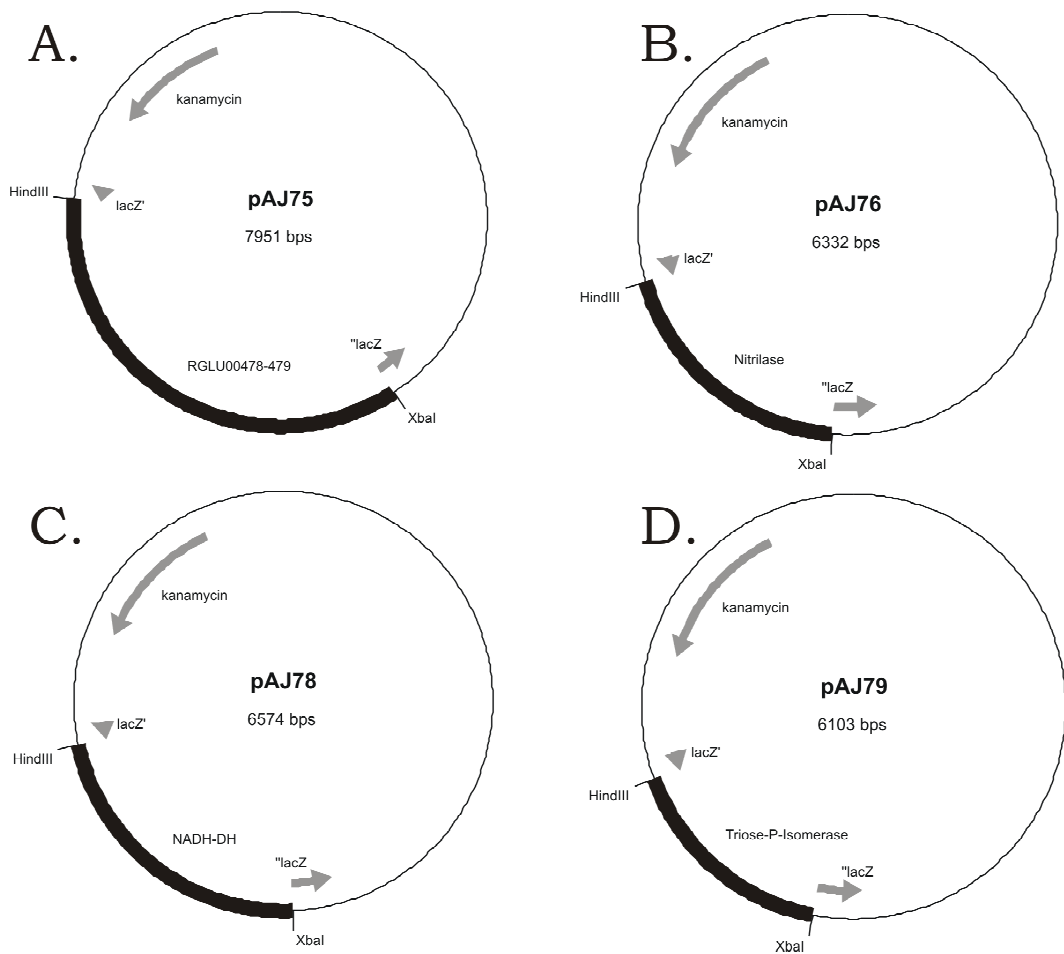
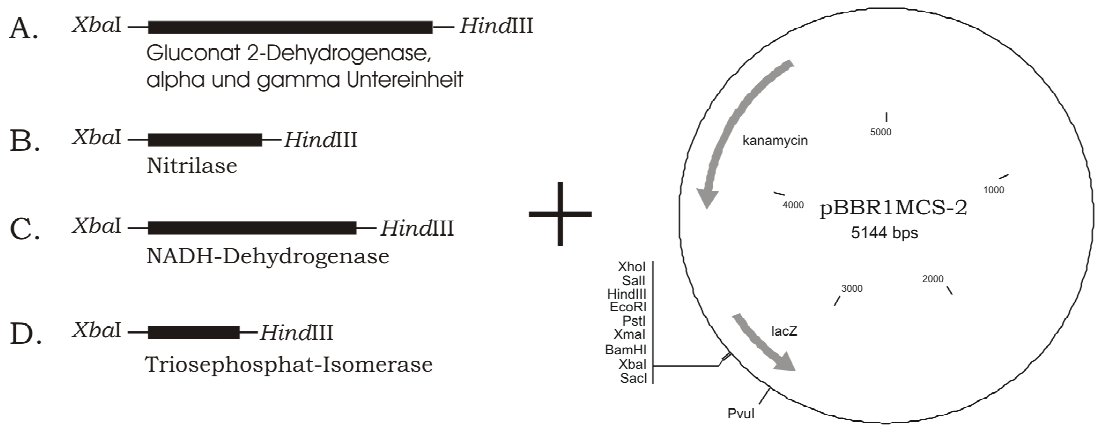


Abb.III.33: Zusammenstellung der Strategie zur Erstellung der Expressionsplasmide für die Gene einer Nitrilase, Gluconat 2-Dehydrogenase, NADH-Dehydrogenase TypII und eine Triosephosphat-Isomerase **A.** Klonierungsstrategie von pAJ75 (Gluconat-Dehydrogenase) **B.** Konstruktion von pAJ76 (Nitrilase) **C.** Klonierung von pAJ78 (NADH-Dehydrogenase) **D.** Konstruktion von pAJ79 (Triose-P-Isomerase)

Die Plasmide pAJ75, pAJ76, pAJ78 und pAJ79 wurden anschließend mit Hilfe des *triparentalen mating* in *G. oxydans* 621H konjugiert. Nach der Überprüfung mittels Kolonie-PCR wurden einzelne Wachstumstest in Vollmedium mit 50mM Mannitol durchgeführt.

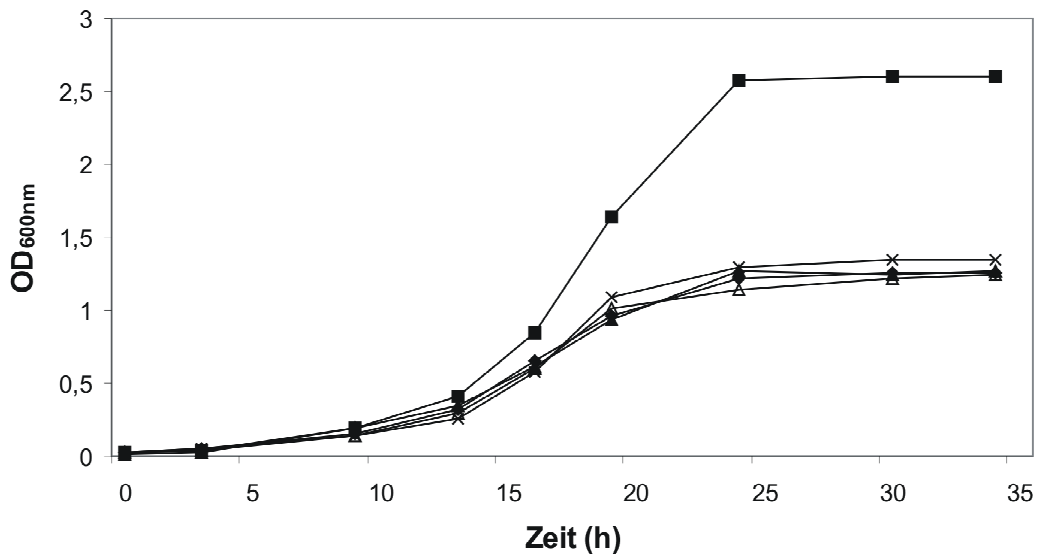


Abb.III.34: Wachstumskurven der Stämme mit den Expressionsplasmiden pAJ75, pAJ76, pAJ78, pAJ79 und pBBR1-MCS2, angezogen wurden die Stämme in Vollmedium mit 50 mM Mannitol und 50 µg / ml Kanamycin; NADH-Dehydrogenase - *G. oxydans* 621H pAJ78 (■); Triose-P-Isomerase - *G. oxydans* 621H pAJ79 (×); Nitrilase - *G. oxydans* 621H pAJ76 (▲), Gluconat-Dehydrogenase - *G. oxydans* 621H pAJ75 (Δ); Kontrolle - *G. oxydans* 621H pBBR1MCS2 (◆)

In Abb.III.34 sind die Wachstumskurven in Vollmedium mit 50 mM Mannitol dargestellt. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrolle *G. oxydans* 621H pBBR1-MCS2 und den Stämmen *G. oxydans* 621H pAJ76 (Nitrilase), *G. oxydans* 621H pAJ79 (Triose-P-Isomerase) und *G. oxydans* 621H pAJ75 (Gluconat-Dehydrogenase) beobachtet werden. Allerdings ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrolle und dem *G. oxydans* 621H pAJ78 (NADH-Dehydrogenase TypII) zu erkennen. Durch das Einbringen des NADH-Dehydrogenase Gens aus *G. oxydans* DSM3504 in *G. oxydans* 621H konnte ein Zuwachs der erreichten optischen Dichte auf das doppelte beobachtet werden. Dieser Unterschied ist auch erkennbar, wenn man sich die Wachstumskurve zwischen *G. oxydans* 621H und

G. oxydans DSM3504 ansieht. Dies lässt den Schluß zu, dass die zusätzlichen Kopien der NADH-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM3504 einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten haben.

6. Methode zur Gen-Integration ins Chromosom von *G. oxydans* 621H

In der Molekularbiologie gibt es verschiedene Methoden um die Funktion eines Gens zu untersuchen. Dazu gehören unter anderem die Deletion sowie die Überexpression des Gens und die anschließende experimentelle phänotypische Untersuchung.

Bei der Fragestellung, wie verhält sich das Gen in einem anderen Organismus bzw. Stamm, kann das Gen in das Chromosom integriert werden. Dazu bedarf es je nach Stamm einer geeigneten Strategie. In dieser Arbeit wurde für *G. oxydans* 621H eine neue Methode entwickelt, wodurch Fremd-DNA in das Chromosom durch homologe Rekombination integriert werden kann. Dabei basiert das System auf dem Austausch des *upp*-Gens, welches für eine Uracil-Phosphoribosyl-Transferase kodiert, mit dem auszutauschenden Gen. Die Abb.III.35 gibt die Vorgehensweise der Methode detailliert wieder. Damit ein Austausch stattfinden kann, wurde eine Fusion bestehend aus dem auszutauschenden Gen sowie den Flanken der *up*- und *downstream*- Region vom *upp*-Gen gebildet. Dazu wurden zuerst das Gen sowie die Flanken *up*- und *downstream* vom *upp*-Gen amplifiziert und anschließend miteinander mittels PCR fusioniert. Das so entstandene Fusionsprodukt wurde in den Vektor pAJ63a kloniert. Dieser besitzt das *upp*-Gen, welches für eine Uracil-Phosphoribosyltransferase kodiert, das als Gegenselektion verwendet wurde. Die genaue Wirkungsweise der Uracil-Phosphoribosyl-Transferase wurde oben in Punkt 1 „Etablierung eines markerfreien Deletionssystems in *Gluconobacter oxydans* mittels des *upp*-Gens“ beschrieben. Nachdem das Fusionsprodukt in den Vektor pAJ63a kloniert wurde, erfolgte die Konjugation des konstruierten Plasmids in *G. oxydans* 621H, wobei die Anwesenheit des Plasmids durch die

Zugabe von Kanamycin in den Platten überprüft wurde. Danach wurde die Integration des Plasmids ins Chromosom mit einem chromosom- sowie einen plasmidspezifischen Primer kontrolliert. Das Entfernen des Plasmids und somit die Einleitung der zweiten Rekombination erfolgte durch die Zugabe von 5-FU ins Medium. Dadurch konnten nur Klone anwachsen, welche kein intaktes *upp*-Gen mehr besitzen. Also die Klone, in dem der Austausch erfolgreich war und die nicht mehr das Plasmid enthielten (Abb.III.35). Die Integration des zu interessierenden Gen durch den Austausch mit dem *upp*-Gen wurde anschließend mittels Kontroll-PCR's und Sequenzierung überprüft.

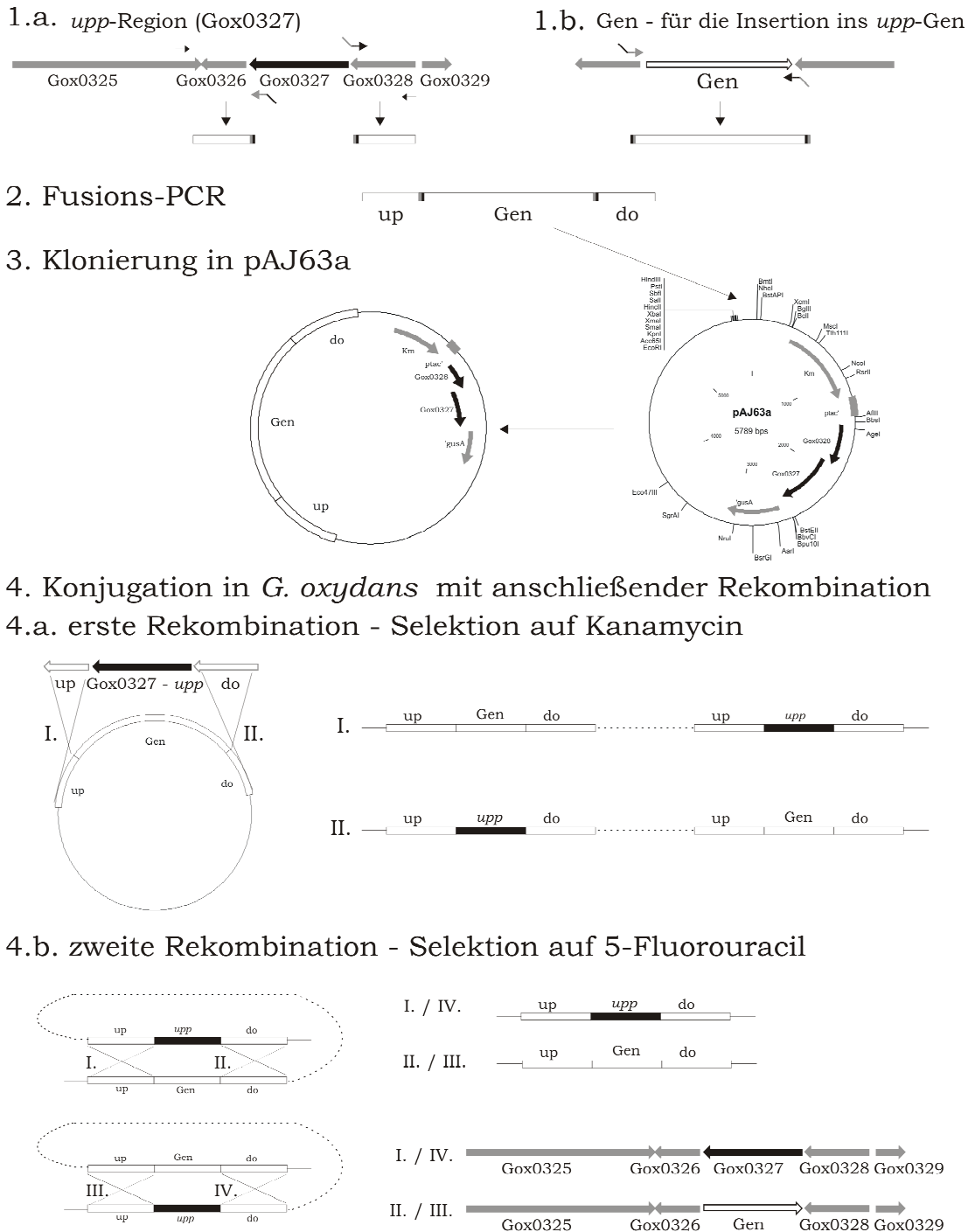


Abb.III.35: Schematische Darstellung für die Integration eines Gens in das Chromosom von *G. oxydans* 621H; 1.a./b. Amplifikation der Flanken vom *upp*-Gen sowie das Gen, welches integriert werden soll; 2. Fusion der drei Amplifikate 3. Klonierung des Fusionsprodukt up-*upp* - Gen - do-*upp* in den Vektor pAJ63a; 4. Konjugation des Plasmids in *G. oxydans* 621H; 4.a. skizzierte Abbildung der ersten Rekombination – die Selektion auf das Plasmid erfolgte auf Kanamycin-Platten; 4.b. Darstellung zur Einleitung der zweiten Rekombination mit Hilfe der Zugabe von 5-FU – I. / IV. geben den Wildtypzustand wieder, wobei II. / III. die gewünschte Mutante darstellt

7. Insertion des Gens der NADH-Dehydrogenase von *G. oxydans* DSM3504 in *G. oxydans* 621H

Die im vorigen Verlauf dargestellten Experimente zeigten (s.5.1), dass bei einer Expression des Gens RGLU00541 (NADH-Dehydrogenase TypII) aus *G. oxydans* DSM3504 in *G. oxydans* 621H fast die doppelte OD im Vergleich zum WT erreicht wurde. Da die Experimente mit dem Expressionsvektor pBBR1-MCS2, der in mehreren Kopien in der Zelle vorkommt, durchgeführt und zusätzlich in Selektivmedium mit Kanamycin angezogen wurde, sollte nun das Verhalten einer einzelnen zusätzlichen Kopie der NADH-Dehydrogenase vom TypII aus *G. oxydans* DSM3504 untersucht werden. Dazu wurde das Gen RGLU00541 in das Chromosom integriert. Die Integration erfolgte durch den Austausch des *upp*-Gens von *G. oxydans* 621H mit dem Gen der NADH-Dehydrogenase vom TypII aus *G. oxydans* DSM3504. Das Prinzip beruht, wie bei dem *upp*-Deletionssystem, auf der Gegenselektion mit Hilfe von 5-FU. Die Integrationsmethode ist detailliert in Abb.III.35 wiedergegeben. Die Klonierungsstrategie zur Erstellung des Plasmids für den Austausch des Gens RGLU00541 (NADH-Dehydrogenase) aus *G. oxydans* DSM3504 mit dem *upp*-Gen von *G. oxydans* 621H, ist in Abb.III.36 dargestellt.

7.1 Integration der NADH-Dehydrogenase (RGLU00541) in das *upp*-Gen des *G. oxydans* 621H-Stammes

Ziel war es, die NADH-Dehydrogenase in das *upp*-Gen zu integrieren. Dazu wurde als erstes die *upstream* und die *downstream* Region des *upp*-Gens (Gox0327) von *G. oxydans* 621H amplifiziert und anschließend die NADH-Dehydrogenase (RGLU00541) mit den in Tab.III.20 angegebenen Primerpaar konstruiert. Das Besondere an den Amplifikaten ist, dass die flankierende Regionen komplementäre Bereiche zueinander besitzen, wodurch eine Fusion ermöglicht wurde.

Tab.III.20: Primerpaare für die Insertion der NADH-Dehydrogenase

Fragment	Primer
Gox0327-up	Gox0327 <i>HindIII</i> up fwd <i>uppup</i> Frev
Gox0327-do	<i>uppdo</i> Ffwd Gox0327 <i>XbaI</i> do rev
RGLU00541 + eigener Promotorregion	NADHFfwd NADHFrev

Die drei Flanken wurden in einer Fusions-PCR miteinander verbunden und aufgereinigt. Anschließend wurde die Fusion mit den Restriktionsenzymen *XbaI* / *HindIII* verdaut und in den ebenfalls verdauten sowie dephosphorylierten Vektor pAJ63a ligiert und das daraus resultierende Plasmid pAJ81 genannt.

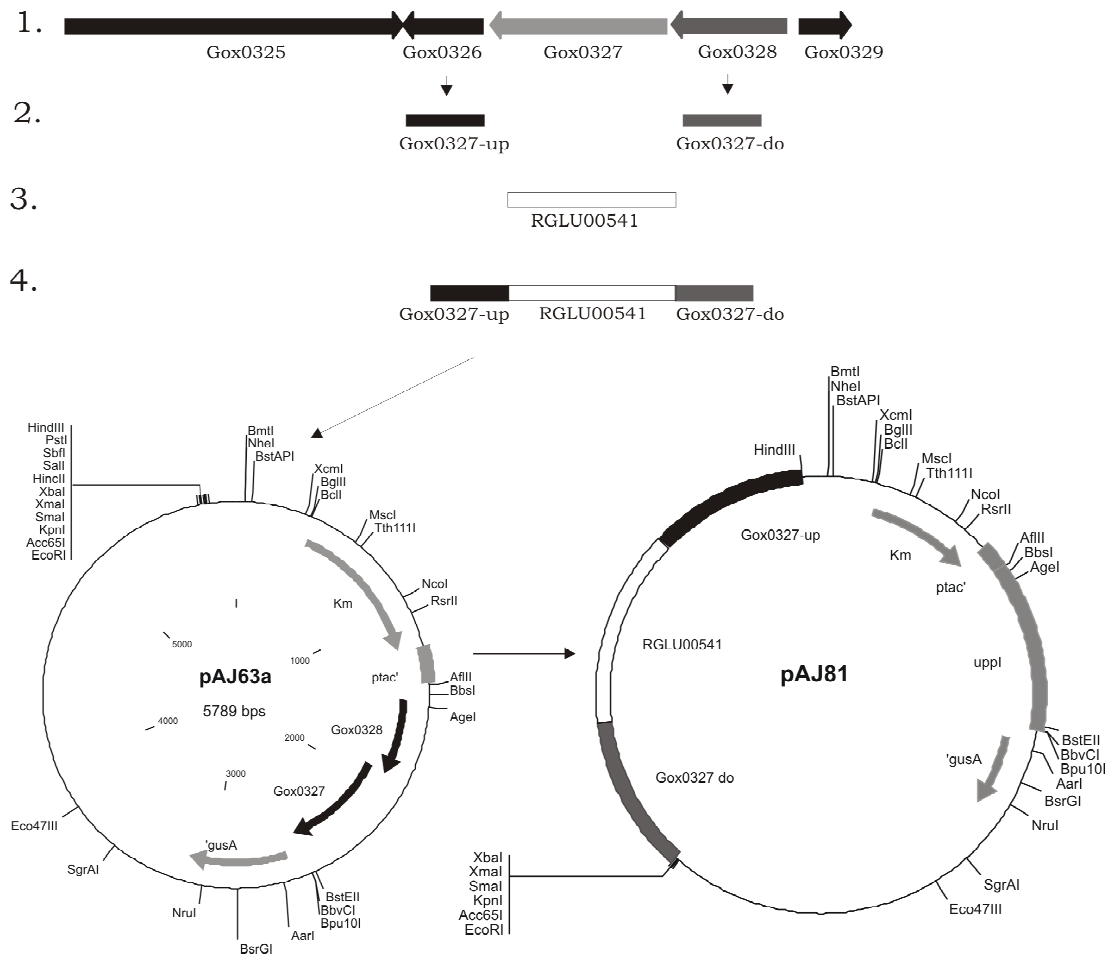


Abb.III.33: Konstruktion von pAJ81 **1.** genetische Orientierung des *upp*-Gens (Gox0327) **2.** Amplifikation von Gox0327up sowie Gox0327do **3.** Amplifikat von RGLU00541 **4.** Fusions-PCR von den drei PCR-Produkten Gox0327up, Gox0327do und RGLU00541 mit anschließender Klonierung in pAJ63a. Das resultierende Plasmid wurde mit pAJ81 benannt.

Das Plasmid pAJ81 wurde mittels *triparentalen mating* in *G. oxydans* 621H konjugiert. Mit dem Nachweis der ersten Rekombination erfolgte die Einleitung der zweiten Rekombination. Dafür wurde eine Übernachtskultur ohne Antibiotikum auf 5-FU Platten ausplattiert und anschließend die Klone auf den Austausch des *upp*-Gens durch die NADH-Dehydrogenase überprüft. Dazu wurde eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar Gox0327checkrev / Gox0327checkfwd durchgeführt (Abb.III.37). Nach abschließender erfolgreicher Sequenzierung wurden die Wachstumsversuche durchgeführt.



Abb.III.37: Integration der NADH-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM3504 in *G. oxydans* 621H; **1.** 1% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der Kontroll-PCR: Spur 1: *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541* mit 4,1 kb; Spur 2: *G. oxydans* 621H mit 3,3 kb; **2.** genetische Orientierung a. *G. oxydans* 621H b. *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541*

7.2 Wachstum von *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541* (NADH-Dehydrogenase TypII aus *G. oxydans* DSM3504)

Mit der konstruierten Insertionsmutante *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541* (NADH-Dehydrogenase TypII aus *G. oxydans* DSM3504) wurden Wachstumsversuche in Vollmedium mit 50mM Mannitol durchgeführt. Allerdings konnte das Ergebnis, dass durch das Einfügen der NADH-Dehydrogenase (RGLU00541) aus *G. oxydans* DSM3504 eine erhöhte OD erreicht wird (Abb.III.35), leider nicht bestätigt werden. In dem Diagramm verhalten sich WT und *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541* ähnlich.

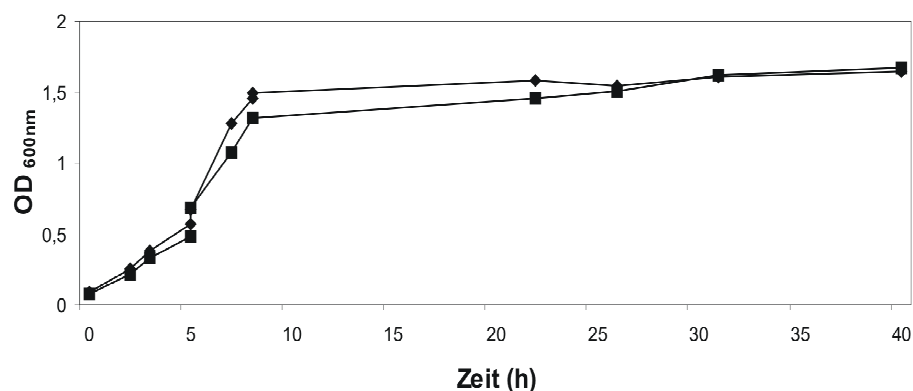


Abb.III.35: Vergleich einer Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H mit *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541* (enthält eine zusätzliche Kopie einer NADH-Dehydrogenase vom TypII aus *G. oxydans* DSM3504); angezogen wurden die Stämme in Vollmedium mit 50mM Mannitol; *G. oxydans* 621H Δupp (■); *G. oxydans* 621H *upp::RGLU00541* (◆)

IV. Diskussion

1. Etablierung einer markerfreien Deletionsmethode

G. oxydans wird in der Biotechnologie in vielen unterschiedlichen Verfahren eingesetzt, wie z.B. zur Herstellung von Miglitol und Vitamin C (Reichstein and Grüssner, 1934; Matsushita *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000; Schedel, 2000). Er besitzt eine Vielzahl an Dehydrogenasen, welche in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Das Besondere dieser Dehydrogenasen ist die schnelle und unvollständige Oxidation einer Vielzahl von Zuckern, Alkoholen und Polyolen und das direkte Ausscheiden der unvollständig oxidierten Produkte ins Medium (Gupta *et al.*, 2001; Deppenmeier *et al.*, 2002).

G. oxydans besitzt einige scheinbar unvollständige Zentralstoffwechselwege. Betroffen sind davon die Glykolyse und der Zitronensäurezyklus (Prust, 2004), außerdem ist der Zentralmetabolismus noch nicht näher untersucht worden. Um an detaillierte Informationen über diese Wege sowie über die Funktionen der Dehydrogenasen zu gelangen, helfen molekularbiologische Untersuchungen, u.a. das Deletieren von Genen. In der Molekularbiologie werden markerfreie Mutationen im Chromosom bevorzugt. Ein effizientes markerfreies Gendeletionssystem für *G. oxydans* wurde in der bisherigen Literatur nicht beschrieben, aufgrund dessen war die Etablierung dieses Systems Ziel dieser Arbeit. Ein signifikanter Vorteil einer markerfreien Deletion ist, dass die Mutationen in dem natürlichen chromosomalen Kontext der WT-Gene stehen. Eine optimale Situation für genaue, genetische Studien. Außerdem können in markerfreien Deletionsstämmen mit Hilfe der Methode weitere Mutationen schrittweise in einem Stamm konstruiert werden, ohne einen Antibiotikaresistenz-Marker zu verwenden. Dadurch werden Konflikte durch mehrfachen Einsatz von Resistenz-Markern vermieden. Des Weiteren können mit Hilfe einer

markerfreien Deletion Gene, die sich in einem Operon befinden, untersucht werden. Da polare Effekte *downstream* des Genbereichs durch die Insertion eines Resistenzmarkers verhindert werden. Ein wichtiger Punkt bei einer markerfreien Deletion ist eine Gegenselektion die im Labor technisch und effizient möglich ist, um den erschwerten und uneffizienten Prozess beim Screening von tausenden Einzelkolonien zur Identifizierung der Mutation zu erleichtern.

In dieser Arbeit wurde eine markerfreie Strategie entwickelt, bei der 5-Fluorouracil (5-FU) zur Gegenselektion für plasmidfreie Mutanten dient (Abb.IV.1 - Abb.IV.4). Das für den Einbau von Fluorouracil verantwortliche *upp*-Gen ist Bestandteil im Pyrimidin-Stoffwechselweg. Die Pyrimidine werden benötigt um DNA, RNA und andere Kofaktoren zu synthetisieren. Zur Versorgung mit ihnen gibt es zwei Möglichkeiten, entweder der Organismus synthetisiert sie oder er benutzt bestehende Nukleotide, Nukleoside oder Nukleobasen, welche durch den Abbau von DNA und RNA in der Zelle oder durch die Aufnahme aus dem Medium zur Verfügung stehen. *G. oxydans* verfügt über alle Gene, die für eine vollständige *de novo*-Pyrimidinsynthese verantwortlich sind (Prust *et al.*, 2005). Das *upp*-Gen kodiert für eine UPRTase, diese wandelt Uracil in UMP für die Nukleotidbiosynthese um. Die Deletion von *upp* führt zur einer Resistenz von 5-FU. Die Toxizität von 5-FU wird durch die Umwandlung von 5-FU in das 5-Fluoro-UMP durch die UPRTase eingeleitet. Das 5-Fluoro-UMP wird anschließend zu dem sehr toxischen 5-Fluorodeoxyuridin-Monophosphat (5-Fluoro-dUMP) umgewandelt (Neuhard, 1982). Diese Verbindung stellt einen Thymidylat-Synthase Inhibitor dar, wodurch die Bildung von dTMP verhindert wird. Dieser toxische Effekt lieferte eine Positiv-Selektion bei der Konstruktion einer *upp*-Mutante. Später wurde die Verwendung von 5-FU bei der Gen-Deletion in einer *upp*-Mutante als Gegenselektion eingesetzt, wobei durch das Einfügen einer *upp*-Kopie

mittels dem Deletionsvektor pAJ63a die zweite Rekombination eingeleitet wurde.

Natürlich können 5-FU resistente Mutanten auch durch einen anderen Mechanismus entstehen z.B. durch eine Spontanmutation des *upp*-Gens im Deletionsplasmid. Allerdings können solche Klone leicht identifiziert werden, da sie resistent gegenüber Kanamycin wären.

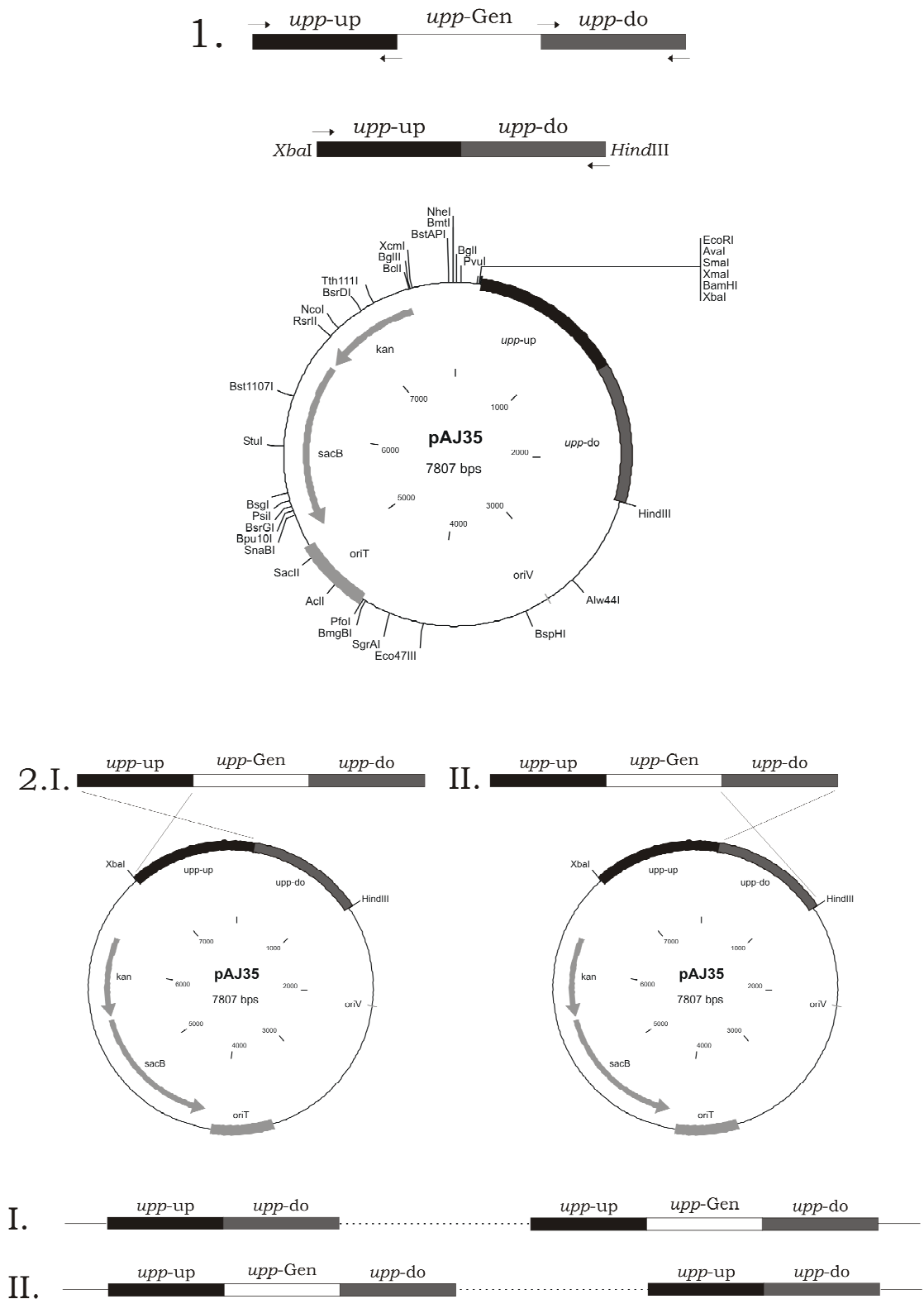


Abb.IV.1: Grundlagen der *upp*-Methode - Teil 1; 1. Schematische Darstellung der *upp*-Region und Skizzierung der Flanken up/do mit den Restriktionsschnittstellen *Xba*I / *Hind*III; Konstruktion des Vektors pAJ35 zur Deletion des *upp*-Gens; 2.I. / 2.II. zeigt die jeweiligen Rekombinationsmöglichkeiten von pAJ35 an

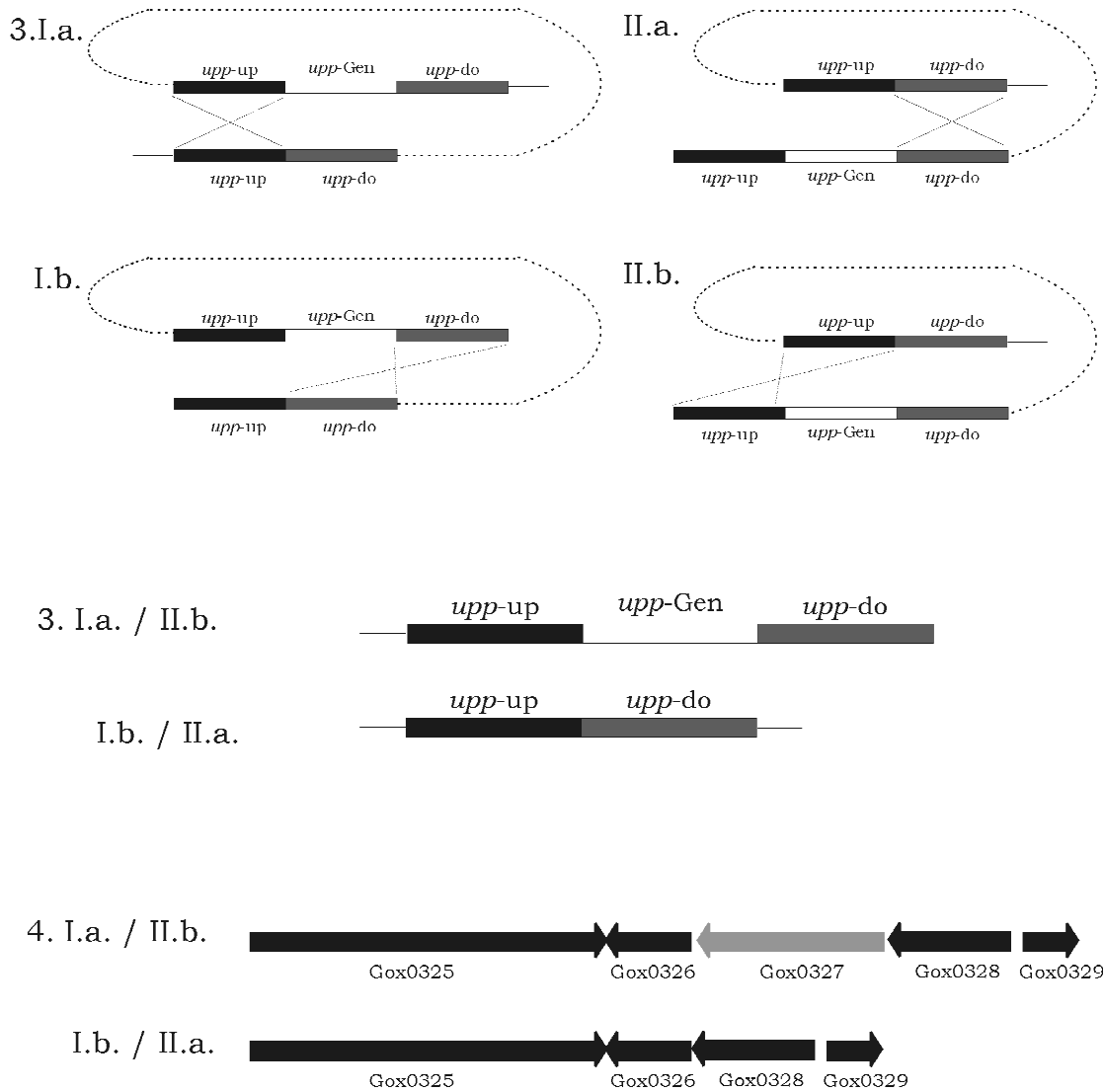


Abb.IV.2: Grundlagen der *upp*-Methode – Teil 2; 3. Darstellung der zweiten Rekombination von pAJ35, ausgehend von den zwei Möglichkeiten der ersten Rekombination; 4. genetische Orientierung nach dem Verlust von pAJ35

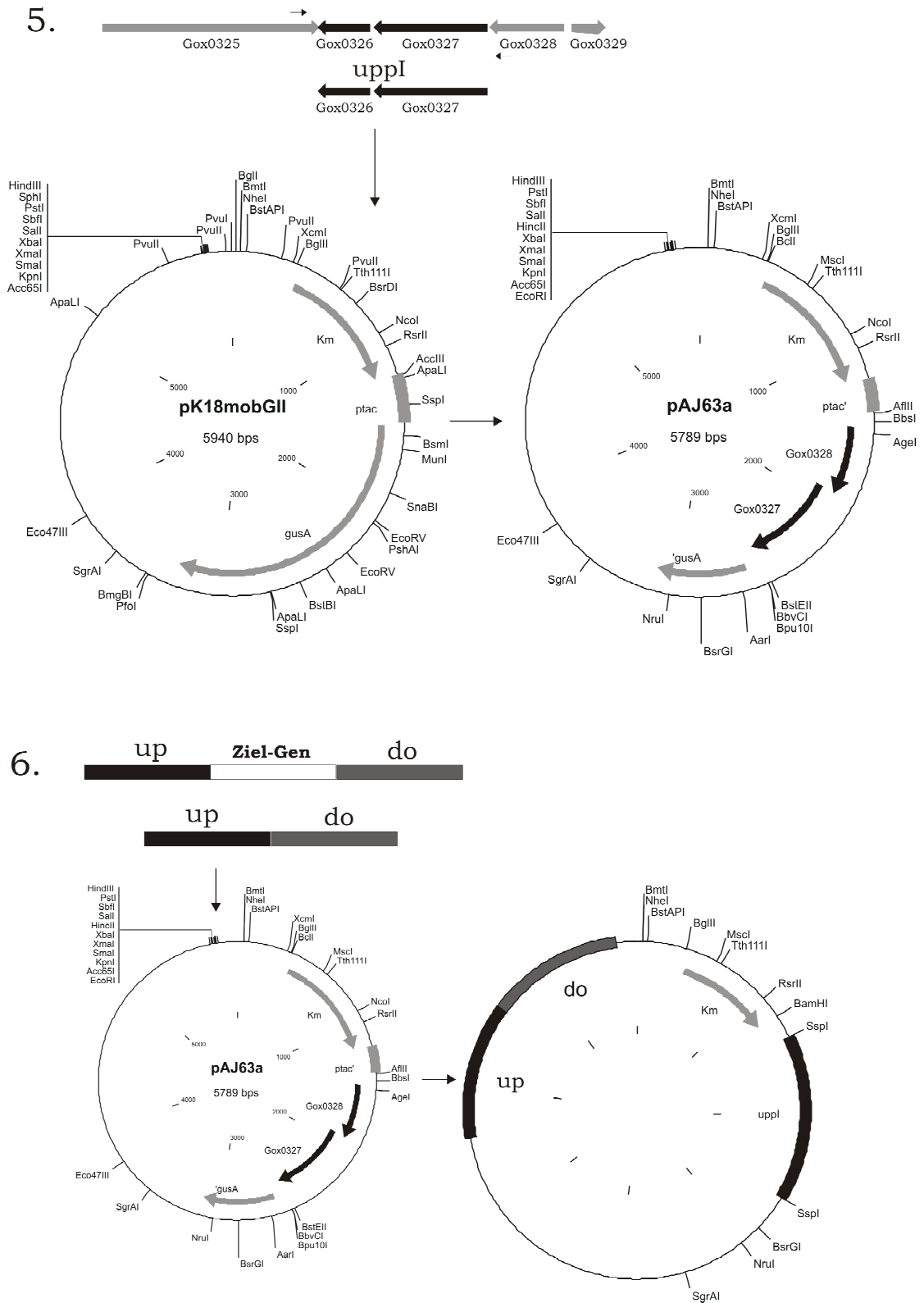


Abb.IV.3: Anwendung der *upp*-Methode – Teil 1; 5. Konstruktion des Deletionsvektors pAJ63a durch die Insertion einer Kopie des *upp*-Gens; 6. Darstellung der Region des Ziel-Gens, welches deletiert werden soll, Klonierung des Deletionsvektors, durch den Einbau der up-/do –Region der Flanken in die *multiple cloning site*

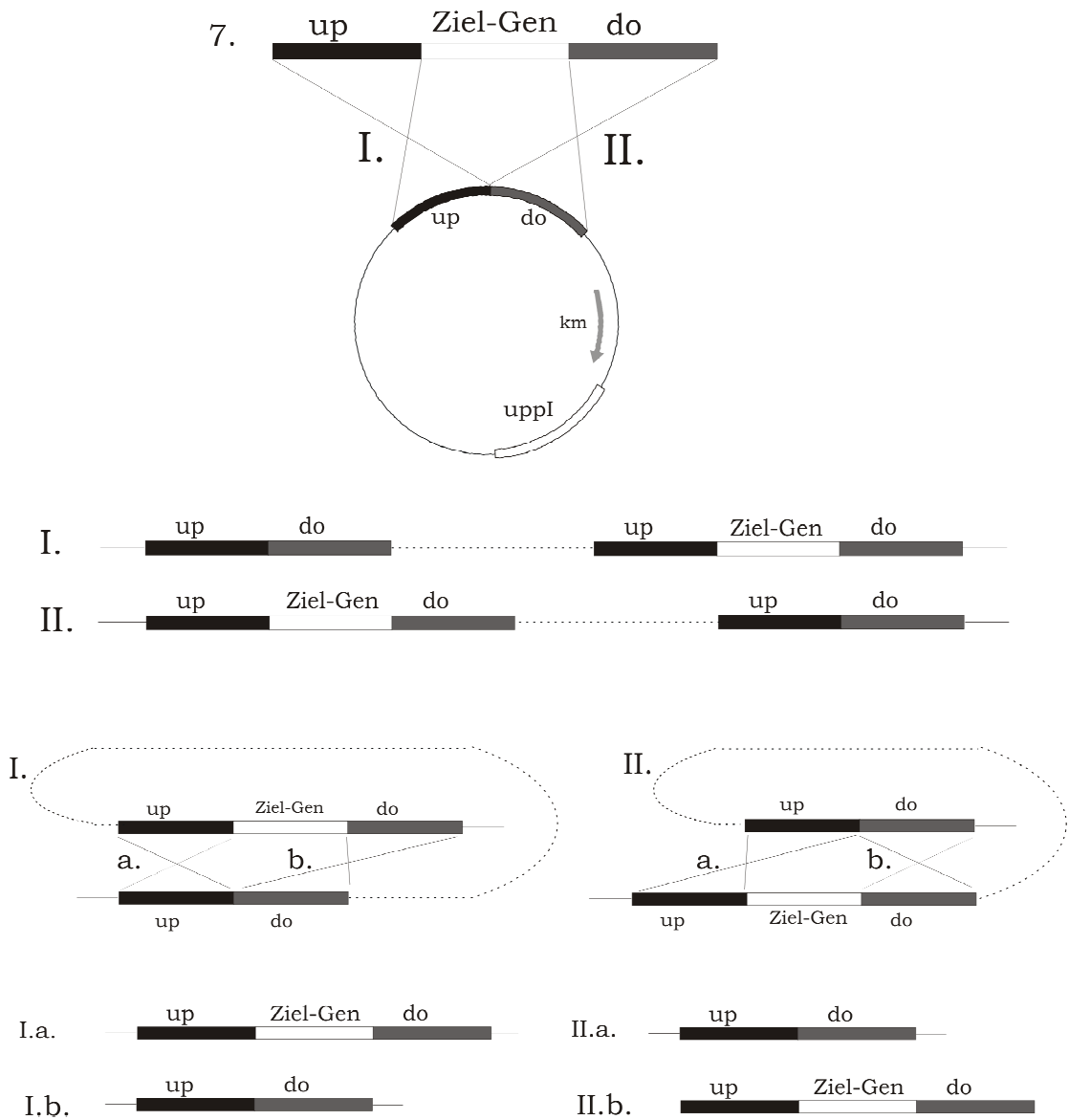


Abb.IV.4: Anwendung der *upp*-Methode – Teil 2; 7. Darstellung der Möglichkeiten der ersten und anschließenden zweiten Rekombination; II.a. / II.b. Abbildung des Mutanten- sowie Wildtypzustands

In der Praxis waren die Spontanmutationen im *upp*-Gen in den beiden Stämmen *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145 selten. Das Entfernen des Deletionsvektors durch die Zugabe von 5-FU stellte kein Problem dar.

Bei den meisten Mikroorganismen führt eine defekte UPRTase zu einer Zunahme der 5-FU Resistenz (Neuhard, 1982). Allerdings kann in einigen Organismen 5-FU direkt in 5-Fluoro-UMP umgewandelt werden. Diese Umsetzung erfolgt durch die Thymidin-Phosphorylase und Thymidin-Kinase (Martinussen and Hammer, 1994; Martinussen *et al.*, 1995; Arsene-Ploetze *et al.*, 2006). In *Lactobacillus plantarum* führte eine *upp*-Deletion zu keiner 5-FU Resistenz (Arsene-Ploetze *et al.*, 2006), was durch die direkte Umwandlung von 5-FU zu 5-Fluorodeoxyuridin Monophosphat durch die beiden genannten Enzymen, Thymidin-Phosphorylase und Thymidin-Kinase zu erklären war (Martinussen and Hammer, 1994). Ebenso wurde ein ähnliches Verhalten in *B. subtilis* (Martinussen *et al.*, 1995) sowie in *Lactobacillus lactis* beobachtet, wobei eine fehlende UPRTase nur zu einem geringen Effekt der 5-FU Sensitivität führte. Anhand der Genomdaten von *G. oxydans* 621H wurde eine Thymidin-Kinase (Gox0257) aber keine Thymidin-Phosphorylase identifiziert, wodurch dieser Stamm nicht in der Lage ist 5-FU direkt in 5-Fluoro-UMP umzuwandeln.

Die *upp*-Mutanten zeigten keinen Unterschied in ihren Wachstumsraten vergleichend zum WT, ebenso wurden keine Wachstumsunterschiede in Vollmedium mit Thymidin mit unterschiedlichen Kohlenhydrat-Quellen (Mannitol, Gluconat, meso-Erythritol, Xylose und Glycerin) zwischen den Stämmen gefunden (s.III.1.2.4). Das ließ den Schluß zu, dass die Mutante repräsentativ für den WT in weiteren Studien eingesetzt werden kann. Ähnliche Resultate wurden in *Lactobacillus acidophilus* NCFM dokumentiert. Dabei zeigte die *upp*-Mutante keinen Unterschied in ihrer Wachstumsrate vergleichend zum WT, außerdem wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen in Abhängigkeit des pH-

Wertes sowie anderen getesteten chemischen Substraten gefunden. Des Weiteren zeigten Microarray-Transkriptionsanalysen der beiden Stämme nur geringe Abweichungen, sodass die *upp*-Mutante stellvertretend für den WT in weiteren Studien eingesetzt werden konnte (Goh *et al.*, 2009).

2. Vermutliche, cytoplasmatische Polyol-Dehydrogenase (Gox2181)

In dieser Arbeit wurde die vermutliche, cytoplasmatische Polyol-Dehydrogenase (Gox2181) deletiert (s.III.1.4.1). Das auffallende an dieser Dehydrogenase war die genetische Organisation, da sich in ihrer unmittelbaren Umgebung viele weitere Gene befinden, die am Abbau und Transport von Polyolen beteiligt sind (s.III.1.4). Die genetische Anordnung dieser Gene lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um ein Operon handeln könnte. Um nähere Informationen über diese vermutliche, cytoplasmatische Polyol-Dehydrogenase zu erfahren, wurde diese deletiert. Dabei zeigten Wachstumsversuche auf Mannitol sowie Glycerol keine nennenswerten Unterschiede zwischen dieser Polyol-Dehydrogenase-Mutante und den Wildtyp (s.III.1.4.2).

Ein Grund hierfür könnten andere Enzyme mit einer Polyol-Dehydrogenase-Funktion sein, welche den Verlust kompensieren könnten.

Bei der Betrachtung des Genoms von *G. oxydans* 621H konnten über 70 Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen identifiziert werden (Prust *et al.*, 2005). Unter ihnen befinden sich 16 ORFs, die für Proteine kodieren, die der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen zugeordnet werden konnten. Dazu zählt auch das Gen Gox2181 (Prust *et al.*, 2005). Das Besondere an dieser Proteinfamilie ist ihr breites Substratspektrum, u.a. sind sie in der Lage Alkohole, aromatische Verbindungen und verschiedene Zucker zu oxidieren.

3. Transhydrogenase in *G. oxydans* 621H

Eine intakte Zelle synthetisiert in über tausend anabolischen Reaktionen Makromoleküle (Edwards and Palsson, 2000; Forster *et al.*, 2003), wobei nur elf von ihnen sowie ATP, NADH und NADPH als Kofaktoren den Kern des komplizierten biochemischen Netzwerk bilden (Gottschalk, 1986; Neidhardt *et al.*, 1990). Zum Beispiel sind die beiden Kofaktoren NADH und NADPH an über 100 enzymatischen Reaktionen beteiligt (Edwards and Palsson, 2000). Chemisch sind sich die beiden sehr ähnlich, jedoch sind ihre Funktionen in der Zelle verschieden. Der Kofaktor NADH dient dem Organismus als Oxidationsmittel und überträgt seine Elektronen in die Atmungskette. Durch die anschließende oxidative Phosphorylierung wird ATP synthetisiert (Gottschalk, 1986; Neidhardt *et al.*, 1990; Russell and Cook, 1995). Der Kofaktor NADPH fungiert hauptsächlich als Reduktionsmittel und ist an anabolischen Reaktionen beteiligt. Somit verknüpfen die beiden Kofaktoren NADH sowie NADPH den Anabolismus und den Katabolismus miteinander. Dabei überwiegt NAD in der oxidierten- und NADP in der reduzierten Form. Durch schwankende Umweltbedingungen variiert das Verhältnis von NADH und NADPH in der Zelle und bedarf so einer Regulation. Ein mögliches Enzym, welches diese Aufgabe erfüllen könnte, wäre die Transhydrogenase, da sie den reversiblen Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen NAD(H) und NADP(H) katalysiert.



Abb. IV.5: Transhydrogenase-Reaktion

Es wurden bisher zwei Typen von Transhydrogenasen identifiziert, wobei die eine membrangebunden und an der Protonentranslokation beteiligt ist und die andere eine lösliche, energie-unabhängige

Transhydrogenase darstellt (Hoek and Rydstrom, 1988; Bizouarn *et al.*, 2002). Viele Mikroorganismen enthalten eine der beiden Formen. Eine Ausnahme sind *Enterobacteriaceae*, die beide Transhydrogenasen besitzen, welche durch die Gene *pntAB* und *udhA* kodiert werden (Clarke *et al.*, 1986; Boonstra *et al.*, 1999).

In *G. oxydans* 621H konnte mit Hilfe der Genomanalyse eine membrangebundene Transhydrogenase identifiziert werden, welche aus drei Polypeptidketten besteht, die von den Genen Gox0310, Gox0311 und Gox0312 kodiert werden (Prust *et al.*, 2005). Ebenso existiert in *Rhodospirillum rubrum* ein ähnliches Cluster für eine Transhydrogenase bestehend aus drei Genen *pntAA*, *pntAB* und *pntB* (Williams *et al.*, 1994; Bizouarn *et al.*, 1996; Diggle *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu besteht die membrangebundene Transhydrogenase in *E. coli* nur aus zwei Untereinheiten, kodiert durch die Gene *pntA* und *pntB* (Clarke *et al.*, 1986).

Transhydrogenasen bestehen aus drei Domänen, wobei die hydrophile Domäne I die Bindestelle für NAD(H) besitzt und die Domäne III die Bindestelle für NADP(H) trägt. Die hydrophobe Domäne II umfasst den Protonenkanal. (Bizouarn *et al.*, 1996; Rydstrom *et al.*, 1998; Bizouarn *et al.*, 2002).

Um die Bedeutung der Transhydrogenase in *G. oxydans* 621H zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Domäne I deletiert (s.III.1.5.1). Dabei wurden unterschiedliche Wachstumsversuche mit der Transhydrogenase-Mutante durchgeführt. Verwendet wurden verschiedene Medien mit unterschiedlichen Substraten als Kohlenhydrat-Quelle (s.III.1.5.2). Der anschließende Vergleich mit dem Wildtyp zeigte unter den getesteten Bedingungen entgegen unseren Erwartungen keine Unterschiede. Somit konnte, die in der Literatur beschriebene Bedeutung der Transhydrogenase für *G. oxydans* nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich wird NADP(H) in *G. oxydans* auf mehreren verschiedenen Wegen regeneriert. Für die Regeneration von NADP(H) besitzt *G. oxydans* weitere Möglichkeiten. Zum Beispiel kann *G. oxydans* aufgrund

seiner unvollständigen Glykolyse Glucose z.B. über den PPW abbauen, dadurch entsteht mit Hilfe der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase NADP(H). Des Weiteren wird dieser Kofaktor durch die im Cytoplasma stattfindenden unvollständigen Oxidationen gebildet. Beteiligt an solchen Reaktionen ist z.B. die NADP-abhängige Glucose-Dehydrogenase (Pronk, 1989). Somit scheint NADP(H) nicht der limitierender Faktor zu sein, sondern eher muss *G. oxydans* über die Möglichkeit verfügen NADP zu regenerieren. Eine Möglichkeit dafür basiert auf der Umsetzung von Ketogluconaten zu Gluconat. Dabei wird Glucose durch die membranständige Gluconat-Dehydrogenase zu Ketogluconat oxidiert und anschließend durch die cytoplasmatische Ketogluconat-Reduktase zu Gluconat reduziert, wodurch NADP regeneriert wird (Olijve and Kok, 1979).

Ein anderer Mechanismus beschreibt die zyklische Regeneration von NADP durch das Zusammenwirken von der D-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, *Old Yellow Enzyme* (OYE) und der Katalase (Adachi *et al.*, 1979)(Abb.IV.3). Die OYE wurden als erstes in Hefezellen entdeckt (Warburg and Christian, 1933) und besitzen eine NADPH Oxidase Aktivität. Dabei wird das NADPH durch das oxidierte OYE unter Sauerstoffzufuhr zu NADP und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches mit Hilfe der Katalase zu H₂O und Sauerstoff katalysiert wird (Abb.IV.6).

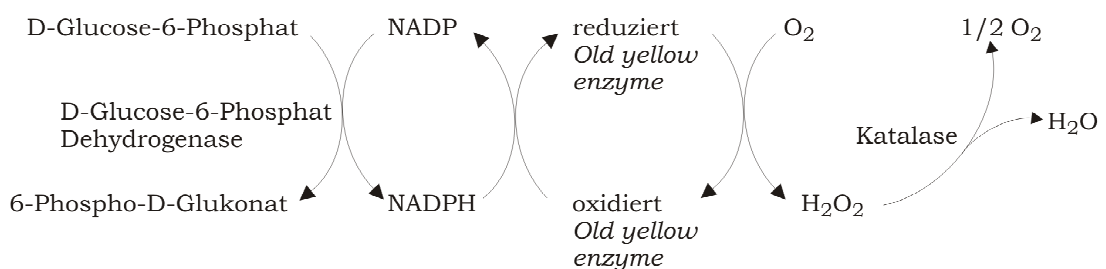


Abb.IV.6: Vorschlag zur Regeneration von NADP. Verändert nach Adachi *et al.* 1979

Eine weitere Möglichkeit die Balance zwischen den beiden Kofaktoren aufrecht zu erhalten, ist eine duale NAD/NADP Coenzym-Spezifität

der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus dem PPW (Tonouchi *et al.*, 2003). Dadurch kann sowohl NADPH als auch NADH entstehen.

4. Entner-Doudoroff-Weg

Der Entner-Doudoroff-Weg (ED) ist eine Alternative zur Glykolyse und trägt durch den Abbau von Zuckern zur Energiegewinnung und zur Versorgung mit NADPH bei. Als erstes wurde er in *Pseudomonas saccharophila* entdeckt (Entner and Doudoroff, 1952) und bisher tritt der ED-Weg am häufigsten in Gram-negativen Bakterien auf (Conway, 1992). In Säugetieren fehlt er gänzlich. Frühere Untersuchungen zeigten, dass der ED-Weg in Zellulose produzierenden *Acetobacter* und in *Gluconobacter* sp. Stämmen aktiv ist (Kerstens and De Ley, 1968). Durch die Genomanalyse konnten alle Gene für den ED-Weg in *G. oxydans* 621H identifiziert werden (Prust *et al.*, 2005). Neuere Studien belegen, dass der Glucose-Abbau in mehreren phylogenetisch unterschiedlichen Bakterien hauptsächlich durch den ED-Weg verläuft. Darunter befinden sich *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis*, *Paracoccus versutus* und Pseudomonaden (Fuhrer *et al.*, 2005).

In der Zelle wird Glukonat mit Hilfe einer Glukonat-Kinase zu 6-Phosphogluconat phosphoryliert, welches dann entweder durch den PPW oder den ED-Weg geschleust wird. Im ED-Weg entsteht durch die 6-Phosphogluconat-Dehydratase 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat. Dieses charakteristische Zwischenprodukt wird mit Hilfe der KDPG-Aldolase weiter zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat gespalten.

Um näheres über den ED-Weg in *G. oxydans* zu erfahren, wurden in dieser Arbeit sowohl die 6-Phosphogluconat-Dehydratase als auch die KDPG-Aldolase deletiert (s.III.2.1 / s.III.2.2.1). Anschließend

wurden unterschiedliche Wachstumsversuche durchgeführt (s.III.2.1.1 / s.III.2.2.2).

Einer der zentralen Verbindungen des ED-Weges ist das Glukonat. Deshalb wurden zuerst Wachstumsversuche auf diesem Substrat durchgeführt (s.III.2.1.1.1 / s.III.2.2.2.1). Wie zu erwarten, waren sowohl die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase Mutante als auch die KDPG-Aldolase Mutante nicht mehr in der Lage auf Glukonat zu wachsen. Damit konnte die Notwendigkeit des ED-Weges für den Abbau von Glukonat in *G. oxydans* belegt werden. Ebenso zeigten Versuche in *E. coli*, dass der ED-Weg für den Abbau von Glukonat benötigt wird (Chang *et al.*, 2004; Fuhrer *et al.*, 2005).

Aber warum kann *G. oxydans* nicht mehr in Glukonat-Medium wachsen, wenn der ED-Weg defekt ist? Einen Einblick darüber schafft eine genaue Betrachtung, wie *G. oxydans* Glukonat verstoffwechselt.

Er kann das Glukonat durch seine membranständigen Dehydrogenasen weiter zu 2-Ketoglukonat oder 5-Ketoglukonat umwandeln, dabei werden weniger Elektronen in die Atmungskette eingeschleust als z.B. beim Wachstum auf Glukose. Anschließend könnte *G. oxydans* 2-Ketoglukonat und 5-Ketoglukonat in die Zelle aufnehmen und durch Reduktasen wieder zu Glukonat umwandeln, wobei NADPH verbraucht würde, welches *G. oxydans* für den Aufbau von Biomasse benötigt. Eine andere Möglichkeit wäre der Transport von Glukonat in die Zelle mit Hilfe einer Glukonat Permease, welche im Genom von *G. oxydans* 621H mit Gox2188 annotiert wurde. Anschließend müsste das Glukonat in den PPW oder in den ED-Weg eingeschleust werden. Fehlt der ED-Weg in *G. oxydans*, fällt eine wichtige Möglichkeit weg ATP zu bilden und Kohlenstoff in den Zentralstoffwechsel einzuschleusen, somit würde es zu einem Stillstand des Wachstums kommen.

Eine weitere interessante Beobachtung der 6-Phosphoglukonat-Dehydratase Mutante zeigte sich beim Wachstum in Mannitol-Vollmedium. Dabei erreichte die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase

Mutante überraschenderweise eine wesentliche höhere End-OD als der WT (s.III.2.1.1.1), wohingegen sich die KDPG-Aldolase-Mutante wie der WT verhielt (s.III.2.2.2.1). Gründe hierfür können sein, dass sowohl der PPW als auch der KDPG-Weg in *G. oxydans* durch die Modifikation der Enzymaktivität reguliert werden. Ein Beispiel dafür ist die Enzymhemmung beider Stoffwechselwege durch entstehende Folgeprodukte beim Glukonatabbau (Godjevargova *et al.*, 2004; Velizarov und Beschkov, 1998). Insbesondere werden die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase (Meloche und Wood, 1964; Robin und Kepes, 1975; Peekhaus *et al.*, 1998), die 6-Phosphoglukonat-DH (Moritz *et al.*, 2000) und die Phosphoglukose-Isomerase (Takama und Nosoh, 1982) in verschiedenen Organismen auf diese Weise reguliert. In der 6-Phosphoglukonat-Dehydratase Mutante wird kein KDPG mehr gebildet, dadurch wird die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase nicht mehr gehemmt und der PPW kann Glukonat schneller verstoffwechseln und bildet somit mehr Pentosen und Reduktionsäquivalente. Die KDPG-Aldolase Mutante kann weiter mit Hilfe der 6-Phosphoglukonat-Dehydratase KDPG bilden, welches inhibierend auf die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase wirkt. Daher ähnelt das Wachstumsverhalten der KDPG-Aldolase Mutante in Mannitol-Vollmedium dem des WT und nicht dem der 6-Phosphoglukonat-Dehydratase Mutante.

5. Die Wirkung von Ribose auf *G. oxydans*

In einem anderen Experiment wurde eine interessante Beobachtung bei der Zugabe von Ribose ins Vollmedium festgestellt. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Stämmen, dass durch die Zugabe von 10 mM Ribose ins Mannitol-Medium das Wachstum inhibiert wurde (s.III.2.1.1.3). Ebenso wurde diese Inhibierung nicht nur in unterschiedlichen Stämmen, sondern auch bei verschiedenen Mannitol-Konzentrationen beobachtet (s.III.2.1.1.3).

Ein Grund weshalb Ribose inhibierend auf die Zelle wirkt, könnten Glykierungen sein. Dabei sei anzumerken, dass Ribose in der Lage sein sollte durch ABC-Transporter in die Zelle zu gelangen, wobei diese Transporter in einem Cluster (Gox2218-Gox2221) angeordnet sind. Neben den Genen des ABC-Transporters befinden sich außerdem die Gene für die ersten Schritte der Riboseverwertung (Prust, 2004).

Die Glykolierung ist ein Prozess, bei dem Kohlenhydratgruppen an Proteine oder Lipide ohne Beteiligung von Enzymen gehängt werden. Diese Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren wurde nach L.C. Maillard benannt, der sich erstmals 1912 mit der Umsetzung dieser Art befasste. Diese Maillard-Reaktion wurde *in vivo* an der nichtenzymatischen Fruktosylierung des Hämoglobins nachgewiesen. Als Folgeprodukte der Fruktosylierung von Proteinen werden sogenannte *advanced glycosylation end products* (AGE) und Carboxymethyllysine gebildet (Koenig *et al.*, 1976). Ebenso konnte für einige Zucker wie Ascorbate (Dunn *et al.*, 1990), Dihydroxyacetonphosphate (Hamada *et al.*, 1996), Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Deoxyglucoson (Thornalley *et al.*, 1999) eine autoxidative Glykierungen von Proteinen *in vivo* beobachtet werden. Ebenfalls wurden für Ribose Glykierungen nachgewiesen, dabei konnte eine sehr schnelle Transformation von Bovine Serum Albumin (BSA) zu zwei *advanced glycosylation end products*, dem Pentosidin und Carboxymethyllysine, beobachtet werden (Khalifah *et al.*, 1996). Gerade durch die schnelle Transformation von Ribose, wird dieser als ein sehr reaktiver vorkommender Zucker betrachtet (Khalifah *et al.*, 1996).

Eine berechtigte Frage ist, warum sollten die Glykolierungen in *G. oxydans* für Ribose spezifisch sein? Glykolierungen werden ebenso von anderen Zuckern verursacht und *G. oxydans* kann sehr gut in hochkonzentrierten Zuckerlösungen wachsen. In diesem Experiment wurde ein Vollmedium mit Mannitol als Kohlenhydrat-Quelle verwendet. Ribose gehört zu den Pentosen und ist somit ein kleineres

Moleküle als Mannitol (Hexose), Di- oder Oligosaccharid und dadurch wirkt es reaktiver als die größeren Moleküle (Khalifah *et al.*, 1996). Außerdem werden die meisten Zuckern in der Umgebung von *G. oxydans* gleich durch membranständige Dehydrogenasen oxidiert und somit gelangt nur ein bestimmter Prozentsatz der Zucker die Glykolierungen verursachen könnten in die Zelle. Anscheinend ist *G. oxydans* nicht in der Lage Ribose durch membranständige Dehydrogenase zu oxidieren. Diese Vermutung stützt sich auf das Wachstumsverhalten von *G. oxydans* im Ribose-Vollmedium. Die durchgeführten Wachstumsversuche mit *G. oxydans* 621H mit 50 mM Ribose als auch 100 mM Ribose als Kohlenhydrat-Quelle zeigten so gut wie kein Wachstum (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte für die Pentose Xylose Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit scheint es, dass Ribose nicht durch membranständige Dehydrogenase oxidiert wird und keine Elektronen in die Atmungskette einschleußen kann. Anscheinend wird Ribose vollständig in die Zelle aufgenommen, wobei eine erhöhte Konzentration von Ribose in der Zelle anschließend zu Glykolierungen führt.

Die Auswirkungen von Glykolierungen sind umfangreich. Diese Maillard-Reaktion wurde ebenso an den Aminogruppen von Nukleinsäuren und an Lipiden entdeckt, wobei wieder Carbonylverbindungen entstehen (Bucala *et al.*, 1984; Bucala *et al.*, 1993). Diese Glykierungen an der DNA destabilisieren die glykosidische Bindungen, wodurch das Deoxyribose-Phosphat Rückgrat aufgebrochen wird (Seidel and Pischetsrieder, 1998; Pischetsrieder *et al.*, 1999). Des Weiteren können durch die Glykierungen Nukleotide miteinander verbunden werden (Kasai *et al.*, 1998). Solche Veränderungen der DNA beeinträchtigen deren biologische Funktion und können zu Mutationen führen. Weitere Studien konnten Glykierungen auch in *E. coli* nachweisen, sowohl für Proteine als auch auf der DNA-Ebene (Mironova *et al.*, 2001; Mironova *et al.*, 2003; Mironova *et al.*, 2005). Dabei zeigte sich, dass

die DNA-Glykierung in *E. coli* abhängig von der Wachstumsphase ist. Die Glykierungen in der exponentiellen Phase sind geringer, was mit der intensiven *de novo* DNA-Synthese in Zusammenhang steht, wohingegen sie in der stationären Phase wieder zunehmen (Mironova *et al.*, 2005). Diese Beobachtung korreliert mit der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Es wurde beobachtet, dass *G. oxydans* in der Übergangsphase bzw. in der stationären Phase schlechter wächst, wenn Ribose im Medium vorhanden ist, was auf eine stärkere Glykierung in der stationären Phase hindeuten könnte (s.III.2.1.1.3). Waris *et al.* konnten die Reaktivität von Ribose mit DNA *in vitro* belegen. Sie führten Untersuchungen mit Hering-Sperma-DNA durch. Bei der Zugabe von Ribose kam es zu einer Zunahme von N²-Carboxyethyl-2-Deoxyguanosin, was zu DNA-Strangbrüchen führte. Wurde Ribose aus dem Reaktionsgemisch entfernt, kam es zu keiner weiteren Zunahme dieser Carbonylverbindung (Waris *et al.*, 2010).

6. Transkriptionsanalyse einer Wachstumskurve von *G. oxydans*

G. oxydans unterliegt in seinen natürlichen Habitaten einem ständigen Wechsel des Nährstoffangebotes sowie verschiedensten Stresssituationen wie Temperaturschwankungen, pH-Änderungen und wechselnde osmotische Bedingungen. Bakterien adaptieren sich meist durch regulatorische Netzwerke der Genexpression hervorragend an die Veränderungen der Wachstumsbedingungen. Eine schnelle Anpassung der Wachstumsgeschwindigkeit an das jeweilige Habitat ist eine Grundlage der Adaptation.

Bisherige Transkriptionsanalysen zeigten in *G. oxydans* 621H keine nennenswerten regulatorische Unterschiede beim Wachstum auf verschiedene Zuckern (Hoffmeister, 2006). Ein anderer Versuchsansatz um regulatorische Netzwerke zu entdecken wurde in dieser Arbeit durchgeführt, indem die unterschiedlichen Wachstumsphasen miteinander verglichen wurden. Dazu wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Wachstumskurve

untersucht (s.III.3.1). Dabei wurde die logarithmischen Phase mit der stationären Phase verglichen. Als Referenz dienten Proben aus einer kontinuierlichen Kultur. Diese Kultur befand sich zwischen der logarithmischen Phase und stationären Phase. Da weniger regulatorische Unterschiede zwischen der kontinuierlichen Kultur und der stationären Phase im Microarray beobachtet wurden, ähnelt diese sogenannte Übergangsphase in ihrer Regulation eher der stationären Phase.

Es konnte gezeigt werden, dass in der logarithmischen Phase die Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, stärker transkribiert werden als in der stationären Phase (s.III.3.2.1). Die Ribosomen bestehen aus stabilen RNAs Elementen, den sogenannten rRNAs und müssen somit nicht translatiert werden. Das die ribosomalkodierenden Gene stärker in der logarithmischen- als in der stationären Phase transkribiert werden, entspricht den Erwartungen, da die Bildung von Ribosomen eng am Zellwachstum verknüpft sind. Ebenso konnte diese Beobachtung in *E. coli* Zellen festgestellt werden. Dabei zeigten die Experimente bei verschiedenen Wachstumsraten auch unterschiedliche Geschwindigkeiten der Proteinbiosynthese (Tao *et al.*, 1999). Im Jahr 1958 wurde bereits das Zusammenspiel zwischen dem Vorhandensein von Makromolekülen in der Zelle zu der Wachstumsrate entdeckt (Schaechter *et al.*, 1958). Dabei zeigte sich, dass schneller wachsende Zellen proportional mehr stabilere RNAs-rRNA und tRNA enthalten. Der Grund hierfür ist einfach, da schneller wachsende Zellen ihre Proteine schneller synthetisieren müssen, dadurch wird die Anzahl an Ribosomen und die Konzentration an translationsbestimmenden Faktoren erhöht (Bremer and Dennis, 1996).

Die Wachstumsrate ist unmittelbar abhängig von der Proteinbiosynthesekapazität der Zelle und entspricht der Anzahl der Verdopplungen pro Stunde, welche durch die Menge an Ribosomen in einer Zelle beeinflusst wird. Daher ist schnelles Wachstum mit einer hohen Anzahl von Ribosomen verbunden. Bei optimalen

Wachstumsbedingungen kann die Menge an Ribosomen bis zu 70.000 je Zelle erreicht werden (Gourse *et al.*, 1996). Allerdings ist die Synthese der Ribosomen ein sehr energieaufwendiger Prozess und verlangt eine bestmögliche Adaption an die Wachstumsrate. Erreicht wird diese Anpassung durch die Synthese der ribosomalen RNAs, welche proportional zum Quadrat der Wachstumsrate steigt (Gausing, 1977).

Die Gene, die für ribosomale RNAs kodieren, liegen meist in Operons, wobei die Anzahl der Operons je nach Organismus unterschiedlich ist. Allerdings sind die Operonstrukturen für den jeweiligen Organismus konserviert. Die Anzahl der Operons variiert dabei stark, bei Eukaryonten können bis zu mehrere hundert rRNA-Transkriptionseinheiten vorkommen (Long and Dawid, 1980), während in Bakterien 1 bis 15 Kopien üblich sind (Hui and Dennis, 1985; LaFauci *et al.*, 1986; Schmidt, 1997). So besitzt *E. coli* 7, *Bacillus subtilis* 10, *Haemophilus influenzae* 6, *Vibrio cholerae* 8 und *G. oxydans* 4 ribosomale Operons, die für ribosomale RNAs kodieren. Die unterschiedliche Anzahl von ribosomalen Operons könnte einen großen Beitrag an den hohen Transkriptionsraten beisteuern. Condon *et al.* zeigten 1995 durch Inaktivierung einzelner ribosomaler *E. coli* RNA Operons, dass 5 Operons für optimales Zellwachstum notwendig sind, während alle sieben Operons für eine schnelle Anpassung an wechselnde Nährstoff- und Temperaturbedingungen benötigt werden (Condon *et al.*, 1995).

Alle gemachten Transkriptionsanalysen basieren auf Microarrays mit PCR-Produkten, die sehr anfällig für eine längere Lagerung sind. Durch eine längere Lagerung der Microarray-Chips kam es zu einem starken Hintergrund, wodurch nur Teile des Genoms miteinander verglichen werden konnte.

In diesem Zusammenhang bleibt anzumerken, dass die Chip Technologie eine hochsensitive Methode ist und die kleinsten Abweichungen in der Zusammensetzung der verwendeten Lösungen,

Medien oder des Zellmaterials zu starken Schwankungen in den Ergebnissen führt (Lee *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2003).

7. Annotation

In dieser Arbeit wurde *G. oxydans* DSM3504 annotiert und mit dem Stamm *G. oxydans* 621H verglichen. Allgemein sind die beiden Stämme sich sehr ähnlich. *G. oxydans* DSM3504 besitzt alle Gene der Zentralstoffwechselwege wie sie auch in *G. oxydans* 621H enthalten sind. Allerdings konnten in *G. oxydans* DSM3504 im Gegensatz zu *G. oxydans* 621H keine Plasmide identifiziert werden, daher besitzt *G. oxydans* DSM3504 auch weniger ORFs als *G. oxydans* 621H.

Im Anhang befinden sich die Tabelle mit den unterschiedlichen ORFs welche in *G. oxydans* DSM3504 enthalten sind, aber nicht in *G. oxydans* 621H vorkommen.

Auffällig war, dass *G. oxydans* DSM3504 ein Gen für eine zusätzliche dritte Triosephosphat-Isomerase besitzt. Triosephosphat-Isomerasen (TPI) katalysieren die reversible Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) und Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP). Diese Aktivität macht dieses Enzym zu einem Schlüsselenzym des Zentralstoffwechsels und spielt somit eine Rolle in der Glykolyse, Glukoneogenese, PPW und im ED-Weg. Ein Mangel an TPI im Menschen wird assoziiert mit hämolytischer Anämie und ist an mehrere neurologische Erkrankungen gekoppelt (Olah *et al.*, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass in *Sinorhizobium meliloti*, welches keine intakte Glykolyse oder Glukoneogenese aufweist, Glukose hauptsächlich durch den ED-Weg abgebaut wird (Gosselin *et al.*, 2001; Fuhrer *et al.*, 2005). Dabei wurde bestätigt, dass einiges vom gebildeten Glycerinaldehyd-3-Phosphat wieder zurück in höhermolekulare Komponenten C6-Körper umgewandelt wird und somit einen zyklischen Kreislauf bildet. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Triosephosphat-Isomerase und Fruktosebisphosphat

Aldolase (FBA). Die FBA benötigt G3P und DHAP als Substrat, daher ist die Umwandlung von G3P und DHAP notwendig für den zyklischen Metabolismus (Poysti and Oresnik, 2007). In über 78 Organismen wurden mehr als ein *tpi*-Gen gefunden, was zeigt, dass mehrere *tpi*-Gene keine Seltenheit sind. In *Sinorhizobium meliloti* wurden zwei *tpi*-Gene mit unterschiedlichen Funktionen entdeckt. Das *tpiA* Gen wird konstitutiv exprimiert und spielt wahrscheinlich eine aktive Rolle an der Glukoneogenese. Dagegen wird *tpiB* für den Erythritol Katabolismus benötigt, wobei *tpiA* nicht die Funktion von *tpiB* übernehmen kann (Poysti and Oresnik, 2007). In *Klebsiella pneumoniae* wurden ebenso zwei *tpi*-Gene gefunden. Dabei zeigte sich bei der Deletion von *tpi1* ein schlechteres Wachstum auf Glukose und Glycerol gegenüber dem Wildtyp. Diesem Phänotyp konnte mit Hilfe der Überexpression von *tpi2* entgegengewirkt werden (Zheng *et al.*, 2006). Welchen genauen Nutzen die zusätzliche TPI in *G. oxydans* DSM3504 hat, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Eine weitere Auffälligkeit in *G. oxydans* DSM3504 war eine zusätzliche Kopie des Gens, welches für die NADH-Dehydrogenase vom Typ II kodiert. Durch die Überexpression des Gens in *G. oxydans* 621H konnte die End-OD dieses Stammes erhöht werden, wodurch sich die End-OD der von *G. oxydans* DSM3504 annäherte. Allerdings konnte keine Erhöhung der End-OD festgestellt werden, wenn das Gen als eine einzelne Kopie in das *upp*-Gen integriert wurde. Dieser Effekt kann durch mehrere Möglichkeiten verursacht worden sein. Einmal, ist die Anzahl des integrierten Gens mit 1-3 Kopien höher beim *low-copy* Plasmid pBBR1-MCS2 als bei einer Einzelintegration des Gens in das *upp*-Gen. Zum Anderen kann ein polarer Effekt auf das integrierte Gen wirken, da das Gen für die Transhydrogenase in der entgegengesetzten Richtung des *upp*-Gens liegt. Dadurch kann das Ablesen im Bereich des *upp*-Gens die Transkription des Gens für die NDH-2 stören. Hier könnte durch das Einfügen einer Terminatorsequenz in dem Bereich vor dem *upp*-Gen das weitere Ablesen in Richtung des Gens für die NDH-2 verhindert werden.

Weshalb kommt es zu einer erhöhten End-OD in *G. oxydans* 621H, wenn das Gen für die NDH-2 aus dem Stamm *G. oxydans* DSM3504 exprimiert wird? Dazu sollte ein Einblick über die Funktion einer NDH Aufschluß geben. Es gibt zwei Typen von NADH-Dehydrogenasen: eine Protonen-pumpende NADH-Dehydrogenase (NDH-1) und eine nicht Protonen-pumpende NADH-Dehydrogenase II (NDH-2). NDH-1 besteht aus mehreren Untereinheiten und enthält FMN und mehrere Eisen-Schwefel Cluster als prosthetische Gruppen (Yagi, 1986), wohingegen die meisten NDH-2 FAD als prosthetische Gruppe besitzen und keine Eisen-Schwefel Cluster. Es gibt viele Mikroorganismen, die eine NDH-2 besitzen (Yagi, 1991), allerdings sind bisher nur wenige isoliert und detailliert untersucht worden. In *E. coli* konnte als erstes die Aktivität von zwei NADH-Dehydrogenasen nachgewiesen werden (Bragg and Hou, 1967), welche sich als NDH-1 und NDH-2 Aktivität erwies. Des Weiteren wurde die Anwesenheit der NDH-2 nicht nur in Bakterien, sondern auch in Eukaryonten wie *S. cerevisiae* (de Vries and Grivell, 1988) und in Pflanzen (Palmer *et al.*, 1982) nachgewiesen. Die physiologische Rolle von NDH-2 ist vom Organismus abhängig und nicht immer eindeutig. Allerdings sind einige unterschiedliche Funktionen der NDH-2 bekannt. In Organismen, in welchen NDH-2 das einzige oxidierende NADH Enzym ist, ist die Hauptfunktion die Verlinkung zur Atmungskette und somit die Umsetzung von NADH, dabei begleitend wird ATP gebildet (Melo *et al.*, 2004). Der Schimmelpilz *Neurospora crassa* besitzt als einzige NDH eine NDH-2. Diese ist verantwortlich für die Oxidation von NADH in der Atmungskette und übernimmt dadurch die Funktion einer NDH-1 (Duarte *et al.*, 2003). In *Bacillus subtilis* sowie in *Zymomonas mobilis* konnte gezeigt werden, dass die NDH-2 die Aufgabe der NDH-1 übernehmen kann (Bergsma *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1995).

Existiert eine NDH-2 zusammen mit einer NDH-1, spielt sie wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Ausgleich des [NADH]/[NAD]-Verhältnis (Melo *et al.*, 2004). Außerdem kann das Expressionsniveau

von den NDH-2 Wachstumsphasen abhängig sein. In *E. coli*, welches beide NDH besitzt, ist die NDH-2 in der exponentiellen Phase die vorherrschende Dehydrogenase und in den restlichen Perioden die NDH-1 (Green *et al.*, 1997; Wackwitz *et al.*, 1999). Dabei wird NDH-2 durch den Transkriptionsfaktor Fis reguliert, welcher an drei Stellen des *ndh-2*-Promotors binden kann (Jackson *et al.*, 2004). Zusätzlich wird während der Nitrat-Atmung die NDH-2 bevorzugt, während NDH-1 bei der Fumarat-Atmung die primäre Funktion übernimmt (Tran *et al.*, 1997). Außerdem wurde berichtet, dass in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen das *ndh-2* Gen reprimiert wird (Spiro *et al.*, 1989; Spiro and Guest, 1990). Das aerobe Stickstoff-fixierende Bakterium *Azotobacter vinelandii* beschützt mit Hilfe der NDH-2 die Nitrogenase vor der Sauerstoff-Inhibierung durch die schnelle Zunahme seiner Atmung (Bertsova *et al.*, 2001). Dabei wird NDH-2 mit der Zunahme der Sauerstoff-Konzentration oder in Abwesenheit von NH_4 im Medium induziert (Bertsova *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte in *Methylococcus capsulatus* der Elektronentransfer zwischen der NDH-2 zu der membrangebundenen Methan-Monooxygenase nachgewiesen werden (Cook and Shiemke, 2002).

Eine mögliche Erklärung warum die Expression der *ndh-2* aus *G. oxydans* DSM3504 eine höhere End-OD in *G. oxydans* 621H bewirkt, könnte die effektivere NADH-Umsetzung in der Atmungskette sein. In *Corynebacterium glutamicum* konnte bei der Überexpression der NDH-2 eine signifikante höhere Oxidation von NADH und NADPH in der Membranfraktion gegenüber dem WT beobachtet werden. Allerdings zeigte der Stamm im Glukose-Minimalmedium ein schlechteres Wachstum als der WT. Überraschend war, dass eine Deletion des *ndh-2* Gens in *C. glutamicum* keinen Effekt gegenüber dem WT im Minimalmedium zeigte (Nantapong *et al.*, 2004; Nantapong *et al.*, 2005). Um mehr über die genaue physiologische Rolle der NDH-2 in *G. oxydans* DSM3504 zu erfahren, müssen weitere Experimente folgen, wie z.B.

die Messung der Enzymaktivität und die Deletion der NDH-2 in *G. oxydans* DSM3504.

V. Zusammenfassung

Essigsäurebakterien besitzen einen interessanten aeroben Energiestoffwechsel mit membranständigen Dehydrogenasen, der im Grundsatz relativ gut untersucht ist. Im Gegensatz dazu ist der cytoplasmatische Zentralstoffwechsel noch nicht ausreichend charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit sollte die Methodik der genetischen Modifikation von Essigsäurebakterien verbessert und durch gezielte Geninaktivierung im Genom von *Gluconobacter oxydans* die Rolle ausgewählter Stoffwechsellzyme und des Entner-Doudoroff-Weges für dieses Bakterium analysiert werden.

Basierend auf der Gegenselektion mit 5-Fluorouracil wurde für *G. oxydans* 621H sowie für *G. oxydans* DSM7145 ein *upp*-basiertes, markerfreies Deletionssystem etabliert. Ebenso konnte für die Integration von Genen ins Chromosom von *G. oxydans* 621H eine neue Strategie entwickelt werden. Die ebenfalls den Gebrauch von 5-Fluorouracil beinhaltet.

Mittels der *upp*-basierten markerfreien Deletionsmethode wurde in *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM7145 das Gen für die Transhydrogenase deletiert. In den beiden Transhydrogenase-Mutanten wurden keine Veränderungen des Phänotyps beim Wachstum auf den getesteten Substraten Mannitol, Glycerin, Sorbitol, Erythritol und Gluconat beobachtet. Somit konnte die in der Literatur beschriebene Bedeutung der Transhydrogenase für *G. oxydans* nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich wird NADP(H) in *G. oxydans* auf anderen Wegen regeneriert. Ebenso konnte für eine *G. oxydans* 621H Mutante in der cytoplasmatischen, putativen Polyol-Dehydrogenase kein Unterschied beim Wachstum auf den genannten Medien gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnten andere Enzyme mit einer Polyol-Dehydrogenase-Funktion sein, welche den Verlust kompensieren könnten.

Bei der Untersuchung des Entner-Doudoroff Wegs stellte sich heraus, dass die konstruierten 6-Phosphogluconat-Dehydratase- und KDPG Aldolase Mutanten nicht mehr in der Lage waren auf Glukonat zu wachsen. Somit konnte die Notwendigkeit des ED-Weges für den Abbau von Glukonat in *G. oxydans* belegt werden.

Des Weiteren konnte eine erhöhte OD der 6-Phosphogluconat-Dehydratase-Mutante in Vollmedium mit Mannitol und Glycerin als Kohlenstoffquelle beobachtet werden. Außerdem wurde festgestellt, dass die Zugabe von Ribose einen inhibitorischen Effekt sowohl in der 6-Phosphogluconat-Dehydratase-Mutante als auch im Wildtyp ausübt.

Die Transkriptionsanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten entlang einer Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H zeigte eine starke Regulation von ribosomalen Genen in der logarithmischen Phase. Das entsprach den Erwartungen, da die Bildung von Ribosomen eng am Zellwachstum verknüpft ist.

Schließlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Annotation des Genoms von *G. oxydans* DSM3504 nach dessen Sequenzierung durch das Göttinger Genomanalyselabor (G2L) durchgeführt. Beim Vergleich der beiden Stämme *G. oxydans* DSM3504 und *G. oxydans* 621H zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der identifizierten offenen Leserahmen (ORFs). Eine Besonderheit von *G. oxydans* DSM3504 war das Vorhandensein einer weiteren NADH-Dehydrogenase vom TypII. Deren Überexpression in *G. oxydans* 621H führte zu einer höheren End-OD des Stammes in Vollmedium und näherte sich somit an die End-OD von *G. oxydans* DSM3504 an. Das deutet darauf hin, dass eine zusätzliche Kopie der NADH-Dehydrogenase vom TypII das Wachstum in *G. oxydans* fördert.

VI. Literaturverzeichnis

Adachi, O., K. Matsushita, E. Shinagawa and M. Ameyama (1979). Occurrence of old yellow enzyme in *Gluconobacter suboxydans*, and the cyclic regeneration of NADP. *J Biochem* **86**(3): 699-709.

Althage, M., T. Bizouarn, B. Kindlund, J. Mullins, J. Alander and J. Rydstrom (2004). Cross-linking of transmembrane helices in proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Escherichia coli*: implications for the structure and function of the membrane domain. *Biochim Biophys Acta* **1659**(1): 73-82.

Ansorge, W., B. Sproat, J. Stegemann, C. Schwager and M. Zenke (1987). Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **15**(11): 4593-4602.

Arsene-Ploetze, F., H. Nicoloff, B. Kammerer, J. Martinussen and F. Bringel (2006). Uracil salvage pathway in *Lactobacillus plantarum*: Transcription and genetic studies. *J Bacteriol* **188**(13): 4777-4786.

Battey, A. S. and D. W. Schaffner (2001). Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *J Appl Microbiol* **91**(2): 237-247.

Bergsma, J., M. B. Van Dongen and W. N. Konings (1982). Purification and characterization of NADH dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **128**(1): 151-157.

Bertsova, Y. V., A. V. Bogachev and V. P. Skulachev (1998). Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. *Biochim Biophys Acta* **1363**(2): 125-133.

Bertsova, Y. V., A. V. Bogachev and V. P. Skulachev (2001). Noncoupled NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *J Bacteriol* **183**(23): 6869-6874.

Bizouarn, T., M. Althage, A. Pedersen, A. Tigerstrom, J. Karlsson, C. Johansson and J. Rydstrom (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**(1-3): 122-127.

Bizouarn, T., C. Diggle, P. G. Quirk, R. L. Grimley, N. P. Cotton, C. M. Thomas and J. B. Jackson (1996). Interaction of nucleotides with the NAD(H)-binding domain of the proton-translocating

transhydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. J Biol Chem **271**(17): 10103-10108.

Bizouarn, T., L. A. Sazanov, S. Aubourg and J. B. Jackson (1996). Estimation of the H⁺/H⁻ ratio of the reaction catalysed by the nicotinamide nucleotide transhydrogenase in chromatophores from over-expressing strains of *Rhodospirillum rubrum* and in liposomes inlaid with the purified bovine enzyme. Biochim Biophys Acta **1273**(1): 4-12.

Boeke, J. D., F. LaCroute and G. R. Fink (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol Gen Genet **197**(2): 345-346.

Boeke, J. D., J. Trueheart, G. Natsoulis and G. R. Fink (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. Methods Enzymol **154**: 164-175.

Boonstra, B., C. E. French, I. Wainwright and N. C. Bruce (1999). The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. J Bacteriol **181**(3): 1030-1034.

Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol **41**(3): 459-472.

Bragg, P. D. and C. Hou (1967). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidation in *Escherichia coli* particles. I. Properties and cleavage of the electron transport chain. Arch Biochem Biophys **119**(1): 194-201.

Bremer, H. and P. P. Dennis (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.: 1553-1569.

Bremus, C. (2006). Untersuchungen zur Bildung der Vitamin C-Vorstufe 2-Keto-L-Gulonsäure mit *Gluconobacter oxydans*.

Bucala, R., P. Model and A. Cerami (1984). Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A **81**(1): 105-109.

Buchert, J. and L. Viikari (1988). Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. Applied Microbiology and Biotechnology **29**: 375-379.

Chang, D. E., D. J. Smalley, D. L. Tucker, M. P. Leatham, W. E. Norris, S. J. Stevenson, A. B. Anderson, J. E. Grissom, D. C. Laux, P. S. Cohen and T. Conway (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7427-7432.

Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C., Bories, A. (1994). Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. Appl Microbiol Biotechnol **41**: 359-365.

Clarke, D. M., T. W. Loo, S. Gillam and P. D. Bragg (1986). Nucleotide sequence of the *pntA* and *pntB* genes encoding the pyridine nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*. Eur J Biochem **158**(3): 647-653.

Condon, C., C. Squires and C. L. Squires (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. Microbiol Rev **59**(4): 623-645.

Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol Rev **9**(1): 1-27.

Cook, S. A. and A. K. Shiemke (2002). Evidence that a type-2 NADH:quinone oxidoreductase mediates electron transfer to particulate methane monooxygenase in *Methylococcus capsulatus*. Arch Biochem Biophys **398**(1): 32-40.

De Ley, J., M. Gillis and J. Swings (1984). Genus *Gluconobacter*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. vol 1. Hrsg.: Krieg, N. R., Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore: 267-278.

de Vries, S. and L. A. Grivell (1988). Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. **176**: 377-384.

Deppenmeier, U. and A. Ehrenreich (2009). Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. J Mol Microbiol Biotechnol **16**(1-2): 69-80.

Deppenmeier, U., M. Hoffmeister and C. Prust (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Appl Microbiol Biotechnol **60**(3): 233-242.

Diggle, C., T. Bizouarn, N. P. Cotton and J. B. Jackson (1996). Properties of the purified, recombinant, NADP(H)-binding domain III of the proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Eur J Biochem **241**(1): 162-170.

Duarte, M., M. Peters, U. Schulte and A. Videira (2003). The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem J* **371**(Pt 3): 1005-1011.

Dugaiczyk, A., H. W. Boyer and H. M. Goodman (1975). Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**(1): 171-184.

Dunn, J. A., M. U. Ahmed, M. H. Murtiashaw, J. M. Richardson, M. D. Walla, S. R. Thorpe and J. W. Baynes (1990). Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry* **29**(49): 10964-10970.

Edwards, J. S. and B. O. Palsson (2000). The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5528-5533.

Fabret, C., S. D. Ehrlich and P. Noirot (2002). A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **46**(1): 25-36.

Figurski, D. H. and D. R. Helinski (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4): 1648-1652.

Fluckiger, J. and L. Ettliger (1977). Glucose metabolism in *Acetobacter aceti*. *Arch Microbiol* **114**(2): 183-187.

Forster, J., I. Famili, P. Fu, B. O. Palsson and J. Nielsen (2003). Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res* **13**(2): 244-253.

Fuhrer, T., E. Fischer and U. Sauer (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol* **187**(5): 1581-1590.

Gausing, K. (1977). Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J Mol Biol* **115**(3): 335-354.

Gillis, M. and J. de Ley (1980). Intra- and intergenic similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 7-27.

Goh, Y. J., M. A. Azcarate-Peril, S. O'Flaherty, E. Durmaz, F. Valence, J. Jardin, S. Lortal and T. R. Klaenhammer (2009).

Development and application of a *upp*-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* **75**(10): 3093-3105.

Gosselin, I., O. Wattraint, D. Riboul, J. Barbotin and J. Portais (2001). A deeper investigation on carbohydrate cycling in *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett* **499**(1-2): 45-49.

Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag, New York, NY.

Gourse, R. L., T. Gaal, M. S. Bartlett, J. A. Appleman and W. Ross (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **50**: 645-677.

Green, J., M. F. Anjum and J. R. Guest (1997). Regulation of the *ndh* gene of *Escherichia coli* by integration host factor and a novel regulator, *Arr. Microbiology* **143 (Pt 9)**: 2865-2875.

Gupta, A., V. K. Singh, G. N. Qazi and A. Kumar (2001). *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(3): 445-456.

Hamada, Y., N. Araki, N. Koh, J. Nakamura, S. Horiuchi and N. Hotta (1996). Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **228**(2): 539-543.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.

Hoek, J. B. and J. Rydstrom (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J* **254**(1): 1-10.

Hölscher, T. and H. Görisch (2006). Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol* **188**(21): 7668-7676.

Hölscher, T., U. Schleyer, M. Merfort, S. Bringer-Meyer, H. Görisch and H. Sahm (2009). Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**(1-2): 6-13.

Hölscher, T., D. Weinert-Sepalage and H. Görisch (2007). Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* **153**(Pt 2): 499-506.

- Hui, I. and P. P. Dennis (1985).** Characterization of the ribosomal RNA gene clusters in *Halobacterium cutirubrum*. *J Biol Chem* **260**(2): 899-906.
- Jackson, L., T. Blake and J. Green (2004).** Regulation of *ndh* expression in *Escherichia coli* by Fis. *Microbiology* **150**(Pt 2): 407-413.
- Kasai, H., N. Iwamoto-Tanaka and S. Fukada (1998).** DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis* **19**(8): 1459-1465.
- Katzen, F., A. Becker, M. V. Ielmini, C. G. Oddo and L. Ielpi (1999).** New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *Appl Environ Microbiol* **65**(1): 278-282.
- Kerstens, K. and J. De Ley (1968).** The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **34**(4): 393-408.
- Kerstens, K., W. A. Wood and J. Deley (1965).** Polyol Dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *J Biol Chem* **240**: 965-974.
- Khalifah, R. G., P. Todd, A. A. Booth, S. X. Yang, J. D. Mott and B. G. Hudson (1996).** Kinetics of nonenzymatic glycation of ribonuclease A leading to advanced glycation end products. Paradoxical inhibition by ribose leads to facile isolation of protein intermediate for rapid post-Amadori studies. *Biochemistry* **35**(15): 4645-4654.
- Kim, Y. J., K. B. Song and S. K. Rhee (1995).** A novel aerobic respiratory chain-linked NADH oxidase system in *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* **177**(17): 5176-5178.
- Kitos, P. A., C. H. Wang, B. A. Mohler, T. E. King and V. H. Cheldelin (1958).** Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* **233**(6): 1295-1298.
- Klasen, R., S. Bringer-Meyer and H. Sahm (1992).** Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce tartaric acid. *Biotechnol Bioeng* **40**(1): 183-186.
- Klasen, R., S. Bringer-Meyer and H. Sahm (1995).** Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate:NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol* **177**(10): 2637-2643.

Koenig, R. J., C. M. Peterson, R. L. Jones, C. Saudek, M. Lehrman and A. Cerami (1976). Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* **295**(8): 417-420.

Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd and K. M. Peterson (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**(1): 175-176.

Kristich, C. J., D. A. Manias and G. M. Dunny (2005). Development of a method for markerless genetic exchange in *Enterococcus faecalis* and its use in construction of a *srtA* mutant. *Appl Environ Microbiol* **71**(10): 5837-5849.

LaFauci, G., R. L. Widom, R. L. Eisner, E. D. Jarvis and R. Rudner (1986). Mapping of rRNA genes with integrable plasmids in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **165**(1): 204-214.

Lee, M. L., F. C. Kuo, G. A. Whitmore and J. Sklar (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9834-9839.

Leisinger, T. (1965). Untersuchung zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. II* **119**: 329-376.

Liang, M., A. G. Briggs, E. Rute, A. S. Greene and A. W. Cowley, Jr. (2003). Quantitative assessment of the importance of dye switching and biological replication in cDNA microarray studies. *Physiol Genomics* **14**(3): 199-207.

Long, E. O. and I. B. Dawid (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49**: 727-764.

Marmur, J. and P. O. Ts'O (1961). Denaturation of deoxyribonucleic acid by formamide. *Biochim Biophys Acta* **51**: 32-36.

Martinussen, J., P. Glaser, P. S. Andersen and H. H. Saxild (1995). Two genes encoding uracil phosphoribosyltransferase are present in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**(1): 271-274.

Martinussen, J. and K. Hammer (1994). Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **176**(21): 6457-6463.

Matsushita, K., T. Yakushi, H. Toyama, O. Adachi, H. Miyoshi, E. Tagami and K. Sakamoto (1999). The quinohemoprotein alcohol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* has ubiquinol oxidation activity at a site different from the ubiquinone reduction site. *Biochim Biophys Acta* **1409**(3): 154-164.

Melo, A. M., T. M. Bandejas and M. Teixeira (2004). New insights into type II NAD(P)H : quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 603-616.

Meloche, H. P. and W. A. Wood (1964). The Mechanism Of 6-Phosphogluconic Dehydrase. *J Biol Chem* **239**: 3505-3510.

Merfort, M., U. Herrmann, S. W. Ha, M. Elfari, S. Bringer-Meyer, H. Gorisch and H. Sahm (2006). Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol J* **1**(5): 556-563.

Mironova, R., T. Niwa, R. Dimitrova, M. Boyanova and I. Ivanov (2003). Glycation and post-translational processing of human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**(51): 51068-51074.

Mironova, R., T. Niwa, Y. Handzhiyski, A. Sredovska and I. Ivanov (2005). Evidence for non-enzymatic glycosylation of *Escherichia coli* chromosomal DNA. *Mol Microbiol* **55**(6): 1801-1811.

Mironova, R., T. Niwa, H. Hayashi, R. Dimitrova and I. Ivanov (2001). Evidence for non-enzymatic glycosylation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**(4): 1061-1068.

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

Nantapong, N., Y. Kugimiya, H. Toyama, O. Adachi and K. Matsushita (2004). Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**(2): 187-193.

Nantapong, N., A. Otofujii, C. T. Migita, O. Adachi, H. Toyama and K. Matsushita (2005). Electron transfer ability from NADH to menaquinone and from NADPH to oxygen of type II NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**(1): 149-159.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter (1990). Physiology of the bacterial cell. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.

Neuhard, J. (1982). Utilization of preformed pyrimidine bases and nucleosides, p.95-148. In A. Munch-Petersen (ed.), Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganism. Academic Press, London, United Kingdom.

Olah, J., F. Orosz, G. M. Keseru, Z. Kovari, J. Kovacs, S. Hollan and J. Ovadi (2002). Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. Biochem Soc Trans **30**(2): 30-38.

Olijve, W. and J. J. Kok (1979). An Analysis of the Growth of *Gluconobacter oxydans* in Chemostat Cultures Arch. Microbiol. **121**: 291-297.

Overbeek, R., N. Larsen, T. Walunas, M. D'Souza, G. Pusch, E. Selkov, Jr., K. Liolios, V. Joukov, D. Kaznadzey, I. Anderson, A. Bhattacharyya, H. Burd, W. Gardner, P. Hanke, V. Kapatral, N. Mikhailova, O. Vasieva, A. Osterman, V. Vonstein, M. Fonstein, N. Ivanova and N. Kyrpides (2003). The ERGO genome analysis and discovery system. Nucleic Acids Res **31**(1): 164-171.

Palmer, J. M., J. P. Schwitzguebel and I. M. Moller (1982). Regulation of malate oxidation in plant mitochondria. Response to rotenone and exogenous NAD⁺. Biochem J **208**(3): 703-711.

Peck, R. F., S. DasSarma and M. P. Krebs (2000). Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. Mol Microbiol **35**(3): 667-676.

Pischetsrieder, M., W. Seidel, G. Munch and R. Schinzel (1999). N(2)-(1-Carboxyethyl)deoxyguanosine, a nonenzymatic glycation adduct of DNA, induces single-strand breaks and increases mutation frequencies. Biochem Biophys Res Commun **264**(2): 544-549.

Poysti, N. J. and I. J. Oresnik (2007). Characterization of *Sinorhizobium meliloti* triose phosphate isomerase genes. J Bacteriol **189**(9): 3445-3451.

Pritchett, M. A., J. K. Zhang and W. W. Metcalf (2004). Development of a markerless genetic exchange method for *Methanosarcina acetivorans* C2A and its use in construction of new genetic tools for methanogenic archaea. Appl Environ Microbiol **70**(3): 1425-1433.

Pronk, J. T., Levering, P. R., Olijve, W., van Dijken, J. P. (1989). Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in

gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Tech* **11**: 160-164.

Prust, C. (2004). Entschlüsselung des Genoms von *Gluconobacter oxydans* 621H – einem Bakterium von industriellem Interesse. Dissertation: Georg-August Universität Göttingen

Prust, C., M. Hoffmeister, H. Liesegang, A. Wiezer, W. F. Fricke, A. Ehrenreich, G. Gottschalk and U. Deppenmeier (2005). Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat Biotechnol* **23**(2): 195-200.

Rutherford, K., J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M. A. Rajandream and B. Barrell (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**(10): 944-945.

Rydstrom, J., X. Hu, O. Fjellstrom, J. Mueller, J. Zhang, C. Johansson and T. Bizouarn (1998). Domains, specific residues and conformational states involved in hydride ion transfer and proton pumping by nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2): 10-16.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring harbour, New York.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.

Schaechter, E., O. Maaloe and N. O. Kjeldgaard (1958). Dependence on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**: 592-606.

Schäfer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Puhler (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**(1): 69-73.

Schmidt, T. M. (1997). Multiplicity of ribosomal RNA operons in prokaryotic genomes. In F. J. deBruijn, J. R. Lupski, and G. M. Weinstock (eds) *Bacterial genomes: physical structure and analysis*. Chapman and Hall, New York, N. Y.: 221-229.

Schmidt, V. (2005). Untersuchungen zur Regulation des Glyoxylatzyklus in *Bacillus licheniformis* DSM13. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

- Seidel, W. and M. Pischetsrieder (1998).** DNA-glycation leads to depurination by the loss of N²-carboxyethylguanine in vitro. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44**(7): 1165-1170.
- Sievers, M., C. Gaberthuel, C. Boesch, W. Ludwig and M. Teuber (1995).** Phylogenetic position of *Gluconobacter* species as a coherent cluster separated from all *Acetobacter* species on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **126**(2): 123-126.
- Sievers, M., Ludwig, W., Teuber, M. (1994).** Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the α -subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 189 – 196.
- Simon, R., U. Priefer and A. Pühler (1983).** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat. Biotech.*: **1**:784-791.
- Spiro, S. and J. R. Guest (1990).** FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**(4): 399-428.
- Spiro, S., R. E. Roberts and J. R. Guest (1989).** FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichia coli* and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol Microbiol* **3**(5): 601-608.
- Stouthamer, A. H. (1959).** Oxidative possibilities in the catalase-positive *Acetobacter* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **25**: 241-264.
- Stouthamer, A. H. (1962).** Energy production in *Gluconobacter liquefaciens*. *Biochim Biophys Acta* **56**: 19-32.
- Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner and T. Conway (1999).** Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* **181**(20): 6425-6440.
- Thornalley, P. J., A. Langborg and H. S. Minhas (1999).** Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* **344 Pt 1**: 109-116.
- Tonouchi, N., M. Sugiyama and K. Yokozeki (2003).** Coenzyme specificity of enzymes in the oxidative pentose phosphate pathway of *Gluconobacter oxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**(12): 2648-2651.
- Tonouchi, N., M. Sugiyama and K. Yokozeki (2003).** Construction of a vector plasmid for use in *Gluconobacter oxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**(1): 211-213.

- Tran, Q. H., J. Bongaerts, D. Vlad and G. Uden (1997).** Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. *Eur J Biochem* **244**(1): 155-160.
- Wach, A. (1996).** PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**(3): 259-265.
- Wackwitz, B., J. Bongaerts, S. D. Goodman and G. Uden (1999).** Growth phase-dependent regulation of *nuoA-N* expression in *Escherichia coli* K-12 by the Fis protein: upstream binding sites and bioenergetic significance. *Mol Gen Genet* **262**(4-5): 876-883.
- Warburg, O. and W. Christian (1933).** Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen. *Biochem. Z.* **266**: 377-411.
- Waris, S., M. Pischetsrieder and M. Saleemuddin (2010).** DNA damage by ribose: inhibition at high ribose concentrations. *Indian J Biochem Biophys* **47**(3): 148-156.
- Waterman, M. S. (1984).** Efficient sequence alignment algorithms. *J Theor Biol* **108**(3): 333-337.
- Wendland, J. (2003).** PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. *Curr Genet* **44**(3): 115-123.
- Williams, R., N. P. Cotton, C. M. Thomas and J. B. Jackson (1994).** Cloning and sequencing of the genes for the proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the implications for the domain structure of the enzyme. *Microbiology* **140 (Pt 7)**: 1595-1604.
- Yagi, T. (1986).** Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Arch Biochem Biophys* **250**(2): 302-311.
- Yagi, T. (1991).** Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *J Bioenerg Biomembr* **23**(2): 211-225.
- Yamada, Y., R. Hosono, P. Lisdyanti, Y. Widyastuti, S. Saono, T. Uchimura and K. Komagata (1999).** Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *J Gen Appl Microbiol* **45**(1): 23-28.
- Zheng, P., J. Sun, J. van den Heuvel and A. P. Zeng (2006).** Discovery and investigation of a new, second triose phosphate isomerase in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biotechnol* **125**(4): 462-473.

VII. Anhang

Tab.VII.1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide (unterstrichene Sequenzbereiche kennzeichnen Restriktionsschnittstellen oder angehängte Fusionshomologien)

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Gox0327do fwd	<u>ATACAGCATAGGCAGGCATTCATGCT</u> TTTTCTCCTTCGG	Amplifikation von <i>upp</i> -do
Gox0327XbaIdo rev	ATAT <u>CTAGACGATATTCAGATGTCCGA</u> CT	
Gox0327up rev	<u>CCGAAGGAGAAAAAGCATGAATGCCT</u> GCCTATGCTGTAT	Amplifikation von <i>upp</i> -up
Gox0327HindIIIupfwd	ATA <u>AAAGCTTAGCTTCTGGAAGATGCT</u> CC	
Gox0328Xbalfwd	ATAT <u>CTAGACATGACAGCTTAAGATG</u> CGTG	Amplifikation von <i>uppI</i>
Gox0327HindIIIrev	ATA <u>AAAGCTTGGAACGCTCCCTTCTGG</u> ATG	
Gox0328Xbalfwd	ATAT <u>CTAGACATGACAGCTTAAGATG</u> CGTG	Amplifikation von <i>uppII</i>
Gox0326HindIIIrev	ATA <u>AAAGCTTCCACCAGATCGAGACCG</u> ATCTG	
Gox0328Xbalfwd1	ATAT <u>CTAGAGTCGAGAATGACGAGCA</u> TGACG	Amplifikation von <i>uppIII</i>
Gox0327HindIIIrev	ATA <u>AAAGCTTGGAACGCTCCCTTCTGG</u> ATG	
Gox0328Xbalfwd1	ATAT <u>CTAGAGTCGAGAATGACGAGCA</u> TGACG	Amplifikation von <i>uppIV</i>
Gox0326HindIIIrev	ATA <u>AAAGCTTCCACCAGATCGAGACCG</u> ATCTG	
0310upFfwd	<u>CACGCATCTTAAGCTGTCATGGAGAA</u> CAGGGCCGTCTCCGGG	Amplifikation von Gox0310-up
0310upFrev	<u>GGCGATGACGAACGTCATTGCGGTG</u> GCTGCGATCCTGTGTCTGTCGT	
0310doFfwd	<u>ACGACAGACACAGGATCGCAGCCAC</u> CGCAATGACGTTCGTCATCGCC	Amplifikation von Gox0310-do
0310doXbaIrev	ATAT <u>CTAGAAAGACCCACGGCAAGAC</u> CCGTGA	
UppI0310Frev	<u>CCCGGAGACGGCCCTGTTCTCCATG</u> ACAGCTTAAGATGCGTG	Amplifikation von <i>upp</i> für Fusion mit Gox0310up
Gox0327HindIIIrev	ATA <u>AAAGCTTGGAACGCTCCCTTCTGG</u> ATG	
0310check1fwd	CAGCAGTTCAAGCTGCTCC	Verifikationsprimer für die Deletion von Gox0310
0310ckeck2rev	CACCGAAATTGCTGAACAGG	
0431upHindIII fwd	ATA <u>AAAGCTTGGAAGGAATTCAGCC</u> GGC	Amplifikation von Gox0431-up
0431upFrev	<u>CCGAGTAGCGAGTATTCCGGAAGAG</u> TTCTGATGATC	
0431doFfwd	<u>CATCAGAACTCTTCCGAAATACTCG</u> CTACTCGG	Amplifikation von Gox0431-do
0431doXbaIrev	ATAT <u>CTAGACCAGAATGAAGTCCGTA</u> TC	
0431checkfwd2	GAAGGTCAGCCGCGATATGC	Verifikationsprimer für die Deletion von Gox0431
0431checkrev	CCGTGAACACGGTTCGCACGA	

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Gox2181upEcoRI fwd	ACTGAATTCGGATCGTACTGGTAGTT GCC	Amplifikation von Gox2181-up
Gox2181uprev	GATCTTAGGAACCACATCCCGCTAGG ACGATCCGGGCGCC	
Gox2181dofwd	GGCGCCCGGATCGTCCTAGCGGGAT GTGGTTCCTAAGATC	Amplifikation von Gox2181-do
Gox2181doXbaI rev	ACATCTAGACCACGCTCCTGCGCATG ATC	
Gox2181checkrev	CCGCAAGACGTATCTCACGG	Verifikationsprimer für die Deletion von Gox2181
Gox2181checkfwd	CATCCTGCCTTTGAATCACG	
RGLU479XbaI rev	ATATCTAGAGGTTTCGCAGCGCCGCGA TTG	Amplifikation von RGLU00478 – RGLU00479 mit eigener Promotorregion
RGLU478HindIII fwd	ATAAAGCTTTCATGCCTGCACCATCG GAC	
RGLU1182XbaI fwd	ATATCTAGACATAACCTGAAGGCCGC AGG	Amplifikation von RGLU01182 mit eigener Promotorregion
RGLU1182HindIII rev	ATAAAGCTTCTATTTCGCTTTGGTCACT TC	
RGLU541XbaI fwd	ATATCTAGACGCTCTTTATTACAGTCA CC	Amplifikation von RGLU00541 mit eigener Promotorregion
RGLU541HindIII rev	ATAAAGCTTTCAGTCCAGCCGCACGG AAG	
RGLU548XbaI rev	ATATCTAGAGGAACCGGATTGGCAAC ACG	Amplifikation von RGLU00548 mit eigener Promotorregion
RGLU548HindIII fwd	ATAAAGCTTTCAGGCATCCACCCTGG CAG	
0430upEcoRI fwd	ACTGAATTCACATCCTTGACTGTCAGA CC	Amplifikation von Gox0430-up
0430upFrev	TTCACTAAGGAAGAGTTCTGGGCAGC AATGTCCGTTTCTG	
0430dofwd	CAGAAACGGACATTGCTGCCCAGAAC TCTTCCTTAGTGAA	Amplifikation von Gox0431-do
0430doXbaI rev	ACATCTAGACCATCGTGAATGCGGCG GTC	
0430checkfwd	TCGCGACGTCCTAGGATGCC	Verifikationsprimer für die Deletion von Gox0430
0430checkrev	CAACACGAAGCTGCGTCAGG	
0430checkfwd2	GTCACGCGCCCTATATGGTC	Sequenzierungsprimer für die Überprüfung der Deletion von Gox0430
0430checkrev2	ATGCGTTCGGTGCATGATCC	
pK19mobsacBcheckfwd	TTATGCTTCCGGCTCGTATG	Verifikations-/ Sequenzierprimer von pK19mobsacB
pK19mobsacBcheck rev	TGCAAGGCGATTAAGTTGGG	
18GIIcheckfwd1	TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG	Verifikations-/ Sequenzierprimer von pK18mobGII
18GIIcheckrev1	CGTGTTCGCTTCCTTTAGC	
0327GII SspI fwd	CTCAATATTGGAACGCTCCCTTCTGG ATG	Amplifikation von Gox0327
0327GII SspI rev	CTCAATATTCATGACAGCTTAAGATGC GTG	
RTGox1352fwd	TGCGCCCTGGCTTCATCTTG	<i>real-time</i> RT PCR Gox1352
RTGox1352rev	TGTGATCGGCACCCGCTTTG	
RTGox1516fwd1	GAACCGGCATAGAGATCCAC	<i>real-time</i> RT PCR Gox1516
RTGox1516rev1	AGAAGCGCGATGTTTCGGAC	

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
RTGox0431fwd	GCGTGGGTGTAGACGATCTC	<i>real-time</i> RT PCR
RTGox0431rev	TCAACCGCGTGGGTGGTATG	Gox0431
RTGox0780fwd	TGGCACCGACAGCGTCAATG	<i>real-time</i> RT PCR
RTGox0780rev	TGACGGCGATGCCGTATTCC	Gox0780
RTGox0004fwd	ATCGTCACGCCGCCATTAC	<i>real-time</i> RT PCR
RTGox0004rev	TGGCCACACCTTCGGCATAAC	Gox0004
RTGox1263fwd1	GGTCAGTGGCGAGGTAAAGG	<i>real-time</i> RT PCR
RTGox1263rev1	TCGCTTCGTTTCGGCCATGTG	Gox1263
RTGox0430fwd	CATTCGTCACAGCCGGAAG	<i>real-time</i> RT PCR
RTGox0430rev	TGCCGGTACGGTGCTGAATC	Gox0430
RTGox2390fwd	GCTCCAGAAAGCCCTGAAGC	<i>real-time</i> RT PCR
RTGox2390rev	CGTTTGAGACCGAAGGCCAT	Gox2390
Gox0327check rev	CGACCATCGCTGAAGATGTG	Verifikations-/
Gox0327check fwd	CCAACAAGATGGCCCTCCTG	Sequenzierprimer von
Gox0327HindIIIup fwd	ATAAAGCTTAGCTTCTGGAAGATGCT CC	Amplifikation Gox0327- up
uppupFrev	GGTGACTGTAATAAAGAGCGATGCCT GCCTATGCTGTAT	
uppdoFfwd	CGTACGCTGCCGAAGAACATCATGCT TTTTCTCCTTCGG	Amplifikation Gox0327- up
Gox0327Xbaldo rev	ATATCTAGACGATATTCAGATGTCCGA CT	
NADHFfwd	ATACAGCATAGGCAGGCATCGCTCTT TATTACAGTCACC	Amplifikation von
NADHFrev	CCGAAGGAGAAAAAGCATGATGTTCT TCGGCAGCGTACG	RGLU00541 mit eigener Promotorregion

Tab.VII.2: Aufgelistet sind die ORF's, die in *G. oxydans* DSM3504 vorkommen, aber nicht in *G. oxydans* 621H

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU02455	hypothetical protein
RGLU02456	hypothetical protein
RGLU02448	hypothetical protein
RGLU02457	putative outer membrane protein
RGLU02458	hypothetical protein
RGLU02459	hypothetical protein
RGLU00130	Fusaric acid resistance protein conserved region
RGLU00131	hypothetical protein
RGLU00132	DNA integration/recombination/inversion protein
RGLU00133	hypothetical protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU00134	hypothetical protein
RGLU00136	hypothetical protein
RGLU00137	hypothetical protein
RGLU02460	hypothetical protein
RGLU00138	hypothetical protein
RGLU00139	DNA-cytosine methyltransferase (2.1.1.37)
RGLU00140	Hypothetical Protein
RGLU00141	UvrD/REP helicase
RGLU00142	ATP-dependent OLD family endonuclease
RGLU00143	hypothetical protein
RGLU00144	hypothetical protein
RGLU00146	hypothetical protein
RGLU00145	Hypothetical Protein
RGLU00148	hypothetical protein
RGLU00149	hypothetical protein
RGLU00150	hypothetical protein
RGLU00152	hypothetical protein
RGLU00162	hypothetical protein
RGLU00163	hypothetical protein
RGLU02461	16S rRNA processing protein RimM
RGLU00217	putative MobA/MobL protein
RGLU00218	hypothetical protein
RGLU00219	hypothetical protein
RGLU00223	hypothetical protein
RGLU00224	hypothetical protein
RGLU00225	DNA integration/recombination/inversion protein
RGLU02462	GatB/YqeY domain protein
RGLU00477	adhB: Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit
RGLU00478	Gluconate 2-dehydrogenase alpha chain (1.1.99.3)
RGLU00479	Gluconate 2-dehydrogenase gamma chain (1.1.99.3)
RGLU00480	LacI family transcription regulator
RGLU00481	Carbohydrate-selective porin OprB
RGLU00482	glcG protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU00483	Sorbitol dehydrogenase small subunit (1.1.99.21)
RGLU00484	glucose-methanol-choline oxidoreductase
RGLU00485	Gluconate 2-dehydrogenase (acceptor) (1.1.99.3)
RGLU00486	hypothetical protein
RGLU00487	hypothetical protein
RGLU00488	putative sugar transporter
RGLU00489	transcriptional regulator, TetR family
RGLU00490	putative lipase family protein
RGLU00491	hypothetical protein
RGLU00492	transcriptional regulator, LysR family
RGLU00493	beta-lactamase
RGLU00494	hypothetical protein
RGLU00495	D-amino-acid dehydrogenase (1.4.99.1)
RGLU00496	penicillin amidase
RGLU00497	beta-lactamase
RGLU00498	dipeptidyl aminopeptidas (3.4.14.11)
RGLU00499	TonB-dependent receptor protein
RGLU00500	dac: D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (3.4.16.4)
RGLU00501	TOLUENE TOLERANCE PROTEIN TTG2B
RGLU00502	AraC family transcriptional regulator
RGLU00503	TonB-dependent receptor
RGLU00504	major facilitator superfamily AmpG-like permease
RGLU00505	hypothetical protein
RGLU00506	putative hydrolase
RGLU00507	siderophore interacting protein
RGLU00508	TonB-dependent siderophore receptor
RGLU00509	FecR protein
RGLU00510	hypothetical protein
RGLU00511	sigma factor PvdS
RGLU00512	hypothetical protein
RGLU00513	putative PepSY-associated TM helix domain protein
RGLU00514	hypothetical protein
RGLU00515	ExbB protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU00516	biopolymer transport protein ExbD
RGLU00517	TonB protein
RGLU00518	hypothetical protein
RGLU00519	hypothetical protein
RGLU00520	ferric-pseudobactin receptor
RGLU00521	putative secreted protein
RGLU00523	hypothetical protein
RGLU00524	glycosyltransferase
RGLU00525	hypothetical protein
RGLU00526	acriflavin resistance protein
RGLU00527	efflux transporter, RND family, MFP subunit
RGLU00528	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family
RGLU00530	hypothetical protein
RGLU00531	aldo/keto reductase
RGLU00532	short-chain dehydrogenase/reductase SDR
RGLU00533	IS407A, transposase OrfA
RGLU00534	short-chain dehydrogenase/reductase
RGLU00535	transcriptional regulator, TetR family
RGLU00536	major facilitator family transporter
RGLU00537	Acyl-CoA dehydrogenase
RGLU00538	hypothetical protein
RGLU00539	celB: Phosphoglucomutase (5.4.2.2)
RGLU00540	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] (1.2.1.16)
RGLU00541	NADH dehydrogenas (1.6.99.3)
RGLU00542	putative cytoplasmic protein
RGLU00543	transglutaminase domain protein
RGLU00544	hypothetical protein
RGLU00545	putative cytoplasmic protein
RGLU00546	hypothetical protein
RGLU00547	DeoR family transcriptional regulator
RGLU00548	Triosephosphate isomerase (5.3.1.1)
RGLU00549	hypothetical protein
RGLU00560	hypothetical protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU00561	putative ribulose biphosphate carboxylase large chain (4.1.1.39)
RGLU00562	type III effector Hrp-dependent outers
RGLU00563	major facilitator family transporter
RGLU00564	oxidoreductase domain-containing protein
RGLU00565	hypothetical protein
RGLU00566	putative transcriptional regulator protein, GntR family
RGLU02445	hypothetical protein
RGLU00568	hypothetical protein
RGLU00569	hypothetical protein
RGLU00570	hypothetical protein
RGLU00571	hypothetical protein
RGLU00572	HipA domain protein
RGLU00620	hypothetical protein
RGLU00625	hypothetical protein
RGLU00631	hypothetical protein
RGLU02464	integral membrane protein CcmA
RGLU00686	hypothetical protein
RGLU00785	hypothetical protein
RGLU01023	hypothetical protein
RGLU02466	hypothetical protein
RGLU01079	glycosyl transferase, family 2
RGLU01080	FkbH like protein
RGLU01089	hypothetical protein
RGLU01090	hypothetical protein
RGLU01182	nitrilase
RGLU01183	glycosyl transferase group 1
RGLU01189	hypothetical protein
RGLU01188	hypothetical protein
RGLU01190	capsular polysaccharide biosynthesis protein-like protein
RGLU01192	hypothetical protein
RGLU01193	putative glycosyltransferase
RGLU01194	glycosyl transferase, putative
RGLU01195	hypothetical protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU02441	glycosyl transferase family 2
RGLU01202	hypothetical protein
RGLU01203	outer membrane autotransporter
RGLU02469	hypothetical protein
RGLU01324	hypothetical protein
RGLU01326	hypothetical protein
RGLU01346	nagB: Glucosamine-6-phosphate deaminase (3.5.99.6)
RGLU01347	glucose/galactose transporter family protein
RGLU01348	hypothetical protein
RGLU01349	DEAD/DEAH box helicase-like
RGLU01350	hypothetical protein
RGLU01351	DNA integration/recombination/inversion protein
RGLU01352	hypothetical protein
RGLU01353	cell wall surface anchor family protein
RGLU01354	glycoside hydrolase family 3 domain protein
RGLU01355	xylP: Putative xylose-proton symporter
RGLU01356	TonB-dependent receptor
RGLU01357	transcriptional regulator, MarR family
RGLU01358	monooxygenase, FAD-binding
RGLU01359	putative isoquinoline 1-oxidoreductase (1.3.99.16)
RGLU01360	Gluconate 2-dehydrogenase cytochrome c subunit
RGLU01361	putative permease
RGLU01362	Leucyl aminopeptidase (aminopeptidase T)
RGLU01364	alpha/beta hydrolase fold
RGLU01365	Outer membrane heme receptor
RGLU01366	hypothetical protein
RGLU01367	hypothetical protein
RGLU01369	hypothetical protein
RGLU01370	bcsABII-B: Putative cellulose synthase 3 (2.4.1.12)
RGLU01371	bcsC: Cellulose synthase operon protein C
RGLU01372	putative cellulose synthase operon protein
RGLU01373	cmcAX: Probable endoglucanase (3.2.1.4)
RGLU01374	diguanylate cyclase

ERGO-Nr.	Annotation
	quiA: Quinate/shikimate dehydrogenase [Pyrroloquinoline-quinone] RGLU01375 (1.1.99.25)
RGLU01376	putative carbohydrate-selective porin OprB
RGLU01377	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A (3.5.1.52)
RGLU01378	transcriptional regulator, LysR family
RGLU01379	ABC transporter domain protein
RGLU01380	peptidase U62, modulator of DNA gyrase
RGLU01381	peptidase U62 modulator of DNA gyrase
RGLU01382	trxA: Thioredoxin-1
RGLU01383	hypothetical protein
RGLU01384	TonB-dependent siderophore receptor
RGLU01385	alpha-1,2-mannosidase family protein
RGLU01386	putative ATP/GTP-binding protein
RGLU01387	TonB-dependent receptor
RGLU01388	ndvB: Protein ndvB
RGLU01390	ribosomal protein S21
RGLU01391	transcriptional regulator, LysR family
RGLU01392	transcriptional regulator, IclR family
RGLU01393	AMP-dependent synthetase and ligase
RGLU01394	alcohol dehydrogenase related protein
RGLU01395	Enoyl-CoA hydratase/isomerase
RGLU01397	acyl-CoA dehydrogenase-family protein
RGLU01399	putative peptidase (3.4.17.11)
RGLU01400	major facilitator superfamily MFS_1
RGLU01401	TonB-dependent receptor
RGLU01402	transcriptional regulator, LysR family
RGLU01450	hypothetical protein
RGLU01452	hypothetical protein
RGLU01453	hypothetical protein
RGLU01454	transcriptional activator FtrA
RGLU01455	glutathione S-transferase domain protein
RGLU01456	glutathione S-transferase family protein
RGLU01457	DNA integration/recombination/inversion protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU01464	Putative HlyD-family protein
RGLU01465	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family
RGLU02470	surface antigen variable number repeat protein
RGLU01518	hypothetical protein
RGLU01519	Putative membrane protein {UniProtKB/TrEMBL:Q183M3}
RGLU01520	TonB-dependent receptor
RGLU01521	transcriptional regulator, ROK family
RGLU01523	hypothetical transmembrane protein
RGLU01524	hypothetical protein
RGLU01525	dihydropyrimidinas (3.5.2.2)
RGLU01526	transcriptional regulator, GntR family
RGLU01527	dihydrodipicolinate synthetase
RGLU01528	FAD dependent oxidoreductase
RGLU01529	BFD domain protein (2Fe-2S)-binding domain protein
RGLU01530	hypothetical protein
RGLU01531	extracellular solute-binding protein family 3
RGLU01532	amino acid ABC transporter permease
RGLU01533	amino acid ABC transporter permease protein
RGLU01534	ABC transporter related
RGLU01535	putative dihydrodipicolinate synthas (4.2.1.52)
RGLU01536	extracellular solute-binding protein family 3
RGLU01537	polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit
RGLU02442	FAD dependent oxidoreductase
RGLU01540	glutamate/aspartate ABC transporter (ATP-binding protein)
RGLU01541	acetylornithine deacetylase or succinyl-diaminopimelate desuccinylase
RGLU01542	TonB-dependent receptor plug
RGLU01543	TonB-dependent receptor plug
RGLU01544	hypothetical protein
RGLU01545	high-affinity nickel-transporter
RGLU01546	urease accessory protein UreD
RGLU01547	ureA: Urease subunit gamma (3.5.1.5)
RGLU01548	ureB: Urease subunit beta (3.5.1.5)
RGLU01549	ureC: Urease subunit alpha (3.5.1.5)

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU01550	urease accessory protein UreE
RGLU01551	urease accessory protein UreF
RGLU01552	ureG: Urease accessory protein ureG
RGLU01553	ornithine cyclodeaminas (4.3.1.12)
RGLU01554	arcB: Arginase (3.5.3.1)
RGLU01555	ABC transporter related
RGLU01556	octopine ABC transporter, permease protein
RGLU02471	TRANSPORTER
RGLU01558	FAD dependent oxidoreductase
RGLU01559	ooxA: Opine oxidase subunit A
RGLU01560	putative 2Fe-2S ferredoxin-like protein
RGLU01561	extracellular solute-binding protein
RGLU01562	transcriptional regulator, LysR family
RGLU01563	putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases
RGLU01564	hypothetical protein
RGLU01565	oxidoreductase (short-chain dehydrogenase:reductase family)
RGLU01566	putative xanthine dehydrogenase
RGLU01640	hypothetical protein
RGLU01762	adhesin family protein
RGLU01767	hypothetical protein
RGLU01768	phosphoribosylamine/glycine ligase (6.3.4.13)
RGLU01773	hypothetical protein
RGLU01776	hypothetical protein
RGLU01792	hypothetical protein
RGLU01811	hypothetical protein
RGLU01818	hypothetical protein
RGLU02473	GtrA family protein
RGLU02474	hypothetical protein
RGLU01894	TonB-dependent receptor
RGLU01938	TonB-dependent receptor protein
RGLU01939	hypothetical protein
RGLU01940	hypothetical protein
RGLU01941	hypothetical protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU01942	putative toxic anion resistance (TelA) family protein
RGLU02475	hypothetical protein
RGLU02183	probable aldehyde
RGLU02184	L-sorbose 1-dehydrogenase (1.1.99.32)
RGLU02185	coenzyme A transferase
RGLU02186	hydroxypyruvate reductase protein (1.1.1.81)
RGLU02187	acyl-CoA dehydrogenase domain protein
RGLU02188	short-chain dehydrogenase/reductase
RGLU02189	hypothetical protein
RGLU02190	Putative endonuclease
RGLU02191	etfB: Electron transfer flavoprotein subunit beta
RGLU02192	electron transfer flavoprotein, alpha subunit
RGLU02193	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (1.5.5.1)
RGLU02194	sugar-proton symporter
RGLU02195	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I (1.2.1.12)
RGLU02196	NUDIX hydrolase
RGLU02207	hypothetical protein
RGLU02210	TonB-dependent receptor protein
RGLU02219	heme oxygenase
RGLU02220	TonB-dependent receptor
RGLU02221	hypothetical protein
RGLU02222	hypothetical protein
RGLU02223	hypothetical protein
RGLU02224	hypothetical protein
RGLU02226	hypothetical protein
RGLU02228	hypothetical protein
RGLU02230	hypothetical protein
RGLU02231	phage Mu protein gp47-like protein
RGLU02232	hypothetical protein
RGLU02233	Phage P2 baseplate assembly protein gpV
RGLU02234	hypothetical protein
RGLU02235	hypothetical protein
RGLU02236	hypothetical protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU02237	hypothetical protein
RGLU02238	hypothetical protein
RGLU02446	hypothetical protein
RGLU02245	low temperature requirement A
RGLU02246	putative transmembrane protein
RGLU02247	PGAP1-like family protein
RGLU02248	RND efflux system outer membrane lipoprotein
RGLU02249	acriflavin resistance protein
RGLU02250	probable protein secretion protein, HlyD family
RGLU02251	TetR family transcriptional regulator
RGLU02253	membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase, glucose/quinic/quinic acid family
RGLU02254	hypothetical protein
RGLU02255	putative glucose-sensitive porin
RGLU02256	sldB: Glycerol dehydrogenase small subunit (1.1.99.22)
RGLU02257	glucose dehydrogenase
RGLU02258	transcriptional regulator, IclR family
RGLU02259	TonB-dependent receptor
RGLU02260	Antibiotic biosynthesis monooxygenase
RGLU02261	periplasmic binding protein
RGLU02262	ABC transporter, membrane spanning protein
RGLU02263	hmuV: Hemin import ATP-binding protein hmuV
RGLU02264	Antibiotic biosynthesis monooxygenase
RGLU02265	transcriptional regulator, AraC family
RGLU02284	MutT/NUDIX family protein
RGLU02285	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
RGLU02286	hypothetical protein
RGLU02287	TonB-dependent receptor
RGLU02288	Endonuclease/exonuclease/phosphatase
RGLU02478	hypothetical protein
RGLU02479	hypothetical protein
RGLU02480	hypothetical protein
RGLU02368	hypothetical protein

ERGO-Nr.	Annotation
RGLU02369	hypothetical protein
RGLU02371	phage-related lysozyme
RGLU02372	hypothetical protein
RGLU02373	hypothetical protein
RGLU02374	hypothetical protein
RGLU02375	hypothetical protein
RGLU02481	hypothetical protein

VIII. Danksagung

Prof. Dr. W. Liebl danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Dr. Armin Ehrenreich möchte ich sehr herzlich für seinen Ideenreichtum und seine Diskussionsbereitschaft, sowie für seine umfangreiche Betreuung und Unterstützung der durchgeführten Arbeit danken. Ebenso danke ich für die gewährten Freiräume beim Erlernen des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens und für die Durchsicht des Manuskripts der vorliegenden Dissertation.

Sonja Volland und das gesamte Göttinger Genomlabor möchte ich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank gebührt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ehrenreich. Dies sind Désirée, Silke, Marco, Melanie, Claudia, Christina, Michael, Daniel, Björn, David, Juliane, Sebastian, Pia, Tatjana, Angi. Danke für die nette Laboratmosphäre. Ein weiterer Dank gebührt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Liebl, Daniel, Schwarz und Ludwig.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Désirée Krauße für die schöne Zeit in Freising und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Jan Krauß möchte ich für die vielen unterhaltsamen sowie anregenden Stunden und für seine Freundschaft danken.

Der größte Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern. Auf die ich mich immer bedingungslos verlassen konnte. Ihre grenzenlose und liebevolle Unterstützung haben mich geformt und gestärkt. Ihr seid die Besten. Danke, dass es euch gibt!

IX. Lebenslauf

14.03.1981	geboren in Cottbus
1987 – 1993	Besuch der Grundschule in Berlin
1993 – 2000	Besuch der Raoul-Wallenberg-Oberschule in Berlin
2000	Abschluß Abitur
Oktober 2000	Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen für das Studienfach Biologie
Februar 2003	Diplomvorprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Chemie und Physik
Juli 2005	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Chemie
2005 – Mai 2006	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Stülke und Dr. Thorsten Mascher am Institut für allgemeine Mikrobiologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Titel: „Expression und Regulation des <i>yhcYZ-yhdA</i> Operons von <i>Bacillus subtilis</i> “
September 2006	Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation