

**Auswirkungen der Deletion
membranständiger Dehydrogenasen auf
Gluconobacter oxydans DSM 7145**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jörn Voss
aus Göttingen

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. W. Liebl

Korreferent: PD. Dr. R. Daniel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Genom und der Zentralstoffwechsel von <i>G. oxydans</i> ATCC 621H.....	2
1.2 Polyol Dehydrogenasen.....	3
1.3 Produktion von L-Erythrose durch <i>Gluconobacter</i> sp.....	5
1.4 Glucose Oxidation in <i>Gluconobacter</i> sp.....	7
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Organismen und Plasmide.....	9
2.2 Chemikalien und Enzyme.....	11
2.3 Zellanzucht und Stammhaltung der Organismen.....	11
2.3.1 Medien und Zusätze.....	11
2.3.1.1 Nährmedien für <i>G. oxydans</i>	11
2.3.1.2 Nährmedium für <i>E. coli</i>	11
2.3.1.3 Medienzusätze.....	12
2.3.2 Anzuchtbedingungen.....	12
2.3.3 Stammhaltung.....	13
2.4 Reinheitskontrollen.....	13
2.5 Bestimmung der Optischen Dichte.....	13
2.6 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate.....	14
2.7 Bestimmung des Trockengewichts.....	14
2.8 Biotransformation von <i>meso</i> -Erythritol zu L-Erythrose durch <i>resting cells</i>	14
2.9 Molekulargenetische Arbeitsmethoden.....	15
2.9.1 Behandlung von Lösungen/Geräten für Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	15
2.9.2 Fällung von Nukleinsäuren mit Isopropanol/Ethanol.....	15
2.9.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA.....	15
2.9.4 Isolierung von Plasmid DNA.....	16
2.9.4.1 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979).....	16
2.9.4.2 Plasmidisolierung mit dem „QIAprep Spin Miniprep“ Kit.....	17
2.9.5 Isolierung genomischer DNA (Miller <i>et al.</i> , 1988).....	17
2.9.6 Agarose Gelelektrophorese.....	18

2.9.6.1	Analytische Agarose Gelelektrophorese	18
2.9.6.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.9.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	19
2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987)	19
2.10.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten	19
2.10.2	Kolonie-PCR zur Klonüberprüfung	20
2.10.3	Anfügen von 3'-Adenosinüberhängen	21
2.10.4	<i>Long Flanking Homology</i> (LFH) PCR (Wach, 1996) mod.....	22
2.10.5	Klonierung von PCR Produkten	24
2.10.5.1	Klonierung von PCR Produkten in den Vektor pSC-A (Stratagene)	24
2.10.5.2	Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pJET1.2 (Fermentas).....	25
2.10.6	Enzymatische Modifikation von DNA	25
2.10.6.1	Restriktionsverdau.....	25
2.10.6.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
2.10.6.3	Generierung von glatten DNA-Enden	26
2.10.6.4	Ligation von DNA.....	27
2.10.7	DNA-DNA Hybridisierung <i>Southern Blot</i> (Southern, 1975).....	27
2.10.7.1	Markierung der Sonde	27
2.10.7.2	Restriktionsverdau, Auftrennung der DNA und Blotten.....	28
2.10.7.3	Hybridisierung der DNA	29
2.10.7.4	Kolorimetrische Detektion der Sonden	30
2.10.8	Transformationsverfahren.....	30
2.10.8.1	Herstellung von Zellen zur Hitzeschocktransformation (Sambrook <i>et al.</i> , 1989). 30	
2.10.8.2	Transformation durch Hitzeschock	31
2.10.8.3	Herstellung von Zellen zur Elektroporation (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	31
2.10.8.4	Transformation durch Elektroporation.....	31
2.10.9	Konjugation.....	32
2.10.10	Einfügen chromosomaler Deletionen in <i>G. oxydans</i> DSM 7145.....	33
2.10.11	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels <u>RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends</u> (RLM-RACE)	34
2.10.12	Sequenzanalyse	35
2.11	Techniken für das Arbeiten mit RNA.....	35
2.11.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	35
2.11.2	Zellaufschluss von <i>G. oxydans</i> mit dem Dismembrator	35

2.11.3	Isolierung der RNA.....	36
2.11.4	Hydrolyse chromosomaler DNA in der RNA-Präparation.....	36
2.11.5	PCR zur Kontrolle der DNA-Hydrolyse.....	36
2.11.6	Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von RNA.....	37
2.11.7	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	38
2.11.8	Analyse der RNA-Integrität mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent).....	38
2.11.9	PCR durch ReverseTranskription von RNA (RT-PCR).....	39
2.12	Relative quantitative Real-Time RT-PCR.....	39
2.13	Northern Blot (Alwine <i>et al.</i> , 1977).....	41
2.13.1	Markierung der Sonden.....	41
2.13.2	Elektrophorese und Blotting der RNA.....	41
2.13.3	Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG markierten Sonden.....	42
2.13.4	Detektion von RNA/RNA-Hybriden.....	43
2.14	Proteinbiochemische Methoden.....	44
2.14.1	Standardtechniken.....	44
2.14.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
2.14.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Membranfraktionen.....	45
2.14.1.3	Konzentration von Proteinlösungen.....	45
2.14.2	Zellernte und Gewinnung von cytoplasmatischen Extrakten von <i>G. oxydans</i>	45
2.14.3	Enzymatische Aktivitätsbestimmungen.....	46
2.14.3.1	Enzymtest zur Messung der Aktivität membranständiger Dehydrogenasen.....	46
2.14.3.2	Enzymtests zur Messung der Aktivität ausgewählter cytoplasmatischer Dehydrogenasen.....	47
2.14.3.3	Enzymtest zur Messung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität (Lamed & Zeikus, 1980).....	47
2.14.3.4	Enzymtest zur Messung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Aktivität (Lamed & Zeikus, 1980).....	48
2.14.3.5	Enzymtest zur Messung der Glucose-Dehydrogenase Aktivität.....	48
2.14.3.6	Quantifizierung von Essigsäure (Bergmeier und Möllering, 1974).....	48
2.15	Analytische Verfahren.....	48
2.15.1	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC).....	48
2.15.1.1	Detektion von Zuckern und Zuckeralkoholen.....	49
2.15.1.2	HPLC Analyse von <i>meso</i> -Erythritol und L-Erythrulose.....	49
2.15.1.3	Detektion von Anionen.....	50

2.15.2	Nachweis von Essigsäure durch Gaschromatographie-Massenspektrometrieanalyse (GC-MS-Analyse).....	50
3	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	52
3.1	Inaktivierung der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase von <i>G. oxydans</i> DSM 7145	52
3.1.1	Sequenzanalyse der <i>sldAB</i> Gene von <i>G. oxydans</i> DSM 7145.....	52
3.1.1.1	Amplifikation der <i>sldAB</i> Gene von <i>G. oxydans</i> DSM 7145.....	52
3.1.1.2	Sequenz des SldB Proteins von <i>G. oxydans</i> DSM 7145	53
3.1.1.3	Sequenz des SldA Proteins von <i>G. oxydans</i> DSM 7145	54
3.1.2	Untersuchung der genetischen Organisation der <i>sldAB</i> Gene.....	55
3.1.2.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der <i>sldAB</i> Gene.....	56
3.1.2.2	Untersuchung der Kotranskription der <i>sldAB</i> Gene	56
3.1.3	Konstruktion des Deletionsplasmids.....	57
3.1.3.1	Verifikation der Inaktivierung des <i>sldA</i> Gens von <i>G. oxydans</i> DSM 7145	59
3.1.4	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA</i> ::Genta.....	62
3.1.5	Biochemische Charakterisierung von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA</i> ::Genta	63
3.1.5.1	Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose	63
3.1.5.2	Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol	64
3.1.6	Komplementation von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA</i> ::Genta.....	65
3.1.6.1	Konstruktion des Komplementationsvektors pJV8.....	65
3.1.6.2	Wachstum von <i>G. oxydans</i> <i>sldA</i> ::Genta (pJV8)	67
3.1.6.3	Oxidationsaktivität von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA</i> ::Genta (pJV8)	67
3.1.7	Membranständige Glucose-Dehydrogenase Aktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle	69
3.1.8	Untersuchung der Transkription des <i>mgdh</i> - und <i>sldA</i> -Gens in <i>G. oxydans</i> DSM 7145 und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA</i> ::Genta.....	70
3.2	Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145 ...	72
3.2.1	Sequenzierung des Gens der membranständigen Glucose-Dehydrogenase.....	73
3.2.1.1	Aminosäuresequenz Glucose-Dehydrogenase von <i>G. oxydans</i> DSM 7145.....	73
3.2.2	Untersuchung der genetischen Organisation des <i>mgdh</i> Gens	76
3.2.3	Konstruktion des Vektors zur Deletion der Glucose- Dehydrogenase	77
3.2.3.1	Verifikation der Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase.....	77
3.2.4	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	80
3.2.5	Biochemische Charakterisierung von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	81

3.2.5.1	Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol	81
3.2.5.2	Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol	82
3.2.6	Komplementation von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	83
3.2.6.1	Konstruktion des Komplementationsvektors pJV 12.....	83
3.2.6.2	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> (pJV12).....	84
3.2.6.3	Oxidationsaktivität von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> (pJV12)	85
3.2.7	Stoffwechsel von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> auf VM + D-Glucose.....	86
3.2.7.1	Aktivitäten ausgewählter Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> DSM 7145 und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> bei Anzucht auf VM + D-Glucose	87
3.2.7.2	Untersuchung der Transkription ausgewählter Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> DSM 7145 und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	88
3.2.8	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> auf P1- Medium	90
3.2.8.1	Identifizierung von Ausscheidungsprodukten von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	91
3.3	Umsatz von <i>meso</i> -Erythritol durch <i>G. oxydans</i> DSM 7145	92
3.3.1	Quantifizierung von <i>meso</i> -Erythritol und L-Erythrulose bei Anzucht von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 auf VM + 50 mM <i>meso</i> -Erythritol	93
3.3.2	Identifizierung von Ausscheidungsprodukten von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 bei Wachstum auf L-Erythrulose	94
3.3.3	Umsatz von <i>meso</i> -Erythritol durch <i>resting cells</i> von <i>G. oxydans</i> DSM 7145	95
3.4	Überexpression der Glycerin-Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145 und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	97
3.4.1	Konstruktion des Plasmids zur Überexpression der <i>sldAB</i> Gene	98
3.4.2	Konstruktion der Vektorkontrolle pEXGOX(K)'	98
3.4.3	Konjugation von pEXGOX(K)' (pJV17) in <i>G. oxydans</i> DSM 7145 & <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	99
3.4.4	Auswirkung der Überexpression auf die Oxidation von <i>meso</i> -Erythritol.....	99
3.5	Chromosomaler Austausch des <i>mgdh</i> -Gens gegen die <i>sldAB</i> -Gene.....	102
3.5.1	Konstruktion des Vektors zum Austausch des <i>mgdh</i> -Gens gegen die <i>sldAB</i> -Gene	102
3.5.2	Identifizierung von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh::sldAB</i>	103
3.5.3	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>mgdh::sldAB</i>	106
3.5.4	Oxidation von <i>meso</i> -Erythritol durch <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh::sldAB</i>	107
3.5.5	Biochemische Charakterisierung von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh::sldAB</i>	108

4	DISKUSSION	111
4.1	Eigenschaften der Glycerin-Dehydrogenase von <i>G. oxydans</i> DSM 7145	111
4.1.1	Sequenzvergleiche der SldAB Proteine	112
4.1.2	Genetische Organisation der <i>sldAB</i> Gene in <i>G. oxydans</i> DSM 7145	113
4.1.3	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA::Genta</i>	114
4.1.4	Biochemische Charakterisierung von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA::Genta</i>	115
4.2	Aktivitätsunterschiede der membranständigen Glucose-Dehydrogenase.....	118
4.3	Eigenschaften der membranständigen Glucose-Dehydrogenase	120
4.3.1	Sequenz der membranständigen Glucose-Dehydrogenase	120
4.3.2	Genetische Organisation des <i>mgdh</i> Gens in <i>G. oxydans</i> DSM 7145	121
4.3.3	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i>	121
4.3.4	Substratspektrum der membranständigen Glucose-Dehydrogenase.....	122
4.4	Wachstum von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> auf VM + Glucose	123
4.5	Komplementation von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA::Genta</i> und <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>Δmgdh</i>	127
4.6	Oxidation von <i>meso</i> -Erythritol durch <i>G. oxydans</i> DSM 7145.....	129
4.7	Überexpression der Glycerin-Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145	132
4.8	Chromosomaler Austausch des <i>mgdh</i> -Gens gegen die <i>sldAB</i> -Gene in <i>G. oxydans</i> DSM 7145	134
4.9	Unterschiede zwischen <i>G. oxydans</i> ATCC 621H und <i>G. oxydans</i> DSM 7145	135
5	ZUSAMMENFASSUNG	137
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	139
	Anhang	149
	Danksagung.....	162
	Lebenslauf.....	163

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Cef	Cefoxitin
Cgdh	cytoplasmatische Glucose-Dehydrogenase
CPF	cytoplasmatische Fraktion
Da	Dalton
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DH	Dehydrogenase
DTT	Dithiothreitol
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	Enzyme Commission
E-cup	Eppendorf Gefäß
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und weitere (<i>et alii</i>)
Fa.	Firma
g	Gramm
Genta	Gentamycin
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kan	Kanamycin
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobasen

NaAc	Natriumacetat
kDa	Kilodalton
l	Liter
LacZ	β -Galactosidase
LB	Luria Bertani
m	milli- (10^{-3})
M	Molar (mol/l), Mega- (10^6)
MF	Membranfraktion
Mgdh	membranständige Glucose Dehydrogenase
μ	Mikro- (10^{-6}), Wachstumsrate
MCS	Multiklonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
n	Nano- (10^{-9})
NAD(H)	Nikotin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
Pa	Pascal
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PEG	Polyethylenglycol
6-PGH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMS	Phenazinmethosulfat
r	resistent/Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkription
s	Sekunden, sensitiv
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
SldA	große Untereinheit der Glycerin Dehydrogenase
SldB	kleine Untereinheit der Glycerin Dehydrogenase
SSC	Saline Sodium Citrate
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',- Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (unit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VM	Vollmedium
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

Nukleotidbasen

A Purinbase Adenin	G Purinbase Guanin
C Pyrimidinbase Cytosin	T Pyrimidinbase Thymidin

Aminosäuren

A Alanin	M Methionin
C Cystein	N Asparagin
D Aspartat	P Prolin
E Glutamat	Q Glutamin
F Phenylalanin	R Arginin
G Glycin	S Serin
H Histidin	T Threonin
I Isoleucin	V Valin
K Lysin	W Tryptophan
L Leucin	Y Tyrosin

1 Einleitung

Essigsäurebakterien gehören zu den am häufigsten verwendeten Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie. Sie haben im Gegensatz zu vielen anderen gram-negativen Bakterien die besondere Eigenschaft, die ihnen angebotenen Kohlenstoffquellen nicht vollständig zu CO₂ und H₂O zu oxidieren, sondern unvollständig oxidierte Produkte auszuscheiden. Die bekannteste von Essigsäurebakterien durchgeführte unvollständige Oxidation ist der Umsatz von Ethanol zu Essigsäure.

Essigsäurebakterien sind Mitglied der *Acetobacteraceae*, zu unter anderen die Gattungen *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* und *Kozakia* zählen (Sievers and Swings, 2005). Gemeinsames Kennzeichen vieler Essigsäurebakterien ist die aerobe Oxidation von Ethanol zu Acetat (Kerstens *et al.*, 2006). Anhand der Weiteroxidation von Acetat lassen sich die Essigsäurebakterien in zwei physiologische Gruppen, die so genannten Per- und Suboxidierer unterteilen. Die Peroxidierer, zu denen Arten der Gattung *Acetobacter* zählen, oxidieren nach Verbrauch des Ethanols das im Medium angehäuften Acetat vollständig zu Kohlenstoffdioxid und Wasser, während Arten der Gattung *Gluconobacter* zu den Suboxidierern zählen und Acetat nicht vollständig oxidieren können (De Ley *et al.*, 1984). Während *Acetobacter* Arten eher an alkoholreiche Habitats angepasst sind und Ethanol effektiv zu Acetat oxidieren, überwiegen hingegen Arten der Gattung *Gluconobacter* in zuckerreichen Habitats und oxidieren Zucker und Zuckeralkohole zu verschiedensten Derivaten. Diese Fähigkeit macht man sich in der Biotechnologie bei regio- und stereoselektiven Oxidationen von Zuckern zu Nutze (De Ley *et al.*, 1984). So katalysieren *Gluconobacter* Stämme entscheidende Reaktionen bei der Herstellung von Vitamin C (Reichstein & Grussner, 1934) und der Synthese des Antidiabetikums Miglitol (Schroder & Stubbe, 1989).

Natürliche Habitats der Essigsäurebakterien sind zuckerreiche Nischen wie Blüten und Früchte (Gupta *et al.*, 2001). *Gluconobacter* Arten können aber auch aus Bier, Wein und *soft drinks* isoliert werden, wo einige Arten durch die Säureproduktion zum Verderben der Getränke beitragen können (Battey & Schaffner, 2001).

Das α -Proteobakterium *Gluconobacter oxydans* ist Gram-negativ und bildet ellipsoide bis stäbchenförmige Zellen, die zumeist einzellig oder in Zellpaaren vorkommen. Durch polar inserierte Flagellen sind die Zellen schwach beweglich. Die Bildung von Dauerstadien kann nicht nachgewiesen werden (De Ley *et al.*, 1984). Alle Vertreter der Gattung *Gluconobacter* sind chemoorganotroph und strikt aerob mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor.

Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 25-30°C, das pH-Optimum bei 5,5-6 (De Ley *et al.*, 1984).

1.1 Das Genom und der Zentralstoffwechsel von *G. oxydans* ATCC 621H

Das Genom von *G. oxydans* ATCC 621H wurde von Prust *et al.* (2005) vollständig sequenziert. Neben dem Chromosom mit einer Größe von 2,7 Megabasenpaaren (Mbp) liegen fünf Plasmide mit Größen von 2,7- 163 kb vor. Der G + C Gehalt des Genoms beträgt 60,8 % und es wurden 2492 offene Leserahmen identifiziert. 70 % von diesen konnten einer Funktion zugewiesen werden. Das Chromosom von *G. oxydans* enthält eine große Zahl repetitiver, an genetischen Umlagerungen beteiligter, DNA Elemente. Ein Großteil der annotierten 82 Insertionssequenzen und 105 Transposasegene sind vermutlich funktionell und damit für die bei Essigsäurebakterien allgemein beobachtete genetische Instabilität, die auch oft zu einer Abnahme des Wachstums oder der plötzlichen Beendigung von Biokonversationen führt, verantwortlich (Kondo & Horinouchi, 1997a; Kondo & Horinouchi, 1997b).

Die Sequenzierung des Genoms ermöglichte weiterhin erste Einblicke in den Zentralmetabolismus von *G. oxydans*. So konnten alle Gene für die entsprechenden Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges identifiziert (Prust *et al.*, 2005) und damit die Vermutung untermauert werden, dass der Pentose-Phosphat-Weg der wichtigste Stoffwechselweg zum Abbau von Zuckern und Polyolen in *Gluconobacter* zu sein scheint (Gupta *et al.*, 2001). Zudem wurden überraschenderweise auch alle Gene für die gesamte Enzymausstattung des Entner-Doudoroff Weges gefunden.

Frühere biochemische Untersuchungen, wonach die Glykolyse in *Gluconobacter oxydans* nicht funktionell ist (Sievers & Swings, 2005), wurden ebenfalls verifiziert, da mit der Phosphofruktokinase ein Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges nicht im Genom kodiert ist (Prust *et al.*, 2005).

Des Weiteren können *Gluconobacter* Arten im Gegensatz zu Vertretern der Gattungen *Acetobacter* und *Gluconacetobacter* Acetat nicht zu H₂O und CO₂ oxidieren, da der Citratzyklus durch das Fehlen der Succinat Dehydrogenase und der Succinat Thiokinase (Prust *et al.*, 2005; Williams & Rainbow, 1964) nicht vollständig ist. Die Funktion des unvollständigen Citratzyklus besteht vermutlich in der Bereitstellung wichtiger Stoffwechselintermediate wie Succinat, Oxalacetat und 2-Oxoglutarat (Greenfield & Claus, 1972).

Neben den oben genannten Enzymen fehlt *G. oxydans* mit der Phosphoenolpyruvat Synthetase (PEP Synthetase) ein entscheidendes gluconeogenetisches Enzym des

Zentralstoffwechsels. Auch konnten keine Gene für die Pyruvat Dikinase oder andere Enzyme, die PEP bilden könnten, identifiziert werden. *G. oxydans* ist damit nicht in der Lage aus Pyruvat oder Oxalacetat Phosphoenolpyruvat zu bilden. Daher können keine Zucker aus Laktat oder Acetat gebildet werden und der Aufbau von Hexosen aus Glycerin und Pentosen erfolgt vermutlich über den Pentose-Phosphat Weg (Prust *et al.*, 2005).

Schließlich zeigten die genomischen Daten, dass die Stoffwechselwege für die *de novo* Synthese aller Nucleotide, Aminosäuren, Phospholipide und die meisten Vitamine in *G. oxydans* vollständig vorliegen (Prust *et al.*, 2005).

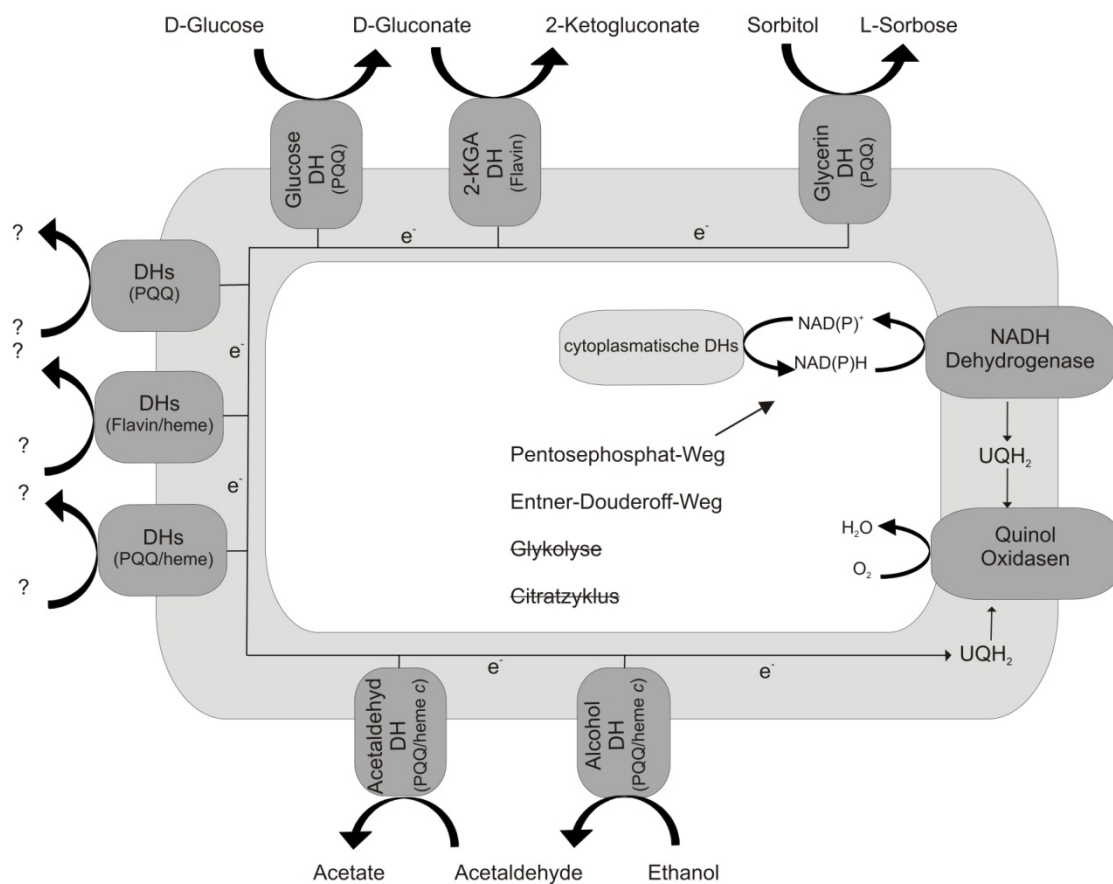


Abbildung 1: Schematische Darstellung der membranständigen und cytoplasmatischen zucker- und Alkoholoxidationssysteme in *G. oxydans*. Im Zentralmetabolismus liegen der Pentose-Phosphat- und der Entner-Doudoroff-Weg vollständig vor. Schlüsselenzyme der Glykolyse und des Citratzyklus sind nicht im Genom von *G. oxydans* kodiert. DH: Dehydrogenase; e^- : Elektronen; PQQ: Pyrrolochinolinchinon; UQH₂: Ubichinonpool (mit Veränderungen nach Deppenmeier *et al.*, 2002).

1.2 Polyol Dehydrogenasen

Essigsäurebakterien, im besonderen die Gattung *Gluconobacter*, sind in ihrer Fähigkeit verschiedenste Zucker, Zuckeralkohole und Polyole unvollständig zu oxidieren unübertroffen (Deppenmeier *et al.*, 2002). Die Identifikation einer Vielzahl bereits beschriebener und von über 70 nicht charakterisierten Oxidoreduktasen im Genom von *G. oxydans* ATCC 621H

unterstreicht das enorme oxidative Potential dieser Gattung (Prust *et al.*, 2005). Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass die für die Oxidation verantwortlichen Dehydrogenasen in zwei Gruppen, nämlich die membranständigen und die cytoplasmatischen Dehydrogenasen, die sich in ihrer zellulären Lokalisation, ihrer Funktion in der Zelle und ihrer Substratspezifität unterscheiden, eingeteilt werden können (Matsushita *et al.*, 1994).

Zur ersten Gruppe gehören die membranständigen Dehydrogenasen, die für die unvollständige Oxidation einer Vielzahl von biotechnologisch interessanten Substraten verantwortlich sind (Pronk *et al.*, 1989). Sie sind in der Cytoplasmamembran verankert, wobei das aktive Zentrum in den periplasmatischen Raum ragt. Die Substrate müssen somit nicht die Cytoplasmamembran passieren und werden nach der Oxidation im periplasmatischen Raum durch die Porine in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien nahezu quantitativ in das Medium ausgeschieden (Deppenmeier *et al.*, 2002). Prothetische Gruppen dieser Dehydrogenasen sind Pyrroloquinolinchinon (PQQ), wie bei der membranständigen Glucose Dehydrogenase (Ameyama *et al.*, 1981), oder Flavin, das in der Gluconat Dehydrogenase vorkommt (Matsushita *et al.*, 1994). Zusätzlich zum PQQ oder Flavin bestehen einige Dehydrogenasen aus Cytochrom *c* enthaltenden Untereinheiten (Deppenmeier *et al.*, 2002). Die bei der Oxidation gewonnenen Elektronen werden von den prothetischen Gruppen der membranständigen Dehydrogenasen zunächst auf den Ubichinonpool und schließlich auf Chinol Oxidasen vom *bo*₃ oder *bd* Typ übertragen, die Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (Matsushita, 1987). Biochemische Daten der *bo*₃ Typ Chinol Oxidase verdeutlichen, dass dieses Enzym in *G. suboxydans* eine hohe Aktivität aufweist (Matsushita *et al.*, 1994). Die an *G. oxydans* ATCC 621H durchgeführten Transkriptionsanalysen zeigten, dass die *bo*₃ Typ Chinol Oxidase konstitutiv exprimiert wird, während die Transkription der *bd* Typ Chinol Oxidase in Abhängigkeit von der Wachstumsrate erfolgt. So führt eine verminderte Wachstumsrate zu einer verstärkten Transkription der *bd* Typ Chinol Oxidase (Hoffmeister, 2006).

Der Elektronentransport dient dem Aufbau eines elektrochemischen Gradienten an der Cytoplasmamembran, der Voraussetzung für die Bildung von ATP ist. Das H⁺/e⁻ Verhältnis ist mit 0,5-1 jedoch äußerst gering, so dass ein Großteil der Energie als Wärme verloren geht (Matsushita *et al.*, 1994). Die unvollständige Oxidation der Substrate, die geringe Kopplungseffizienz und die kurze Atmungskette liefern zusammen mit dem Fehlen wichtiger Atmungskettenkomponenten, wie der Cytochrom *c* Oxidase, dem Komplex I und der Succinat Dehydrogenase (Prust *et al.*, 2005), eine Begründung für die geringe Biomasseproduktion dieses Organismus (Deppenmeier *et al.*, 2002). Der optimale pH-Wert der

membrangebundenen Dehydrogenasen scheint bei pH 5,5 zu liegen (Adachi *et al.*, 2001a). Ein weiteres wichtiges Kennzeichen der membranständigen Dehydrogenasen ist die überlappende Substratspezifität: so werden verschiedene Zucker und Polyole nach der Bertrand-Hudson Regel (Kulhanek, 1989) oxidiert. Diese Regel besagt, dass Polyole mit einer *cis* Anordnung von zwei sekundären Hydroxylgruppen in D-Konfiguration zur anliegenden primären Hydroxylgruppe (D-*erythro* Konfiguration) regioselektiv zur korrespondierenden Ketose oxidiert werden (Schedel, 2000). Die Größe und Struktur des übrigen Moleküls haben nur geringen oder keinen Einfluss auf die Oxidation durch *Gluconobacter* (Kulhanek, 1989). Insgesamt dienen die membranständigen Dehydrogenasen wohl hauptsächlich der Energiegewinnung, während die zweite Gruppe der in *Gluconobacter* vorkommenden Dehydrogenasen vermutlich für die Synthese von wichtigen Stoffwechselintermediaten sowie die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen in der stationären Wachstumsphase verantwortlich ist (Matsushita *et al.*, 1994).

Bei dieser zweiten Gruppe von Dehydrogenasen handelt es sich um lösliche Enzyme, die im Cytoplasma lokalisiert sind, weshalb die Substrate dieser Enzyme zunächst in die Zelle aufgenommen werden müssen. Hier werden die Substrate von NAD(P)⁺-abhängigen Dehydrogenasen, deren pH-Optimum *in vitro* bei pH 8,0 liegt (Adachi *et al.*, 2001b), oxidiert. Die gebildeten Intermediate werden nach einer Phosphorylierung über den Zentralstoffwechsel und den Pentose-Phosphat-Weg weiter metabolisiert (Adachi *et al.*, 2001a). Als Beispiele seien die NAD⁺-abhängige (EC 1.1.1.67) (Shaw & Bygrave, 1966) und NADP⁺ abhängige D-Mannitol Dehydrogenase (EC 1.1.1.138) (Adachi *et al.*, 1999) aus *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528 genannt. Diese Enzyme katalysieren die Oxidation von D-Mannitol zu D-Fructose sowie die Rückreaktion, die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol. Cofaktoren dieser Reaktionen sind NAD(H) und NADP(H).

Umfangreiche Transkriptionsanalysen an *G. oxydans* ATCC 621H zeigten, dass die meisten Oxidoreduktasen unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle konstitutiv exprimiert werden (Hoffmeister, 2005). Ausnahmen bilden eine nicht charakterisierte Dehydrogenase und ein später als membranständige Inositol Dehydrogenase beschriebenes Enzym (Hölscher *et al.*, 2007). Untersuchungen von Hädicke (2005) bestätigte die konstitutive Expression ausgewählter Dehydrogenasen für weitere Vertreter der Gattung *Gluconobacter*.

1.3 Produktion von L-Erythrulose durch *Gluconobacter* sp.

Das Tetritol *meso*-Erythritol wird der Bertrand-Hudson Regel (Kulhanek, 1989) folgend durch *Gluconobacter* stereoselektiv zu L-Erythrulose oxidiert. L-Erythrulose findet

Anwendung in Selbstbräunern, wo es eine deutlich länger anhaltende Bräune als das üblicherweise eingesetzte Dihydroxyaceton hervorruft. Zudem kann aus enantiomerenreiner L-Erythrose die seltene Aldotetrose L-Erythrose gewonnen werden (Mizanur *et al.*, 2001), deren Derivat Dideoxyerythrose eine gewisse Aktivität gegen den HI-Virus aufweist (Tschamber *et al.*, 1996).

Moonmangmee *et al.* (2002) reinigten aus dem thermotoleranten *Gluconobacter frateurii* CHM 43 eine membranständige Dehydrogenase auf, die *meso*-Erythritol selektiv zu L-Erythrose oxidierte. Das aufgereinigte Protein hatte eine molekulare Masse von 80 kDa und PQQ konnte als prosthetische-Gruppe dieses Enzyms identifiziert werden. Neben *meso*-Erythritol oxidierte das Enzym auch D-Gluconat und weitere C3-C6 Polyole.

Auch die aus *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257 aufgereinigte D-Arabitol Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 2001c) und die D-Sorbitol Dehydrogenase aus *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 (Sugisawa & Hoshino, 2002) haben molekulare Massen von ca. 80 kDa und ein breites Substratspektrum, das D-Gluconat und die C3-C6 Polyole Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol und D-Sorbitol umfasst. Einzig bei der Aufreinigung der D-Arabitol Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 2001) wurde eine zweite Untereinheit mit einer Größe von 14 kDa mitaufgereinigt.

Bei der Überexpression der als SldA bezeichneten großen Untereinheit in *Escherichia coli* zeigte sich, dass die kleine Untereinheit für die Ausbildung der Enzymaktivität essentiell ist (Miyazaki *et al.*, 2002). Dieses als SldB bezeichnete Protein besteht aus 126 Aminosäuren und ist äußerst hydrophob. Die Arbeiten von Shinjoh *et al.* (2002) und Hoshino *et al.* (2003) zeigten, dass das SldB Protein eine chaperonartige Funktion und Einfluss auf die korrekte Faltung der SldA Untereinheit haben könnte. So konnte nach Inaktivierung des *sldB* Gens zwar keine Oxidation der genannten Substrate in *G. suboxydans* IFO 3255 mehr nachgewiesen werden, das SldA Protein war jedoch in der Membran verankert. Die chaperonartige Funktion des SldB Proteins ist jedoch durch biochemische Experimente nicht näher charakterisiert worden.

Schließlich zeigten Matsushita *et al.* (2003) durch Immunokreuzreaktionen und Sequenzierung der N-terminalen Regionen der Arabitol- und Sorbitol Dehydrogenase, dass es sich bei diesen Enzymen um ein und dasselbe Protein handelt. Da Glycerin das einfachste Polyol mit einer sekundären Hydroxylgruppe in D-erythro Konfiguration zur anliegenden primären Hydroxylgruppe ist, schlugen die Autoren die Bezeichnung Glycerin Dehydrogenase (EC 1.1.99.22) für diese Major Polyol Dehydrogenase vor.

1.4 Glucose Oxidation in *Gluconobacter* sp.

Gluconobacter besitzt zwei Systeme zur Oxidation von D-Glucose: Ein membranständiges Enzym zur direkten Oxidation (Ameyama *et al.*, 1981) und eine cytoplasmatische NADP⁺ abhängige Glucose Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 1980). Im Genom von *G. oxydans* ATCC 621H konnte kein funktionsfähiges Phosphotransferasesystem (PTS) zur Aufnahme von D-Glucose nachgewiesen werden. Die Gene für die allgemeinen Komponenten EI, EII^A und HPr, nicht jedoch die Komponenten EII^B und EII^C konnten identifiziert werden. D-Glucose wird möglicherweise, wie auch in *Pseudomonas aeruginosa* und *Azotobacter vinelandii* (Romano *et al.*, 1970), durch einen Glucose/Protonen Symporter in die Zelle aufgenommen (Prust *et al.* 2005). Im Cytoplasma wird D-Glucose zunächst durch die NADP⁺- abhängige Glucose Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 1980) zu D-Gluconat oxidiert, das nach Phosphorylierung in den Pentose-Phosphat- oder den Entner-Doudoroff-Weg eingeschleust werden kann. Denkbar ist auch eine direkte Phosphorylierung von D-Glucose nach Aufnahme in die Zelle und ein nachfolgender Abbau über die eben genannten Stoffwechselwege. Darüber hinaus kann das durch die cytoplasmatische Oxidation von D-Glucose entstandene D-Gluconat durch die 2-Keto-D-Gluconat Reduktase bzw. die 5-Keto-D-Gluconat Reduktase weiter zu 2-Keto-D-Gluconat respektive 5-Keto-D-Gluconat oxidiert werden, wobei die von der 2-Keto-D-Gluconat Reduktase vermittelte Reaktion reversibel ist (De Muynck *et al.*, 2007). Derzeit liegen keine experimentellen Daten vor, die nachweisen, welcher der genannten Stoffwechselwege bei der cytoplasmatischen Oxidation von D-Glucose überwiegt. Die membranständige Glucose Dehydrogenase katalysiert die direkte Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat. Das für die Oxidation verantwortliche Enzym hat *in vitro* ein pH-Optimum von pH 6,0 und enthält PQQ als prosthetische Gruppe (Ameyama *et al.*, 1981). Die bei der Oxidation gewonnenen Elektronen werden auf den Ubichinonpool übertragen (Matsushita *et al.*, 1994). Auch das im Periplasma gebildete D-Gluconat kann weiteroxidiert werden. So setzt es die Glycerin Dehydrogenase (Matsushita *et al.*, 2003) zu 5-Keto-D-Gluconat, einem Vorläufer der L(+)-Weinsäure um, während die Gluconat Dehydrogenase (Matsushita *et al.*, 1994) D-Gluconat zu 2-Keto-D-Gluconat oxidiert. Einige *Gluconobacter* Stämme oxidieren dieses 2-Keto-D-Gluconat weiter zu 2,5-Diketogluconat, das zu 2-Keto-L-Gulonat, einem wichtigen Intermediat der Vitamin C Synthese, reduziert werden kann (Sonoyama *et al.*, 1982). Dabei unterscheiden sich die Produktspektren verschiedener *Gluconobacter* Stämme erheblich: *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H setzt einen Großteil des D-Gluconats zu gleichen Teilen zu 2-Keto-D-Gluconat und 5-Keto-D-Gluconat um,

während *Gluconobacter oxydans* DSM 3503 nur ca. 13% des gebildeten D-Gluconats zu 2-Keto-D-Gluconat und 5-Keto-D-Gluconat weiteroxidiert (Elfari *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der *meso*-Erythritol oxidierenden Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145, dem Typstamm dieser Art. Zunächst sollte überprüft werden, ob ein Homolog zu der Glycerin Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO 3255 bzw. IFO 3257 (Matsushita *et al.*, 2003) in *G. oxydans* DSM 7145 nachweisbar ist. Eine Inaktivierung der membrangebundenen Glycerin Dehydrogenase sollte Aufschluss über das Substratspektrum und die physiologische Funktion dieses Enzyms in diesem Stamm geben. Schließlich sollten Möglichkeiten zur Verbesserung der *meso*-Erythritol Oxidation untersucht werden. Dazu sollten folgende Ansätze verfolgt werden:

- (I) Deletion der membranständigen Glucose Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 und Charakterisierung der Mutante *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*
- (II) Plasmid basierte Überexpression der Glycerin Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*
- (III) Chromosomaler Austausch der membranständigen Glucose Dehydrogenase gegen die Major Polyol Dehydrogenase
- (IV) Verwendung von *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145 zum Umsatz von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Organismen und Plasmide sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide befindet sich in Tabelle A im Anhang.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und die verwendeten bzw. konstruierten *G. oxydans* Stämme

Stamm	Beschreibung ¹⁾	Referenz
<u><i>Gluconobacter oxydans</i></u>		
DSM 7145 ^T	Typstamm (= ATCC 19357)	Mason & Claus, 1980
<i>sldA</i> ::Genta	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 mit inaktivierten <i>sldA</i> Gen, Gm ^R	diese Arbeit
Δ <i>mgdh</i>	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 mit deletierten <i>mgdh</i> Gen	diese Arbeit
Δ <i>mgdh</i> :: <i>sldA</i>	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 mit Austausch des <i>mgdh</i> Gens gegen das <i>sldA</i> Gen	diese Arbeit
ATCC 621H	(= DSM 2343)	Gillis & De Ley, 1980
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
XL-1 blue	<i>recA</i> ⁻ , <i>thi</i> , <i>hsdR1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lacF</i> ['] , <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10[Tet]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
S 17-1	Sm ^R , Tp ^R , <i>mod</i> ⁺ , <i>res</i> ⁻ , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> ⁻ , integriertes Plasmid RP4-Tc:: Mu-Km:: Tn7, <i>hsdR17</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
Solopack	<i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA</i> , <i>recA</i> ⁻ , Strep ^R , <i>cre</i>	Stratagene, La Jolla (CA)

1) Geno- und Phänotypbezeichnungen von *E. coli* nach (Bachmann, 1987)

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSC-A	high copy Klonierungsvektor, <i>ori</i> pUC, <i>lox</i> P, <i>lac</i> Promotor, <i>lac</i> Z α , Amp ^R , Km ^R	Stratagene La Jolla (CA)
pJET 1.2	high copy Klonierungsvektor, rep(pMB1), <i>lac</i> Promotor <i>eco</i> 471R, Amp ^R	Fermentas St. Leon Rot
pK19mobsacB	mobilisierbarer Integrationsvektor, Derivat von Plasmid pK19 durch Einfügen <i>mob</i> und <i>sac</i> B Gene, Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> 1994
pBBR-1 MCS2	broad host range Klonierungsvektor, <i>ori</i> pBBR1, <i>lac</i> Promotor, <i>lac</i> Z α , Km ^R	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBBR-1 MCS5	broad host range Klonierungsvektor, <i>ori</i> pBBR1, <i>lac</i> Promotor, <i>lac</i> Z α , Gm ^R	Kovach <i>et al.</i> 1995
pEXGOX(K)	Expressionsvektor für <i>G. oxydans</i> , Derivat von pBBR-1 MCS2 durch Einfügen <i>G. oxydans tuf</i> B Promotor, Km ^R	Schleyer <i>et al.</i> 2007
pSC-A: <i>sld</i> AB	Derivat von pSC-A mit <i>sld</i> AB Genen zur Sequenzierung <i>sld</i> AB Gene aus <i>G. oxydans</i> DSM 7145, Amp ^R	diese Arbeit
pJET: <i>mgdh</i>	Derivat von pJET 1.2 mit <i>mgdh</i> Gen zur Sequenzierung <i>mgdh</i> Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 7145, Amp ^R	diese Arbeit
pJV5	Derivat von pK19mobsacB mit <i>sld</i> AB Genen, <i>sld</i> A Gen durch Gm ^R unterbrochen zur Inaktivierung Glycerin Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145, Km ^R	diese Arbeit
pJV7	Derivat von pK19mobsacB mit 750 bp Fragmenten upstream und downstream des <i>mgdh</i> Gens zur Deletion der Glucose Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145, Km ^R	diese Arbeit
pJV8	Derivat von pBBR-1 MCS mit <i>sld</i> A Gen und der putativen Promotorregion zur Komplementation von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sld</i> A::Genta, Km ^R	diese Arbeit
pJV12	Derivat von pBBR-1 MCS2 mit <i>mgdh</i> Gen und der putativen Promotorregion zur Komplementation von <i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> , Km ^R	diese Arbeit
pJV15	Derivat von pK19mobsacB mit 800bp Fragmenten upstream und downstream des <i>mgdh</i> Gens fusioniert mit <i>sld</i> AB Genen zum chromosomalen Austausch der Glucose- gegen die Glycerin Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145, Km ^R	diese Arbeit
pEXGOX(K)'	Derivat von pEXGOX(K), verkürzt um 540bp großes <i>S</i> waI, <i>E</i> coRI Fragment, Km ^R	diese Arbeit
pJV17	Derivat von pEXGOX(K) mit <i>sld</i> AB Genen zur Überexpression der Glycerin Dehydrogenase in <i>G. oxydans</i> DSM 7145, Km ^R	diese Arbeit

2.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Oxoid (Basingstoke, England), 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.

2.3 Zellanzucht und Stammhaltung der Organismen

2.3.1 Medien und Zusätze

2.3.1.1 Nährmedien für *G. oxydans*

Mannitol Vollmedium (Buchert & Viikari, 1988)

G. oxydans wurde in einem Mannitol Vollmedium angezogen. Dieses enthielt je Liter: Hefeextrakt, 5,0 g; Trypton, 3,0 g; D-Mannitol, 50 mM. Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Kohlenstoffquellen wurden ebenfalls in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit 6 M Salzsäure auf pH 6,0 eingestellt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem Vollmedium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Hitzelabile Medienzusätze wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Festmedien nach Abkühlung auf 55°C zugesetzt. Bei Flüssigmedien wurden die sterilfiltrierten Zusätze unmittelbar vor dem Beimpfen zugesetzt. Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Zusätze sind in Tabelle 3 aufgeführt.

P1 Medium zum Nachweis von Säureproduktion (Gupta et al., 1999)

Das P1 Medium (Gupta *et al.*, 1999) dient dem Nachweis der Säureproduktion von *G. oxydans*. Dieses enthielt je Liter: Hefeextrakt, 5,0 g; Trypton 3,0 g; D-Glucose 100,0 g; MgSO₄ · 7H₂O 0,5 g; Agar, 15,0 g. Nach dem Autoklavieren des Mediums wurden Agarplatten mit einer Schichtdicke von etwa 4 mm gegossen. Auf diese erste Schicht wurde nach dem Erkalten eine weitere etwa 4 mm starke Schicht aufgebracht, die zusätzlich zu den oben genannten Bestandteilen 10 g/L CaCO₃ enthielt.

2.3.1.2 Nährmedium für *E. coli*

Luria-Bertani Medium (Sambrook et al., 1989)

E. coli Kulturen wurden in Luria Bertani (LB)-Vollmedium angezogen. Dieses enthielt je Liter: Trypton, 10,0 g; Hefeextrakt, 5,0 g; NaCl, 10,0 g. Das Medium wurde im Autoklaven 20 min bei 120°C sterilisiert. Zur Herstellung von festem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar

zugemischt. Der Zusatz hitzelabiler Substrate erfolgte wie unter 3.1.1.2 angegeben. Die dabei verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

SOB Medium (Sambrook *et al.* 1989)

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde *E. coli* in SOB Medium angezogen. Dieses enthielt je Liter: Trypton, 20 g; Hefeextrakt, 5,0 g; NaCl, 10 mM; KCl, 2,5 mM; MgCl₂, 10 mM; MgSO₄, 10 mM. Die Magnesiumsalze wurden den übrigen Medienbestandteilen nach dem Autoklavieren als getrennt sterilisierte Stammlösungen (1 M MgCl₂/1M MgSO₄) zugegeben.

2.3.1.3 Medienzusätze

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

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze mit Angabe der Konzentration der Stammlösung und der eingesetzten Endkonzentration.

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	100 µg/ml
Cefoxitin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	50 µg/ml
Gentamicin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	10 µg/ml (<i>E.coli</i>)
		50 µg/ml (<i>G.oxydans</i>)
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	50 µg/ml (<i>E. coli</i>)
		25 µg/ml (<i>G.oxydans</i>)
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid	40 µg/ml

2.3.2 Anzuchtbedingungen

Anzucht von *G. oxydans*

G. oxydans wurde aerob bei 30°C und 150 rpm schwenkend auf einem Rundschüttler (Infors HT, Bottmingen, CH) angezogen. Für Wachstumsversuche und Anzuchten für biochemische Untersuchungen wurden in der Regel 5 ml Mannitol Vollmedium (II.2.1.1) aus einer Stammkultur beimpft und für 24-48 h inkubiert. Diese Vorkultur diente als Inokulum für eine weitere 5 ml Kultur (Wachstumsversuche) oder eine 20 ml Kultur (Zellanzucht für biochemische Untersuchungen), die jeweils das Vollmedium und 50 mM der zu untersuchenden Kohlenstoffquelle enthielt. Nach einer Inkubation für 12-24 h wurden Hauptkulturen auf eine OD ($\lambda = 600$ nm) von 0,05 angeimpft. Die verwendeten Gefäßgrößen

entsprachen dem fünf bis zehnfachen des verwendeten Kulturvolumens. Die Kultivierung auf festen Nährböden erfolgte für 48 Stunden bei 30°C.

Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde aerob bei 37°C schwenkend auf einem Rundschüttler (Infors HT, Bottmingen, CH) bei 150 rpm angezogen. Für die Isolierung von Plasmid DNA wurden 5 ml LB-Medium (II.2.1.2) mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht inkubiert. Hauptkulturen wurden 0,5 %ig (v/v) mit einer gut gewachsenen Vorkultur beimpft. Die Kultivierung auf festen Nährböden erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.3.3 Stammhaltung

Stammhaltung von *G. oxydans*

Zur Konservierung von *G. oxydans* Stämmen wurde ein Voll- oder Selektivmedium mit einer einzelnen Kolonie beimpft und für 48 Stunden bei 30°C angezogen. 750 µl dieser Zellsuspension wurden mit 250 µl 87 %igen (w/v) Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

Stammhaltung von *E. coli*

Zur Konservierung von *E. coli* Stämmen wurde ein Selektivmedium mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. 750 µl dieser Zellsuspension wurden mit 250 µl 87 %igen (w/v) Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

2.4 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 Vereinzelausstriche auf LB- und VM + Mannitol- Agarplatten angelegt, um Kontaminationen mit *E. coli* auszuschließen.

2.5 Bestimmung der Optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen wurde über die Optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) 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 0,3 überschritt.

2.6 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate

Zur Bestimmung der maximalen Wachstumsrate wurde der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen über 48 Stunden verfolgt. Nach der graphischen Darstellung der gemessenen OD gegen die Zeit wurde die maximale Wachstumsrate in der logarithmischen Wachstumsphase, in der die schnellstmögliche Zellteilung stattfindet, 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.

2.7 Bestimmung des Trockengewichts

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde die Flüssigkultur zunächst bei 4000 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde zwei Mal mit 50 ml $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen und schließlich in einem möglichst kleinen Volumen $H_2O_{\text{bidest.}}$ aufgenommen. Die Zellsuspension wurde nachfolgend auf einen Membranfilter, der in einer Glaspetrischale bei 85°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde, abgesaugt und vor Ermittlung des Trockengewichts mindestens 48 Stunden bei 85°C getrocknet.

2.8 Biotransformation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose durch *resting cells*

Zur Umsetzung von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose wurden *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ in 300 ml VM + 50 mM D-Glucose (II.2.1.1) im Schüttler bei 150 rpm und 30°C für 24 Stunden bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogen.

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (10 min bei 8000 rpm und 4°C). Das erhaltene Pellet wurde vorsichtig in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,2 resuspendiert und wiederum bei 8000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Nach nochmaligem Waschen des Pellets wurden die Zellen aus 150 ml Kultur in 100 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,2 aufgenommen und der Suspension 50 bzw. 200 mM *meso*-Erythritol zugesetzt.

Zur Umsetzung von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose wurden die *resting cells* bei 30°C-im Schüttler bei 140 rpm und 30°C für 48 h inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur HPLC Analyse und zur Bestimmung der OD entnommen.

2.9 Molekulargenetische Arbeitsmethoden

2.9.1 Behandlung von Lösungen/Geräten für Arbeiten mit Nukleinsäuren

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

2.9.2 Fällung von Nukleinsäuren mit Isopropanol/Ethanol

Durch die Fällung mit Isopropanol/Ethanol wurde die DNA von Proteinen, Nukleotiden und Salzen 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 µl 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert und nochmals durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde möglichst rückstandsfrei abgenommen und Ethanolreste in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110A, Savant) abgedampft. Schließlich wurde das transparente DNA Pellet in 20 – 30 µl H₂O_{bidest.} oder TE- Puffer aufgenommen.

2.9.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentration von DNA Lösungen wurde anhand der Absorption von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Nanodrop (Nanodrop 1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt. Der Nullabgleich wurde mit Wasser oder TE-Puffer vorgenommen, abhängig davon, worin die DNA gelöst war. Für eine OD₂₆₀ von 1,0 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml angenommen. Zusätzlich konnte die Reinheit der DNA durch Bestimmung der OD bei 230 und 280 nm abgeschätzt werden. Für reine DNA gilt:

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

$$OD_{230} : OD_{260} : OD_{280} = 0,45 : 1,0 : 0,515 \quad (\text{Marmur, 1961})$$

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

2.9.4 Isolierung von Plasmid DNA

2.9.4.1 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979)

Die von Birnboim und Doly (1979) beschriebene Methode zur Isolierung von Plasmid DNA beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten von chromosomaler und Plasmid DNA bei pH Werten von 12-12,5. Während die chromosomale DNA unter diesen Bedingungen denaturiert und nach einem Neutralisierungsschritt pelletiert werden kann, bleibt die überspiralisierte Plasmid DNA in Lösung und kann durch eine Fällung mit Isopropanol oder durch Bindung an eine Silikamembran gewonnen werden.

Dazu wurde eine 5 ml *E. coli* Kultur mit dem plasmidspezifischen Antibiotikum bei 37°C über Nacht angezogen. Zwei Milliliter dieser Kultur wurden in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min, 4°C, Minispin plus, Eppendorf Hamburg) geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer 1 (mit RNase A) vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 wurde die Lösung einige Male vorsichtig invertiert, bis diese klar war. Zur Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA wurde der Ansatz mit 200 µl Puffer 3 neutralisiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 13000 rpm (15 min, 4°C) abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde für fünf Minuten auf Eis inkubiert und die Plasmid DNA durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde schließlich mit 800 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110A, Savant) getrocknet und in 30 µl sterilem H₂O_{bidest.} aufgenommen.

Puffer 1

Tris	50 mM
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10 mM
RNase A	200 µg/ml
pH 8,0	

Puffer 2

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Puffer 3

K(CH ₃ COO)	3 M
pH 5,5 (Einstellen mit Eisessig)	

RNase Stammlösung (50x)

RNase A	10 mg/ml
Tris	50 mM
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10 mM
pH 8,0	

Die RNase Stammlösung wurde zur Inaktivierung von DNasen 15 Minuten im Wasserbad aufgeköcht. Nach dem Abkühlen erfolgte die Lagerung bei -20°C. Die Stammlösung wurde autoklaviertem Puffer 1 unmittelbar vor der Benutzung zugesetzt.

2.9.4.2 Plasmidisolierung mit dem „QIAprep Spin Miniprep“ Kit

Das „QIAprep Spin Miniprep“ Kit (Qiagen, Hilden) ermöglicht die Aufreinigung von etwa 20 µg hochreiner Plasmid DNA. Die Zellen werden zunächst durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid DNA durch selektive Bindung an eine Säule gewonnen. Die Durchführung der Methode erfolgte nach der vom Hersteller gelieferten Versuchsvorschrift. Für die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurden zwei Milliliter einer gut gewachsenen Kultur verwendet, die Isolierung von Plasmid DNA aus *G. oxydans* erfolgte aus fünf Milliliter einer gut gewachsenen Kultur.

2.9.5 Isolierung genomischer DNA (Miller *et al.*, 1988)

Genomische DNA wurde mit dem „Master Pure DNA Purification Kit“ (Epicentre, Madison, U.S.A) nach der modifizierten Methode von Miller *et al.* (1988) gewonnen. Die zur Präparation der genomischen DNA notwendigen Lösungen und Anleitungen sind dem Kit beigelegt.

Zur DNA-Isolierung wurden die Zellen zunächst durch Inkubation mit Proteinase K bei 65°C lysiert. Nach der Lyse der Zellen wurde die in der Suspension enthaltene RNA durch eine RNase A Behandlung abgebaut. Die Abtrennung von zellulären Proteinen erfolgte durch Zugabe einer 6 M NaCl Lösung, die eine Dehydratisierung und damit eine Aussalzung der Proteine bewirkt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und die im Überstand enthaltene DNA durch eine Isopropanol-Fällung gewonnen. Nach nochmaligem Waschen mit 70%igem Ethanol und Zentrifugation wurde das erhaltene Pellet in TE Puffer aufgenommen

2.9.6 Agarose Gelelektrophorese

2.9.6.1 Analytische Agarose Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wurden horizontale Elektrophoresekammern (Hoefer HE33 Mini Horizontal Submarine Unit; Pharmacia Biotech) verwendet. Die Gele bestanden aus 0,8 %iger (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer, welcher auch als Elektrophoresepuffer gebraucht wurde. Die DNA Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit DNA Auftragspuffer vermischt, der zur Beschwerung der Proben und zur Markierung der Lauffront bei ~ 500 bp diente. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 – 100 V.

Zur Färbung der Nukleinsäuren wurde das Gel für 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) geschwenkt und anschließend kurz im Wasserbad gefärbt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte bei UV Licht in einer Gel- Dokumentationsanlage (ImageQuant 100, GE Healthcare, Freiburg). Als Größenstandard wurde eine 1 kb Leiter (GeneRuler 1 kb ladder, MBI Fermentas, St. Leon Rot) in einer Konzentration von 0,05 µg/µl eingesetzt.

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		

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

250 µl einer 2 mg/ml Ethidiumbromidlösung in 500 ml H₂O_{bidest.}

DNA-Auftragspuffer (Sambrook *et al.*, 1989)

Ficoll 400	7,5	g
Bromphenolblau	50	mg
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (0,5 M)	10	ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 50	ml

2.9.6.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Bei der präparativen Gelelektrophorese wurde zunächst wie unter II.3.6.1 beschrieben vorgegangen. Um Interkalations- und UV induzierte Schäden zu minimieren, wurde eine Hälfte des Agarosegels mit dem DNA-Größenstandard und einem kleinen Volumen der Probe, die andere Hälfte mit der übrigen Probe beladen. Nach der Auftrennung wurde das Gel zerschnitten und nur die Hälfte mit dem DNA-Größenstandard im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die auszuschneidene Bande wurde unter UV-Licht markiert. Schließlich wurden beide Gelhälften wieder zusammengefügt und die gewünschte Bande anhand der Markierung auf der gefärbten Gelhälfte mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega GmbH, Mannheim) aus dem Gel isoliert (II.3.7).

2.9.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega GmbH, Mannheim) wurden die in der präparativen Gelelektrophorese aufgewonnenen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert. Das Reinigungsprinzip beruht auf der Lösung der Agarose in einer hochkonzentrierten Salzlösung und der Bindung der Nukleinsäuren an eine Säulenmatrix. Alle benötigten Lösungen und Protokolle liegen dem Kit bei.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987)

2.10.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Bei der PCR wird ein DNA-Molekül *in vitro* vervielfältigt. Falls erforderlich, werden die zu amplifizierenden DNA-Bereiche mit neuen Restriktionsschnittstellen versehen, weshalb die Primer entsprechend der neuen Schnittsequenzen Fehlpaarungen zum DNA-Matritzenstrang aufweisen können. Die Hybridisierungstemperatur bei der PCR Reaktion ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotid Primer. Je größer der G+C Gehalt, desto höher liegt die Hybridisierungstemperatur. Es gilt die Näherung:

$$T_D(^{\circ}\text{C}) = (2 \times [A + T] + 4 \times [C + G]),$$

wobei A, T, C und G Platzhalter für die Anzahl der jeweiligen Basen sind.

Zur Durchführung der PCR Läufe wurden programmierbare Thermoblöcke (MJ Research PTC-200m Gradient Cycler, Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. Zur Amplifikation von Genen aus genomischer DNA wurde die *Pfu* Polymerase (MBI, Fermentas, St. Leon Rot) eingesetzt, diese besitzt aufgrund ihrer *proofreading* Funktion eine geringe Fehlerrate. Nachfolgend ist der verwendete Standardreaktionsansatz und das PCR Programm aufgeführt.

PCR-Amplifikate, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden durch präparative Agarose Gelelektrophorese (II.3.6.2) von Primern, Polymerase und möglichen Nebenprodukten gereinigt. Die Isolierung der DNA aus dem Agarose Gel wurde wie unter II.3.7 beschrieben durchgeführt.

Standardreaktionsansatz:

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

Standard PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	3	min
Denaturierung	95°C	1	min
Annealing	T _m - 3°C	1	min
Elongation	72°C	2	min/kb
Elongation	95°C	5	min

30 Zyklen

2.10.2 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:

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

Bei der verwendeten *Taq*-Polymerase handelt es sich um ein rekombinantes, nach einem laboreigenen Protokoll aufgereinigtes Enzym. In der Kolonie-PCR wurden plasmid- bzw. genspezifische Primer und das folgende PCR-Programm angewendet:

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			

2.10.3 Anfügen von 3'-Adenosinüberhängen

Zur Klonierung von mit *Pfu*-DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten (II.3.8.1) in den Vektor pSC-A (II.3.9.1) mussten diesen zunächst 3'-Adenosinüberhänge angefügt werden. Dazu wurden die PCR-Produkte zunächst wie unter II.3.7 beschrieben aufgereinigt und die DNA Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes bestimmt (II.3.3). Zum Anfügen der 3'-Adenosinüberhänge wurde *Taq*-DNA-Polymerase (rekombinant) (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) in dem oben gezeigten Reaktionsansatz verwendet. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 72°C.

PCR-Produkt (1 μg)	x	μl
<i>Taq</i> -Reaktionspuffer, +(NH ₄) ₂ SO ₄ , -MgCl ₂ (10x)	3	μl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	μl
dATP (10 mM)	2	μl
<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5 U/μl)	0,3	μl
H ₂ O _{bidest.}	30-x	μl

2.10.4 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.

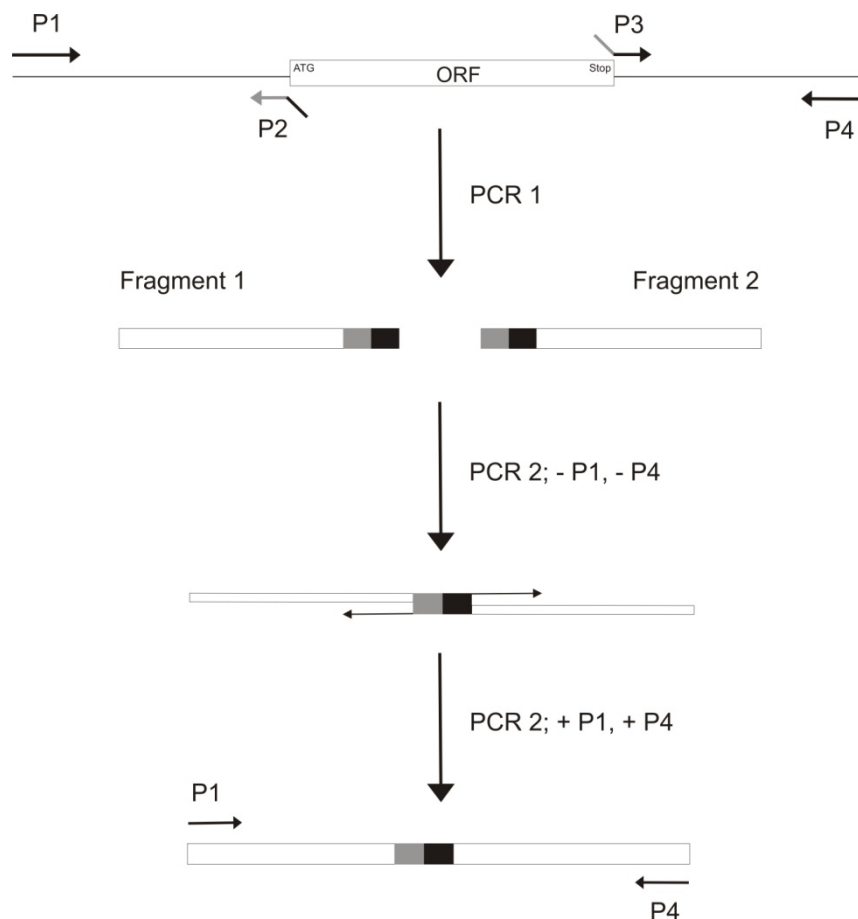


Abbildung 2: Schema der *Long Flanking Homology* PCR Methode nach Wach (1996) und Wendland (2003) mod.

Dazu wurden zunächst wie in Abbildung 2 gezeigt vier Primer abgeleitet. Primer P1 band etwa 750 bp stromaufwärts des Startcodons, Primer P4 etwa 750 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 wie unter II.3.7 beschrieben aufgereinigt und die DNA Konzentration bestimmt (II.3.3). Zur Fusion der Stromaufwärts- und der Stromabwärts-Homologieregionen wurden je 200 ng der PCR-Produkte mit dem folgenden Reaktionsansatz gemischt:

Fragment 1 (H_{up}) (200 ng)	x	μ l
Fragment 2 (H_{down}) (200 ng)	y	μ l
10x <i>Pfu</i> Puffer (+MgSO ₄)	3	μ l
dNTP mix	3	μ l
(je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		μ l
<i>Pfu</i> -Polymerase	1	μ l
H ₂ O _{bidest.}	30-x-y	μ l

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:

Denaturierung	95°C	3	min
Denaturierung	95°C	1	min
Annealing	63°C	1	min
Elongation	72°C	2	min/kb

Nach zehn Zyklen dieses Programms wurden dem Ansatz die folgenden Komponenten zugegeben:

Primer 1 (10 pmol/ μ l)	5 μ l
Primer 2 (10 pmol/ μ l)	5 μ l
10x <i>Pfu Puffer</i> (+MgSO ₄)	2 μ l
dNTP mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2 μ l μ l
<i>Pfu</i> -Polymerase	0.5 μ l
H ₂ O _{bidest.}	2.2 μ l

Die folgenden 20 Zyklen dienten der Vermehrung der fusionierten Homologieregionen:

Denaturierung	95°C	1	min
Annealing	T _m - 3°C	1	min
Elongation	72°C	2	min/kb
Elongation	72°C	10	min

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.

2.10.5 Klonierung von PCR Produkten

2.10.5.1 Klonierung von PCR Produkten in den Vektor pSC-A (Stratagene)

Zur Klonierung von mit *Pfu*-DNA-Polymerase generierten PCR Produkten in den Vektor pSC-A mussten diesen zunächst wie unter II.3.8.3 beschrieben 3' Adenosin Überhänge angefügt werden. PCR-Produkte, die mit *Taq*-DNA-Polymerase generiert wurden, konnten direkt in den Vektor pSC-A ligiert werden. Der StrataClone PCR *cloning vector mix* enthält zwei DNA Fragmente, die an jeweils einem Ende eine kovalent gebundene Topoisomerase I und einen modifizierten Uridin Überhang und am jeweils anderen Ende eine *loxP* Erkennungssequenz tragen.

Die Topoisomerase I und der Uridin Überhang sind Voraussetzung für die TOPO Klonierung, die auf der Fähigkeit der Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus basiert Phosphodiesterbindungen nach der Sequenz 5'-CCCTT zu hydrolysieren und dabei einen 3' T Überhang zurückzulassen. Die Topoisomerase I bleibt kovalent am 5' Ende der geschnittenen DNA gebunden und die gespeicherte Bindungsenergie kann auch zur Ligation von heterologen DNA-Fragmenten, wie PCR-Produkten mit 3' Adenosin Überhängen, genutzt

werden. Das durch die A-U Basenpaarung und Topoisomerase I vermittelte Strangverknüpfung entstandene lineare DNA-Molekül (Vektorarm_{ori}-PCR Produkt-Vektorarm_{amp/kann}) wird in *E. coli* Solopack transformiert, welcher das Enzym *Cre* Rekombinase konstitutiv exprimiert. Die *Cre* Rekombinase des Bacteriophagen P1 vermittelt die Rekombination zwischen den beiden *loxP* Sequenzen und das zirkuläre DNA Molekül kann auf Ampicillin oder Kanamycin haltigem Medium selektiert werden. Desweiteren erlaubt das Vektorprodukt über die *lacZ'* α Komplementation eine Blau/Weiß Selektion. Die Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pSC-A mit Hilfe des Strataclone PCR Cloning Kit (Stratagene, LaJolla, U.S.A.) erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.

2.10.5.2 Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pJET1.2 (Fermentas)

Der im CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) enthaltene Vektor pJET1.2/blunt enthält das Gen für die letale Restriktionsendonuclease *Eco32I*, das durch Ligation eines DNA-Fragments in die Klonierungsstelle des Vektors unterbrochen wird. Somit wachsen auf Selektivmedium nur rekombinante Klone, die das pJET1.2 Plasmid mit Insert tragen. PCR Produkte mit glatten Enden können direkt in den Vektor ligiert werden, während die Enden der mit der *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte zunächst mit einem ebenfalls im Kit enthaltenen *blunting* Enzym geglättet werden müssen. Der Ligationsansatz kann in alle gängigen *E. coli* Laborstämme transformiert werden. Die Ligation der PCR-Produkte erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Alle notwendigen Reagentien und Anleitungen lagen dem Kit bei.

2.10.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.10.6.1 Restriktionsverdau

Diese Methode des Hydrolysierens von DNA beruht auf der hohen Spezifität der aus Prokaryoten isolierten Typ II Restriktionsendonukleasen gegenüber ihrer meist palindromischen Erkennungssequenz im DNA-Doppelstrang. Die Enzyme hydrolysieren an definierten Stellen die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Basen in beiden Strängen. Wobei überhängende oder glatte Enden entstehen können. Die DNA-Lösungen wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzymen (1U/ μ g DNA) und dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer versetzt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einem Doppelrestriktionsansatz wurde ein für beide Enzyme geeigneter Puffer verwendet.

Standard Restriktionsansatz:

DNA Lösung (1µg)	x	µl
Restriktionspuffer (10x)	2	µl
H ₂ O _{bidest.}	18-x	µl
+ 1 U Restriktionsenzym/ µg DNA		

2.10.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die re-Ligation restriktionsverdauter Vektor-DNA zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen enzymatisch mit Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt) abgespalten. Dem Restriktionsansatz wurden 2 µl 10x Phosphatase-Puffer und 1 µl Antarctic Phosphatase/ µg DNA zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Phosphatase nachfolgend bei 65°C für fünf Minuten inaktiviert. Zur Trennung von Vektor DNA und Phosphatase wurde die DNA mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega GmbH, Mannheim) aufgereinigt (II.3.7).

2.10.6.3 Generierung von glatten DNA-Enden

5' und 3' Überhänge an DANN-Fragmenten wurden durch Inkubation mit der T4-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon Rot) geglättet. Bei der T4 Polymerase handelt es sich um eine mesophile Polymerase, die die Synthese einzelsträngiger DNA in 5'→ 3' Richtung katalysiert. Das Enzym besitzt eine 3'→ 5' Exonuclease, jedoch keine 5'→ 3' Exonuclease Aktivität. Die zu glättenden DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarose Gelelektrophorese aufgereinigt (II.3.6.2) und mit dem folgenden Ansatz für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

5x Reaktionspuffer	4	µl
hydrolysierte DNA, PCR-Produkt	1	µl
dNTPs (je 2 mM)	1	µl
T4 DNA Polymerase	0.2	µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 20	µl

Nach der Hitzeinaktivierung der T4 DNA Polymerase (75°C, 10 min) wurde die DNA wie unter II.3.7 beschrieben aufgereinigt.

2.10.6.4 Ligation von DNA

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat-, und 3'- Hydroxyl-Enden von DNA. In dieser Arbeit wurde der Quick Ligation Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verwendet. Der Standard Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Vektor	50 ng
Insert	200 ng
2 x Quick Ligation Puffer Mix	2 µl
Quick T4 Ligase	0,5 µl

Der Ansatz wurde kurz gemischt, anzenrifugiert und nachfolgend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.10.7 DNA-DNA Hybridisierung *Southern Blot* (Southern, 1975)

Der Southern Blot dient dem Nachweis bestimmter DNA-Fragmente in der Gesamt-DNA eines Organismus. Dazu werden die restriktionsverdaute DNA-Fragmente zunächst mittels Agarose Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und nachfolgend auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wird mit einer Biotin markierten DNA-Sonde hybridisiert und das gesuchte Fragment durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

2.10.7.1 Markierung der Sonde

Die für den Southern Blot verwendeten Sonden wurden mit dem Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) markiert. Im Gegensatz zur der von (Feinberg & Vogelstein, 1983)) entwickelten *random primed* Markierung, werden hier *random* Dekamere verwendet. Der komplementäre Strang wird vom 3'-Ende dieser Primer durch ein Klenow Fragment (*exo*⁻) synthetisiert. Die Markierung der DNA erfolgt durch das in der Reaktionsmischung enthaltene Biotin-11-dUTP. Zur Markierung der Sonde wurde zunächst ein PCR-Produkt mit genspezifischen Primern generiert. Die Markierung der Sonde erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Alle benötigten Reagentien lagen dem Kit bei.

2.10.7.2 Restriktionsverdau, Auftrennung der DNA und Blotten

Zwei Mikrogramm chromosomaler DNA wurden zunächst vollständig mit einem Restriktionsenzym über Nacht hydrolysiert, wobei das Enzym so gewählt wurde, dass die nach der Detektion erhaltenen Fragmente eine deutliche Unterscheidung zwischen den zu untersuchenden Genotypen ermöglichten. Nach der Hydrolyse wurden die DNA-Fragmente in einem 0,8 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (60V, ca. 120 min) und das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und dokumentiert.

Ein Stück kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ eingeweichter Nylonmembran (Hybond, Amersham), das etwa 1 cm breiter und länger als die darübergelegte Maske war, wurde luftblasenfrei auf die Ansaugfläche des Vakuumbloiters (Model 785 Vacuum Blotter, BioRad, München) gelegt. Nach dem die angefeuchtete Maske auf die Membran aufgebracht worden war, wurde das Gel ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt.

Für den Transfer der DNA auf die Membran wurden die nachfolgend aufgeführten Lösungen nacheinander für die angegebene Zeitspanne direkt auf das Gel aufgebracht. Vor einem Lösungswechsel wurde die zuvor aufgebrachte Lösung vollständig abgenommen. Das Vakuum wurde während des gesamte Prozesses konstant bei 10'' Hg (0,34 bar) gehalten. Nach dem Ende des Blottens wurde die Membran kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen, zwischen Whatman Papier (Blotting Papiere GB02, Schleicher und Schuell) getrocknet und schließlich zur Fixierung der DNA für eine Minute UV Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) ausgesetzt.

Depurinisierung

HCl	250 mM	1 x 10 min
-----	--------	------------

Waschen

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$		2 x 1 min
---------------------------------------	--	-----------

Denaturierung

NaOH	0,5 M	2 x 15 min
------	-------	------------

NaCl	1,5 M	
------	-------	--

Waschen

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$		2 x 1 min
---------------------------------------	--	-----------

Neutralisierung

Tris-HCl (pH 7,5)	0,5 M	2 x 15 min
NaCl	3 M	

Blotting

20 x SSC		2 h
Na-Citrat (pH 7,0)	0,3 M	
NaCl	3 M	

2.10.7.3 Hybridisierung der DNA

Die Hybridisierung der auf der Membran fixierten DNA erfolgte in einem Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen). Um ein unspezifisches Binden der Sonde an die Membran zu verhindern, wurde vor der eigentlichen Hybridisierung eine Blockierung mit Hilfe einer Blockierungslösung (Roche, Mannheim), die DNA aus Lachssperma oder Hefezellen enthielt, durchgeführt.

Zur Prähybridisierung wurde die Nylonmembran mit der DNA-tragenden Seite nach innen zusammen mit 25 ml Prähybridisierungslösung in ein Hybridisierungsröhrchen (Ochs, Bovenden) gegeben und für 2 h bei 68 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl hitzedenaturierter DIG-markierter Sonde zugegeben und bei 68°C für 16 h inkubiert. Um ungebundene und unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag mit den Niedrigsalzpuffern Puffer 1 (2 x 15 min, RT) und Puffer 2 (2 × 15 min bei 68 °C) gewaschen.

Hybridisierungslösung

SSC (20 x)		25 % (v/v)
Blocking Stammlösung (10 %)		10 % (v/v)
N-Laurylsarcosin (10 %)		1 % (v/v)
SDS (10 %)		0,2 % (v/v)
H ₂ O _{bidest.}	ad	50 ml

10 % Blocking Stammlösung

Blocking Reagent		10 g
Maleinsäurepuffer	ad	100 ml

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	1	M
NaCl	1,5	M
pH 7,5		

Puffer I

SSC (20 x)	10	%	(v/v)
SDS (10 %)	0,1	%	(v/v)

Puffer II

SSC (20 x)	0,5	%	(v/v)
SDS (10 %)	0,1	%	(v/v)

2.10.7.4 Kolorimetrische Detektion der Sonden

Die kolorimetrische Detektion der Sonden erfolgte mit dem Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Dabei werden Biotin markierte Sonden-Ziel-DNA-Hybride mit Konjugaten aus alkalischer Phosphatase und Streptavidin detektiert.

Streptavidin, ein Biotin bindendes Protein aus *Streptomyces avidinii*, geht eine starke, nicht kovalente Bindung mit Biotin ein, die auch nicht durch externe Einflüsse aufgelöst werden kann. Die an das Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase spaltet das Substrat BCIP-T (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, p-Toluidine Salz), was zur Bildung eines unlöslichen blauen Präzipitats auf der Membran führt. Sämtliche zur kolorimetrischen Detektion benötigten Reagenzien und Protokolle lagen dem Kit bei.

2.10.8 Transformationsverfahren**2.10.8.1 Herstellung von Zellen zur Hitzeschocktransformation (Sambrook *et al.*, 1989)**

Eine Hauptkultur (250 ml SOB in 1 L Schikanekolben) wurde mit 1 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli* Vorkultur beimpft und bei 18°C in einem Schüttelwasserbad (Gyrotory, Modell G76, New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,7 angezogen. Nach 10 minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 Minuten, 5000 rpm, 4°C, SLA 3000 Rotor) geerntet, in 80 ml eiskaltem TB Puffer vorsichtig resuspendiert, weitere 10 min auf Eis gestellt und noch einmal abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem TB-Puffer aufgenommen, mit 1,4 ml DMSO (Endkonzentration: 7 % (v/v)) versetzt, sorgfältig gemischt, erneut auf Eis gestellt und in Aliquots à 100 µl auf

vorgekühlte Eppendorf-Gefäße verteilt. Die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

TB- Puffer

PIPES Puffer	10	mM
MnCl ₂	55	mM (getrennt autoklaviert)
CaCl ₂	15	mM
KCl	250	mM

pH 6,7 (Einstellen mit 1 M NaOH)

2.10.8.2 Transformation durch Hitzeschock

Eppendorf-Gefäße mit 100 μl der eingefroren kompetenten Zellen (II.3.12.1) 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 50 s bei 42°C wurden die Zellen nochmals für drei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 700 μL LB-Medium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C zur Ausprägung der Selektionsmarker inkubiert. 100 bzw. 500 μl wurden auf Agarplatten unter Selektivbedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.10.8.3 Herstellung von Zellen zur Elektroporation (Sambrook *et al.*, 1989)

Aus einer gut gewachsenen *E. coli* Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,6 bei 37°C angezogen. Nach Abkühlen der Kultur für 10 Minuten auf Eis, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 20 min, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet gewogen und je Gramm Nassgewicht wurden 1 ml eiskaltes 10 %iges (v/v) Glycerin zugesetzt. Die Zellen wurden aliquotiert (60 μl), sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.10.8.4 Transformation durch Elektroporation

Die eingefrorenen Zellen (II.3.12.3) wurden für fünf Minuten auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 0,1 – 1 μg DNA Lösung wurde der Ansatz in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette überführt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Für die

Elektroporation mittels eines Elektroporationsgeräts (GenePulser II, Bio-Rad GmbH, München) wurde die folgende Bedingung gewählt:

Kapazität	25	μF
Spannung	2,5	kV
Widerstand	200	Ω

Die sich ergebenden Entladungszeiten sollten zwischen 4,5 und 5 ms liegen. Nach der Elektroporation wurde den Ansätzen sofort 800 μl vorgewärmtes LB-Medium zusetzt und diese für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 10 bzw. 100 μl dieser Ansätze wurden auf Agarplatten unter Selektivbedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.10.9 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* S17-1 (Simon *et al.*, 1983), der den RP4 Apparat ausbilden kann. Die folgende Beschreibung geht von einer Anzucht von *G. oxydans* auf VM + 50 mM D-Mannitol (II.2.1.1) aus. Die im Vollmedium verwendete Kohlenstoffquelle wurde jedoch dem Substratspektrum des zu deletierenden Gens angepasst. *G. oxydans* wurde aus einer Stammkultur in 5 ml Vollmedium mit 50 mM D-Mannitol übertragen und bei 30°C unter Schütteln (150 rpm) bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert. Diese Vorkultur diente als Inokulum für eine 20 ml Hauptkultur, die ebenfalls 50 mM D-Mannitol als Kohlenstoffquelle enthielt. 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* S17-1 mit dem zu konjugierenden Plasmid in einer 5 ml LB-Kultur, die das plasmidspezifische Antibiotikum enthielt, über Nacht bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) angezogen. Aus dieser Vorkultur wurde eine 5 ml LB- Kultur (mit Selektionsdruck) 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* S17-1 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 exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurden 1 ml des Donors durch Zentrifugation (4000 rpm, 10°C, 5 min) pelletiert und das erhaltene Pellet in 2 ml frischem LB Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation

wurden auf das erhaltene Pellet 6 ml einer Kultur von *G. oxydans* gegeben. Das *E. coli* Pellet wurde in der *G. oxydans* Kultur resuspendiert und die Suspension wiederum zentrifugiert (4000 rpm, 10°C, 5 min). Nach Abnehmen der Überstandes wurde das Pellet aus Donor und Rezipient in 1 ml frischem VM + 50 mM D-Mannitol resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine VM + 50 mM D-Mannitol Platte getropft, unter der Sterilbank getrocknet und nachfolgend bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Die gebildeten Zellen wurden mit 800 µl VM + 50 mM D-Mannitol abgeschwemmt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf VM-Platten + 50 mM D-Mannitol mit 50 µg/ml Cefoxitin und 50 µg/ml Kanamycin plattiert und anschließend 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.

2.10.10 Einfügen chromosomaler Deletionen in *G. oxydans* DSM 7145

Zur Generierung chromosomaler Deletionen in *G. oxydans* wurde das von (Schäfer *et al.*, 1994) beschriebene System modifiziert. Dieses beruht auf zwei Schritten: Der Integration und der nachfolgenden Excision des Deletionsvektors über DNA- Abschnitte, die zu der Zielsequenz homolog sind. Zur Selektion und Detektion der seltenen Doppelcrossover-Ereignisse zwischen der chromosomalen DNA des Zielorganismus und den homologen Regionen des Vektors diente das Km^R/*sacB* Systems des Vektors pK19mobsacB.

Die Größe der homologen Regionen scheint großen Einfluss auf Rekombinationseffizienz zu haben. In dieser Arbeit wurden Homologieregionen mit einer Größe von 750 – 1000 bp verwendet, die so gewählt wurden, dass sie die zu deletierende Region flankierten.

Im ersten Schritt des hier verwendeten Systems integriert der in *G. oxydans* nicht replizierbare Vektor pK19mobsacB, der durch Konjugation in die Zellen transferiert wurde, in das Chromosom. Die erfolgreiche Integration wurde über das auf dem Vektor enthaltene *neo* Gen selektiert, das den Zellen, die den in das Chromosom integrierten Vektor enthielten, ein Wachstum auf Kanamycin haltigem Medium ermöglichten. Um markerfreie Deletionen zu erhalten war ein zweiter Schritt, i.e. die Excision des Vektors aus dem Chromosom, notwendig. Klone, die den Vektor verloren hatten, wurden über den Verlust der Kanamycin-Resistenz selektiert, da das ebenfalls auf dem Vektor pK19mobsacB enthaltene *sacB* Gen nicht zur Identifizierung der Excision in *G. oxydans* verwendet werden konnte. Das Herausschneiden des Deletionsvektors kann entweder zur Wiederherstellung des „Wildtyp“ Genotyps oder zur gewünschten Deletion führen. Im ersten Fall erfolgt die Rekombination

über die gleiche homologe Region, die auch zur Integration des Vektors führte. Im zweiten Fall erfolgt die Rekombination über die zweite vorhandene homologe Region.

Folgende Arbeitsschritte wurden zur Generierung chromosomaler Deletionen in *G. oxydans* durchgeführt: Die Deletionsvektoren, die die Homologieregionen trugen, wurden durch Konjugation in *G. oxydans* transferiert. Die durch den RP4 Apparat vermittelte Konjugation wurde gewählt, da sie eine hohe DNA Transfereffizienz besitzt und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Integration des Deletionsvektors in das Chromosom besteht (Simon *et al.*, 1983). Eine Selektion der Integranten erfolgte durch Plattieren des Konjugationsansatzes (II.3.12.5) auf VM + 50 mM D-Mannitol Platten, die 50 µg/ml Kanamycin und 50 µg/ml Cefoxitin enthielten. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR und Southern Blot Analyse auf die Anwesenheit des Deletionsvektors im Chromosom untersucht. *G. oxydans* Klone, in denen die Integration des Vektors in das Chromosom verifiziert worden war, wurden für 48-72 h in 5 ml VM + 50 mM D-Mannitol (II.2.1.1) inkubiert (150 rpm, 30°C). Aus diesen Kulturen wurden verschiedene Verdünnungen auf VM + 50 mM D-Mannitol Platten plattiert und für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien von diesen Platten wurden mit sterilen Zahnstochern jeweils auf Agarplatten mit VM + 50 mM D-Mannitol + Kanamycin (50 µg/ml) und Agarplatten mit VM + 50 mM D-Mannitol in ein Raster übertragen. Diese Platten wurden für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert und das zweite Rekombinationsereignis anhand des fehlenden Wachstums auf dem kanamycinhaltigen Medium und dem Wachstum auf Vollmedium ohne Selektionsdruck identifiziert. *G. oxydans* Klone mit dem beschriebenen Phänotyp wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein der gewünschten Deletion untersucht oder auf Reversion zum Wildtyp untersucht. Der Genotyp der erhaltenen Mutanten wurde durch eine Southern Blot Analyse bestätigt (II.3.11).

2.10.11 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RLM-RACE)

Die Rapid Amplification of cDNA Ends dient der schnellen Vervielfältigung von cDNA Enden durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und ermöglicht die Ermittlung der Sequenz eines Transkripts. Die RLM RACE ist eine Weiterentwicklung der klassischen RACE und bietet den Vorteil, dass die cDNA nur von mRNA mit einer intakten *cap*-Struktur amplifiziert wird und damit das gesamte 5'-Ende der cDNA untersucht werden kann. Dazu wird die Gesamt-RNA zunächst mit Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) behandelt, um freie 5'-Phosphatenden von ribosomaler RNA und fragmentierter mRNA und

fragmentierter tRNA zu entfernen. Die *cap* Struktur an intakten 5' mRNA- Enden wird durch die CIAP Behandlung nicht verändert und im folgenden Schritt durch die Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) von der Vollängen-mRNA abgespalten. An das zurückbleibende 5'-Monophosphat wird anschließend durch die T4 RNA Ligase ein 45 Basen RNA Adapter ligiert, der nicht an dephosphorylierte RNA binden kann, da hier das 5'-Monophosphat fehlt (Maryama & Sugano, 1994; Shaefer, 1995) Durch die *random primed* Reverse Transkription und die darauf folgende *nested* PCR wird das 5'-Ende eines spezifischen Transkriptes amplifiziert. Dabei bindet einer der verwendeten Primer im RNA-Adapter, während der zweite Primer in *antisense* Richtung im zu untersuchenden Gen bindet. Eine Sequenzierung des PCR Produktes ermöglicht schließlich die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes. Dieser liegt unmittelbar nach einer Folge von 3 Adeninbasen am Ende des RNA Adapters. In dieser Arbeit wurde das FirstChoice[®] RLM RACE kit (Ambion, Austin, U.S.A) verwendet. Alle notwendigen Protokolle und Reagentien lagen dem kit bei. Die verwendeten genspezifischen Primer sind in Tabelle A im Anhang aufgeführt.

2.10.12 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte durch das Göttingen Genomics Laboratory (Göttingen, Deutschland). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden durch das Gap4 Programm des Staden Pakets (Bonfield *et al.*, 1995) editiert.

2.11 Techniken für das Arbeiten mit RNA

2.11.1 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.

2.11.2 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°C gelagert.

Für den Aufschluss wurde der Zylinder der Zelmühle mit Chromstahl-Kugel in Flüssigstickstoff vorgekühlt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in 200 µl 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 µl Mercaptoethanol zugesetzt wurden. Dieser Puffer wirkt aufgrund einer hohen Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration stark proteindenaturierend und damit RNase inhibierend.

2.11.3 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 x 150 µl RNase freiem und sterilem H₂O_{bidest.} verwendet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -70°C gelagert.

2.11.4 Hydrolyse chromosomaler DNA in der RNA-Präparation

Zum Abbau von in der RNA Präparation enthaltener chromosomaler DNA wurde ein DNase-Verdau der RNA Lösung durchgeführt. Dazu wurden zu den maximal 300 µl wässriger RNA Lösung (II.4.3) wurden 65 µl 5x DNase-Puffer und 20 µl DNase (10 U/µl; Roche, Mannheim, Deutschland) gegeben. Nach der dreistündigen Hydrolyse der DNA durch Inkubation bei 25°C, wurde die DNase durch 10 minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die vollständige Hydrolyse der DNA wurde mittels PCR (II.4.5) 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.

2.11.5 PCR zur Kontrolle der DNA-Hydrolyse

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

RNA-Präparation	3	μl
Taq-Reaktionspuffer, +(NH ₄) ₂ SO ₄ , -MgCl ₂ (10x)	2	μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6	μl
Primer <i>sldA</i> _for (10 pmol/μl)	2	μl
Primer <i>sldA</i> _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

PCR Programm:

Denaturierung	95°C	3	min
Denaturierung	95°C	1	min
Annealing	67°C	1	min
Elongation	72°C	2,25	min
Elongation	95°C	5	min
30 Zyklen			

2.11.6 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 Zentrifugationsschritt (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.

2.11.7 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration von RNA erfolgte analog der Konzentrationsbestimmung von DNA (2.5.2.4.). Dabei entsprach eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

2.11.8 Analyse der RNA-Integrität mit dem Bioanalyser 2100 (Agilent)

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 Auftrag 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.

2.11.9 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:

RNA (1 µg)	x	µl
One Step RT PCR Puffer 5x	5	µl
Primer <i>sldB_for</i> (10 pmol/µl)	2,5	µl
Primer <i>sldB_rev</i> (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	0,75	min
Elongation	72°C	10	min

30 Zyklen (Schritt 3 bis 5)

2.12 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 -/- oder 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:

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

$$\text{wo } \Delta\Delta C_t \text{ für Gen } j = (C_{t,j} - C_{t,\text{endogene Kontrolle}})_{\text{Bedingung 1}} - (C_{t,j} - C_{t,\text{endogene Kontrolle}})_{\text{Bedingung 2}}$$

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 μ l des *Premix* zugegeben. Der PCR Ansatz hatte insgesamt die folgende Zusammensetzung:

RNA (450 ng)	x μ l
Primer 1 (5 pmol/ μ l)	2,5 μ l
Primer 2 (5 pmol/ μ l)	2,5 μ l
QuantiTect Mastermix	12,5 μ l
Enzym Mix	0,25 μ l
H ₂ O _{bidest.}	25-x μ l

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

2.13 Northern Blot (Alwine *et al.*, 1977)

Der Northern Blot dient der Untersuchung der Expressionsstärke und Transkriptlänge von mRNA. Dazu wird die mRNA zunächst in einem denaturierenden Gel der Größe nach aufgetrennt und nachfolgend auf eine Membran transferiert. Die Detektion erfolgt durch markierte Sonden, die komplementär zu der zu untersuchenden RNA Sequenz sind.

2.13.1 Markierung der Sonden

Die RNA Sonden wurden mit dem DIG Northern Starter Kit (Roche Diagnostics) mit Digoxigenin (DIG) markiert. Zunächst wurde das für die Sonde ausgewählte DNA Fragment (5'- Bereich des zu untersuchenden Gens) mittels PCR amplifiziert, wobei der Reverse Primer die Sequenz für den T7 Polymerase Promotor enthielt. Nach Aufreinigung wurde das PCR Produkt in einem *in vitro* Ansatz zu RNA transkribiert und dabei mit DIG markiert. Die Markierung der RNA Sonde erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Dieser schloss sich eine Fällung der RNA (xyz) und die Resuspension in 30 µl H₂O_{bidest.} an.

2.13.2 Elektrophorese und Blotting der RNA

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in denaturierenden Agarosegelen (1%). Dazu wurde die erforderliche Menge Agarose in 81,5 ml H₂O_{bidest.} und 10 ml 10 x MOPS Puffer aufgekocht.

Die heiße Agarose wurde in einem Wasserbad auf 65°C temperiert und nachfolgend 8,5 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben. Nach 20 min bei 65°C wurden die Gele in gereinigte Gelkammern gegossen. Nach Überschichten der Gele mit Laufpuffer (1x MOPS) wurden die Kämme entfernt und für 10 min ein Vorlauf bei 100 V durchgeführt.

MOPS Puffer (10x)

MOPS	200	mM
Natriumacetat	50	mM
EDTA	10	mM
pH 7,0		

Zur Probenvorbereitung wurden 5 µg RNA bzw. 3 µl RNA Marker (High Range RNA Ladder; Fermentas, St. Leon-Rot) mit H₂O_{bidest.} auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl 2x RNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Unmittelbar vor dem Auftragen auf das denaturierende Formaldehyd-Gel wurden die Proben für 20 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Die Gele wurden mit den RNA Proben und dem RNA-Molekulargewichtsstandard beladen und bei 70 V, abhängig von der Größe der nachzuweisenden RNA und der Agarosekonzentration, für 2-2,5 h aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel dokumentiert und zweimal für 10 min in H₂O_{bidest.} geschwenkt. Nach einer weiteren Behandlung des Gels in 50 mM NaOH (30 min) und 20 x SSC (45 min) (Sambrook *et al.*, 1989) wurde die RNA durch einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Nylon Membrane, positively charged, Roche, Mannheim) übertragen (Chomczynski & Mackey, 1994). Dazu wurde die Membran kurz in H₂O_{bidest.} und 20 min in 20 x SSC geschwenkt. Auf ein Plastikpodest wurden eine Pufferbrücke aus Whatman-Papier, drei Lagen Whatman-Papier, das umgedrehte Gel, die Membran, wiederum drei Lagen Whatman-Papier und schließlich ca. 5 cm Küchenpapier gelegt und dieses in eine Schale mit 300 ml 20 x SSC Puffer gestellt. Der Blot wurde mit einem Gewicht (500 g) beschwert und für 18 h bei Raumtemperatur belassen.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Entfernung von Agaroseresten kurz in 6x SSC Puffer geschwenkt und die RNA danach mittels UV Licht auf der Membran fixiert. Schließlich wurde die Membran an der Luft getrocknet. Unter UV Licht wurden die Banden des RNA Größenstandards mit einem Kugelschreiber markiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran trocken und staubfrei gelagert.

2.13.3 Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG markierten Sonden

Die Hybridisierung der membrangebundenen RNA mit den DIG markierten Sonden erfolgte in einem Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen). Dazu wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen (Ochs, Bovenden) überführt, mit 20 ml Vorhybridisierungspuffer

versetzt, und für zwei Stunden bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und durch 20 ml Hybridisierungslösung, die 10 µl des Transkriptionsansatzes (II.4.11.1) enthielt und für 10 min bei 95°C denaturiert worden war, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und bis zu weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenen RNA Sonden wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT in 50 ml Waschpuffer I sowie dreimal für 15 min bei 68°C in Waschpuffer II inkubiert.

Vorhybridisierungslösung

Formamid (100%)	100	ml
20 x SSC	50	ml
Blocking Lösung (10%)	40	ml
N-Lauroylsarcosin (10%)	2	ml
SDS (20%)	0,2	ml
H ₂ O _{bide} st.	ad	200 ml

Waschpuffer I

SSC (20 x)	20	ml
SDS (20%)	0,2	ml
H ₂ O _{bide} st.	ad	200 ml

Waschpuffer II

SSC (20 x)	1	ml
SDS (20%)	0,2	ml
H ₂ O _{bide} st.	ad	200 ml

2.13.4 Detektion von RNA/RNA-Hybriden

Der Nachweis von RNA/RNA-Hybriden schloss sich direkt an die Hybridisierung an. Die Membran wurde zunächst für 5 min in Puffer I, dann für 30 min in Puffer II geschwenkt. Dem folgte die Detektion der hybridisierten Sonden durch an alkalischen Phosphatase gekoppelte Anti-DIG Antikörper (30 min), die im Verhältnis 1:10000 in Puffer II gelöst waren. Anschließend wurde die Membran zweimal für 30 min in Puffer I und für 5 min in Puffer III

gewaschen. Schließlich wurde die Membran zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und mit 1 ml Puffer III, der 5 μ l des Substrates CDP-Star enthielt, für 5 min inkubiert. Die an die Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase spaltet das Substrat CDP-Star. Durch die dabei entstehende Chemilumineszenz können die RNA-RNA-Hydrate in einem Lumi-Imager TM sichtbar gemacht werden.

Puffer I

Maleinsäure	100	mM
NaCl	150	mM

Puffer II

Blockierungsreagenz (10%)	10	ml
Puffer I	1	ml
H ₂ O _{bide} st.	ad	100 ml

Puffer III

Tris	0,1	M
NaCl	0,1	M
pH	9,5	

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 Standardtechniken

2.14.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach Bradford (1976). Diese Methode beruht auf der Affinität des Farbstoffes ‚Coomassie-Brilliant-Blue G-250‘ gegenüber basischen und aromatischen Aminosäuren. In saurer Lösung wird die anionische Form des Reagenz stabilisiert, wodurch das Extinktionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Je größer die Proteinkonzentration in der Probelösung, desto stärker ist die Absorption bei 595 nm.

Die Probe wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Roth) gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in 1 ml Küvetten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 595 nm in einem UV/Vis Spectrophotometer Typ Ultrospec®3300pro (Amersham Pharmacia

Biotech). Als Leerwert diente eine Küvette, die anstelle der Probe $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ enthielt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen aus den gemessenen Extinktionen wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Dazu wurden Proben mit 0,1 - 1 mg/ml BSA mit 1 ml Bradford Reagenz gemischt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte wiederum gegen einen Leerwert der $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ anstelle der Probe enthielt.

2.14.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Membranfraktionen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Membranfraktionen erfolgte nach der Methode von Bradford (II.5.1.4) mit der von Pestov & Rydström (2007) beschriebenen Modifikation. Die Inkubation der Membransuspension mit 1 % Octylglucosid verhindert die Präzipitation von Membranproteinen und ermöglicht somit eine genauere Bestimmung der Proteinkonzentration. 9,5 μl Membransuspension wurden mit 0,5 μl Octylglucosid (20 %) gemischt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde mit 1 ml Bradford Reagenz vermischt und wie unter II.5.1.4 beschrieben weiterbehandelt.

2.14.1.3 Konzentration von Proteinlösungen

Um Proteinlösungen einzuengen, wurden Mikrokonzentratoren (Amicon Ultra, Millipore, Cork, Irland) mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa verwendet. Dabei konnten Proteinlösungen von 14 ml auf 200 μl eingengt werden. Die Zentrifugation erfolgte in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg) bei 3000 rpm.

2.14.2 Zellernte und Gewinnung von cytoplasmatischen Extrakten von *G. oxydans*

G. oxydans wurde wie unter II.2.2.1 beschrieben angezogen. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C für 10 min. Das erhaltene Pellet wurde nach Bestimmung des Nassgewichtes bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Zur Gewinnung von Cytoplasma- und Membranfraktion wurde das Pellet zunächst in Waschpuffer resuspendiert, wobei je Gramm Nassgewicht 50 ml Puffer zugegeben wurden. Nach einer Zentrifugation (8000 rpm, 4°C, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und der Waschschritt wiederholt. Für den Zellaufschluss wurde wiederum zunächst das Nassgewicht bestimmt und je Gramm Pellet 10 ml Aufschlusspuffer zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch zweimalige Passage durch eine „French Pressure Cell“ (American Instrument Company, Silver Spring, U.S.A.). Das zähflüssige Lysat wurde in SS34-Zentrifugenbechern aufgefangen und zur Abtrennung von Zelltrümmern bei 11000 rpm

Unter Einbeziehung der Anfangssteigung der Reaktionskurve, des Extinktionskoeffizienten von DCPIP ($5,016 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der Proteinkonzentration wurde die spezifische Aktivität der Dehydrogenase gegenüber des eingesetzten Substrates bestimmt.

MacIlvaine Puffer (pH 5,0)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	200 mM	51,5 ml
Citronensäure-Monohydrat	100 mM	48,5 ml

2.14.3.2 Enzymtests zur Messung der Aktivität ausgewählter cytoplasmatischer Dehydrogenasen

Die Messungen erfolgten in 1 ml Plastikkuvetten (Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht) bei 340 nm und 25°C in einem Zweistrahlphotometer (UV-Visible Spectrophotometer, Cary 100 Conc, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt). Nach Aufnahme einer stabilen Grundlinie wurde der Test mit dem Substrat gestartet und die durch die Reduktion von NAD^+ bzw. NADP^+ hervorgerufene Zunahme der Extinktion verfolgt. Unter Einbeziehung der Anfangssteigung der Reaktionskurve, der Extinktionskoeffizienten von NAD^+ ($6,27 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bzw. NADP^+ ($6,23 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und der Proteinkonzentration wurde die spezifische Aktivität der Dehydrogenasen gegenüber dem eingesetzten Substrat bestimmt.

2.14.3.3 Enzymtest zur Messung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität (Lamed & Zeikus, 1980)

Glucose 6-Phosphat	(100 mM)	20	μl
NADP^+	(10 mM)	100	μl
MnCl_2	(40 mM)	62,5	μl
Tris-HCl (pH 7,5)	(100 mM)	807,5	μl
Cytoplasmafraktion		10	μl

2.14.3.4 Enzymtest zur Messung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Aktivität

(Lamed & Zeikus, 1980)

6-Phosphogluconat	(100 mM)	20	µl
NAD ⁺	(10 mM)	100	µl
MnCl ₂	(40 mM)	62,5	µl
Tris-HCl (pH 7,5)	(100 mM)	807,5	µl
Cytoplasmafraktion		10	µl

2.14.3.5 Enzymtest zur Messung der Glucose-Dehydrogenase Aktivität

D-Glucose	(250 mM)	100	µl
NADP ⁺	(10 mM)	100	µl
MnCl ₂	(40 mM)	62,5	µl
Tris-HCl (pH 7,5)	(100 mM)	807,5	µl
Cytoplasmafraktion		10	µl

2.14.3.6 Quantifizierung von Essigsäure (Bergmeier und Möllering, 1974)

Die enzymatische Quantifizierung von Essigsäure erfolgte mit einem UV-Test (rbiopharm, Darmstadt) nach der Methode von Bergmeier *et al.* (1974). Dabei wird Essigsäure zunächst durch die Acetyl-CoA-Synthetase unter Verbrauch von ATP und Coenzym A zu Acetyl-CoA umgesetzt. In einer weiteren Reaktion reagiert Acetyl-CoA mit Oxalacetat in Anwesenheit der Citrat Synthase zu Citrat. Das in dieser Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion durch Oxidation von L-Malat durch die L-Malat Dehydrogenase gewonnen. Die damit verbundene Reduktion von NAD⁺ wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt und diente der Quantifizierung der Essigsäure. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers mit der Änderung, dass die Testansätze nicht ein Volumen von 3,23 sondern 0,80 ml hatten. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Proben mit einer Konzentration von 1,6 – 13,1 µg Essigsäure verwendet.

2.15 Analytische Verfahren

2.15.1 Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine Form der Verteilungschromatographie zwischen einer stationären Phase (Trennsäule) und einer mobilen Phase (Laufmittel). Durch den Einsatz von Hochleistungs-Trennsäulen können Substanzgemische, deren Komponenten sich nur geringfügig in ihren

physikalischen oder chemischen Eigenschaften unterscheiden, mit hoher Auflösung analysiert werden.

2.15.1.1 Detektion von Zuckern und Zuckeralkoholen

Zur Quantifizierung von Zuckern und Zuckeralkoholen wurde das Dionex DX-500 HPLC System (Dionex, Idstein) mit einer Carbopac MA-1 oder einer Carbopac PA-1 Säule mit Vorsäule verwendet. Die zu analysierenden Substanzen wurden in einer isokratischen Methode mit Natronlauge der folgenden Konzentrationen von den Säulen eluiert:

Säule	Eluent
Carbopac MA-1	480 mM NaOH
Carbopac PA-1	250 mM NaOH

Bei beiden verwendeten Säulen handelt es sich um Anionenaustauschersäulen. Die Trennung der Substanzgemische beruht auf elektrostatischen Interaktionen zwischen den Analyten und den funktionellen Gruppen des Säulenmaterials. Funktionelle Gruppe beider Säulenmaterialien ist ein quartäres Ammoniumion, das jedoch in unterschiedlicher Weise an die Säulenmatrix gebunden ist. Die makroporöse Struktur der Carbopac MA-1 Säule ermöglicht auch die Bindung von schwach ionisierbaren Substanzen, während die pellikuläre Struktur der Carbopac PA-1 Matrix eine hohe Effizienz gewährleistet.

Zur Detektion wurden die Substanzen in obigen Eluenten, die einen hohen pH-Wert aufweisen, an einer Goldelektrode oxidiert und die dadurch entstehenden Signale mittels eines elektrochemischen Detektors (ED 400) aufgefangen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte anschließend mit der Dionex Chromeleon Software, Version 6.80, SP2.

2.15.1.2 HPLC Analyse von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose

Kulturüberstände aus Wachstumsversuchen und Biotransformationen wurden je nach Konzentration von Edukt und Produkt im Verhältnis 1:100 oder 1:400 mit H₂O_{bidest.} verdünnt. Das auf die Säule injizierte Probevolumen betrug 25 µl. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardkurve von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose, die in Konzentrationen von 31,25 – 1000 µM auf die Säulen gegeben wurden. Die beiden Substanzen hatten auf den Säulen die folgenden Retentionszeiten:

Säule	<i>meso</i> -Erythritol	L-Erythrulose
Carbopac PA-1	1,8 min	2,53 min
Carbopac MA-1	10,8 min	26,8 min

2.15.1.3 Detektion von Anionen

Zur Analyse von Anionen wurde ein Dionex ICS-3000 HPLC System (Dionex, Idstein) mit einer AS-11 HC Säule mit Vorsäule verwendet. Dabei handelt es sich um eine Anionenaustauschersäule, deren funktionelle Gruppe ein quartäres Ammoniumion ist. Die Detektion der Ionen erfolgte über einen Leitfähigkeitsdetektor, der die Leitfähigkeit des Eluats misst. Da es sich bei den eingesetzten Eluenten um Elektrolytlösungen mit hoher Eigenleitfähigkeit handelt, wurde zur empfindlicheren Detektion von Anionen ein Suppressorsystem verwendet, das die Grundleitfähigkeit stark vermindert.

Die zu analysierenden Substanzen wurden mit dem folgenden Hydroxidgradienten bei einer Flussrate von 0,38 ml/min von der Säule eluiert:

NaOH (mM)	Dauer (min)
1	18
15	10
30	10
60	2
1	10

2.15.2 Nachweis von Essigsäure durch Gaschromatographie-Massenspektrometrieanalyse (GC-MS-Analyse)

Der Nachweis von Essigsäure in Zellkulturüberständen erfolgte in der Arbeitsgruppe Feussner (Abteilung Biochemie der Pflanze, Universität Göttingen) mit der nachfolgend beschriebenen Methode. Kulturüberstände von *G. oxydans* DSM 7145 angezogen auf VM + *meso*-Erythritol und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* angezogen auf VM + D-Glucose wurden im Verhältnis 1:20 in Hexan verdünnt. Nach Zugabe von je 1 μ l reinem N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid zu 10 μ l der verdünnten Überstände erfolgte die Analyse der Trimethylsilylester auf einem Gaschromatographen (Agilent 6890, Agilent, Waldbronn), der an einen Massendetektor (Agilent 5973, Agilent, Waldbronn) gekoppelt war. Als Trägergas wurden Helium mit einer Flussrate von 0,8 ml/min eingesetzt. Der verwendete Temperaturgradient hatte die folgenden Parameter:

Temperatur (°C)	Dauer (min)
40	4
40 – 200	25 K/min
200	4

Die eingesetzte Elektronenenergie hätte eine Stärke von 70 eV bei einer Temperatur der Ionenquelle von 230°C. Der Essigsäurenachweis erfolgte anhand der Ionen mit einem m/z von 75 und 117 ($R_f = 2,9$ min).

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Inaktivierung der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase von *G. oxydans* DSM 7145

Die Arbeiten von Shinjoh *et al.* (2002) und Matsushita *et al.* (2003) an *G. suboxydans* IFO 3255 bzw. *G. suboxydans* IFO 3257 zeigten, dass diese Stämme über ein membranständiges Enzym mit einem breiten Substratspektrum, das C3-C6 Polyole und 5-Keto-D-Gluconat umfasst, verfügen. Aufgrund des breiten Substratspektrums führten Matsushita *et al.* (2003) für diese Glycerin-Dehydrogenase (EC 1.1.99.22) auch die Bezeichnung Major Polyol Dehydrogenase ein.

Die Genomsequenz von *G. oxydans* ATCC 621H (Prust *et al.*, 2005) manifestierte, dass auch in diesem Stamm ein Homolog zu der aus den *sldAB* Genen bestehenden Glycerin-Dehydrogenase vorliegt. Auf Grundlage dieser Daten wurde im ersten Abschnitt der Arbeit untersucht, ob auch in *G. oxydans* DSM 7145, dem Typstamm der Gattung *Gluconobacter*, Homologe der *sldAB* Gene zu identifizieren sind. Die Inaktivierung der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase sollte nachfolgend Aufschluss über das Substratspektrum des Enzyms in *G. oxydans* DSM 7145 geben und zeigen, ob dieses auch die membranständige *meso*-Erythritol Oxidation vermittelt.

3.1.1 Sequenzanalyse der *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145

3.1.1.1 Amplifikation der *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145

Anhand der Genomsequenz von *G. oxydans* ATCC 621H wurden die Primer *sldB_for*, *sldB_rev* zur Amplifikation des *sldB* Gens und die Primer *sldA_for*, *sldA_rev* zur Amplifikation des *sldA* Gens von *G. oxydans* DSM 7145 abgeleitet. Mit genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 als Matrize wurde für das *sldB* Gen ein Produkt mit einer Größe von ~ 450 bp erhalten, während die Amplifikation mit den Primer *sldA_for*, *sldA_rev* ein Produkt mit einer Größe von ~2,2 kb ergab (Daten nicht gezeigt). Die Größen der erhaltenen PCR-Produkte stimmten gut mit den Größen der *sldAB* Gene aus *G. oxydans* ATCC 621H überein. Das *sldB* Gen hat hier eine Größe von 462 bp, während das *sldA* Gen eine Größe von 2244 bp hat. Auch die Größe des mit der Primerkombination *sldB_for*, *sldA_rev* erhaltenen PCR-Fragments korrelierte sehr gut mit der erwarteten Größe von ~ 2,6 kb. Die PCR-Fragmente wurden zunächst in den Vektor pSC-A kloniert (II.3.9.1) und nachfolgend beide DNA Stränge mit den Primern M13_uni, M13_rev und *sldA_w1* – *sldA_w6* vollständig

sequenziert (II.3.15). Ein Aminosäurealignment der SldB Proteine aus *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H ist in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

3.1.1.2 Sequenz des SldB Proteins von *G. oxydans* DSM 7145

```

DSM7145      MPNTYGSRTLTEWLTLVLGVVIIILVGLFFVIAGADLAMLGGSVYVVICGIPLVAGGVFML 60
ATCC621H     MPNTYGSRTLTEWLTLVLGVVIIILVGLFFVIAGADLAMLGGSVYVVICGIPLVAGGVFML 60
*****

DSM7145      MGRTLGAFLYLGALAYTWVWVSLWEVGFSPVDLLPRDFGPTLLGILVALTIPVLRMETRR 120
ATCC621H     MGRTLGAFLYLGALAYTWVWVSLWEVGFSPVDLLPRDFGPTLLGILVALTIPVLRMETRR 120
*****

DSM7145      TLRGTV 126
ATCC621H     TLRGTV 126
*****

```

Abbildung 3: Alignment (Clustal W) der Aminosäuresequenz des SldB Proteins aus *G. oxydans* ATCC 621H und *G. oxydans* DSM 7145. Sterne bezeichnen identische Aminosäurereste in beiden Sequenzen. Mögliche Transmembranhelices sind durch Unterstreichung der entsprechenden Aminosäurereste gekennzeichnet.

Abbildung 3 verdeutlicht, dass die SldB Proteine aus *G. oxydans* ATCC 621H und *G. oxydans* DSM 7145 absolut identisch sind. Es handelt sich um äußerst hydrophobe Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa. Mittels des TMHMM Servers wurden vier mögliche Transmembranhelices, die der Verankerung des Proteins in der Membran dienen, vorhergesagt. Ein Datenbankabgleich mit dem BlastP-Algorithmus (Blast P 2.2.1) (Altschul *et al.*, 1997) ergab neben der Identität zu dem SldB Protein aus *G. oxydans* ATCC 621H hohe Ähnlichkeiten zu den SldB Proteinen aus *Gluconobacter suboxydans* IFO3255 und *Gluconobacter frateurii*.

Tabelle 4: Übersicht über Proteine mit Herkunftsorganismen, die eine Sequenzähnlichkeit zum SldB Protein aus *G. oxydans* DSM 7145 aufweisen. Die Referenzen beziehen sich auf die GenBank Einträge (Stand Mai 2009); *G.*: *Gluconobacter*; *R.*: *Rhodopseudomonas*; *P.*: *Phenylobacterium*; DH: Dehydrogenase

Bezeichnung	Organismus	Identität (%)	Referenz
D-Sorbitol DH Untereinheit SldB	<i>G. oxydans</i> ATCC 621H	100	ref YP_191285.1
Glycerin DH kleine Untereinheit	<i>G. suboxydans</i> IFO3255	85	sp Q8L1D5.3 SLDB2_GLUOX
Glycerin DH kleine Untereinheit	<i>G. frateurii</i>	86	dbj BAF630117.1
PQQ abhängige DH	<i>R. palustris</i> TIE-1	41	ref ZP_02300489.1
Glucose DH (PQQ) abhängig	<i>P. zucineum</i> HLK1	38	ref YP_002130431.1

In der Tabelle 4 sind in den Zeilen vier und fünf zwei weitere Proteine aufgeführt, die Ähnlichkeit zum SldB Protein aufweisen. Bei diesen Enzymen handelt es sich um membranständige, PQQ abhängige Dehydrogenasen, deren N-terminale Regionen dem SldB

Protein ähnelten. Die N-terminalen Regionen membrangebundener Dehydrogenasen spielen bei der Verankerung des Proteins in der Membran und der Weitergabe von Redoxäquivalenten eine wichtige Rolle (Yamada *et al.*, 1993).

3.1.1.3 Sequenz des SldA Proteins von *G. oxydans* DSM 7145

Die Sequenzanalyse des *sldA* Gens von *G. oxydans* DSM 7145 zeigte, dass dieses auf Ebene der Nukleinsäuresequenz eine 99% ige Identität zum *sldA* Gen von *G. oxydans* ATCC 621H aufwies. Das auf der folgenden Seite gezeigte Aminosäurealignment verdeutlicht, dass auf Ebene der Aminosäuresequenzen der SldA Proteine von *G. oxydans* ATCC 621H und *G. oxydans* DSM 7145 lediglich zwei Austausch an den Positionen 178 (Ile → Leu) und 624 (Lys → Glu) nachweisbar waren. Die vorhergesagte Molekularmasse beider Proteine liegt bei ca. 80 kDa. Interessanterweise konnten mittels des TMHMM Servers (Hunter *et al.*, 2009) keine Transmembranhelices zur Verankerung des SldA Proteins in der Cytoplasmamembran vorhergesagt werden. Eine Analyse mit der SignalP 3.0 Software (Bendtsen *et al.*, 2004) identifizierte zudem in der N-terminalen Region des Proteins ein 24 Aminosäurereste umfassendes Signalpeptid. Das Ende des möglichen Signalpeptids ist in Abbildung 4 durch ein Dreieck gekennzeichnet.

Die Strukturaufklärung der Quinoprotein Methanol Dehydrogenase von *Methylobacterium extorquens* (Ghosh *et al.*, 1995) und der Alkohol Dehydrogenase von *Acetobacter aceti* (Cozier *et al.*, 1995) zeigte, dass der Indolring eines Tryptophanrestes und zwei Schwefelatome eines Disulfidringes an der Bindung des Cofaktors PQQ beteiligt sind. Ein Aminosäurealignment dieser Proteine mit dem SldA Protein von *G. oxydans* DSM 7145 ergab, dass der Tryptophanrest (Trp-340), nicht jedoch die Cysteinreste des Disulfidringes im SldA Protein konserviert sind. Das in Abbildung vier hervorgehobene Asp-404 nimmt im SldA Protein die gleiche Position wie das Asp-303 der Methanol Dehydrogenase aus *M. extorquens* ein (Ghosh *et al.*, 1995). Dabei handelt es sich vermutlich um den katalytischen Aminosäurerest, der die Oxidationsreaktion durch Abstraktion eines Protons vom Substrat initiiert .

DSM7145	MRRSHLLATVACATLACAPLAANAQFAPAGSGGSPTSSVPGPGNGSGNSFEPTENTPAAK	60
ATCC621H	MRRSHLLATVACATLACAPLAANAQFAPAGSGGSPTSSVPGPGNGSGNSFEPTENTPAAK	60

DSM7145	SRFSGSPYAPQAPGVNAANLPDIGSMDPNDVPMAPQQSASPASGDWAAYGHDDSQMRY	120
ATCC621H	SRFSGSPYAPQAPGVNAANLPDIGSMDPNDVPMAPQQSASPASGDWAAYGHDDSQMRY	120

DSM7145	SPLSEITPQNADQLKVAFYHTGSYPRPGQTNKWAETTPIKVGDGLYMCSAQNDIMKLD	180
ATCC621H	SPLSEITPQNADQLKVAFYHTGSYPRPGQTNKWAETTPIKVGDGLYMCSAQNDIMKID	180
	*****:	
DSM7145	PATGKEIWRHNINEKYEAIPTYAACKGVTYFTSSQVPEGQPCHNRILEGLTDMRLIAVDA	240
ATCC621H	PATGKEIWRHNINEKYEAIPTYAACKGVTYFTSSQVPEGQPCHNRILEGLTDMRLIAVDA	240

DSM7145	ATGNLCEGFGNGGQVNLMOQLGESVPGFVSMTPPPVNVGVVVNHEVLDGQRRWAPSGV	300
ATCC621H	ATGNLCEGFGNGGQVNLMOQLGESVPGFVSMTPPPVNVGVVVNHEVLDGQRRWAPSGV	300

DSM7145	IRGYDAESGKFLWAWDVNRPNDHSQPTGNNHYSRGTPN SWAAMTGDNALGLVYVPTGNSA	360
ATCC621H	IRGYDAESGKFLWAWDVNRPNDHSQPTGNNHYSRGTPN SWAAMTGDNALGLVYVPTGNSA	360

	340	
DSM7145	SDYYSALRSPEENKVSSAVVALDVKTGSPRWVFTVHKDVWDYDIGSQATLMDMPGQDQG	420
ATCC621H	SDYYSALRSPEENKVSSAVVALDVKTGSPRWVFTVHKDVWDYDIGSQATLMDMPGQDQG	420

	404	
DSM7145	PVPALIMPTKRGQTFVLDRRDGKPIIPVEERPAPSPGVIPGDPRSPTQPWSTGMPALRVP	480
ATCC621H	PVPALIMPTKRGQTFVLDRRDGKPIIPVEERPAPSPGVIPGDPRSPTQPWSTGMPALRVP	480

DSM7145	DLKETDMWGMSPIDQLFCRIKFRRANYTGEFTPPSVDKPWIEYPGYNGGSDWGSVSYDPQ	540
ATCC621H	DLKETDMWGMSPIDQLFCRIKFRRANYTGEFTPPSVDKPWIEYPGYNGGSDWGSVSYDPQ	540

DSM7145	SGILIANWNITPMYDQLVTRKKADELGLMPIDDPNYKPGGGGAEGNGAMDGTPYGIIVVTP	600
ATCC621H	SGILIANWNITPMYDQLVTRKKADELGLMPIDDPNYKPGGGGAEGNGAMDGTPYGIIVVTP	600

DSM7145	FWDQYTGMMCNRPYPYGMITAIDMEHGQKVLWQHPLGTARANGPWGLPTGLPWEIGTPNNG	660
ATCC621H	FWDQYTGMMCNRPYPYGMITAIDMKHGQKVLWQHPLGTARANGPWGLPTGLPWEIGTPNNG	660
	*****:	
DSM7145	GSVVTAGGVVFIAAATDNQIRAIDEHTGKVVWSAVLPGGGQANPMTYEANGHQYVAIMAG	720
ATCC621H	GSVVTAGGVVFIAAATDNQIRAIDEHTGKVVWSAVLPGGGQANPMTYEANGHQYVAIMAG	720

DSM7145	GHHFMMPVSDQLVVYALPDHKG	743
ATCC621H	GHHFMMPVSDQLVVYALPDHKG	743

Abbildung 4: Alignment (Clustal W) der Aminosäuresequenzen des SldA Proteins von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H. Sterne bezeichnen identische Aminosäurereste in beiden Sequenzen. Sequenzunterschiede sind durch einen Rahmen gekennzeichnet. Aminosäurereste, die an der Bindung von PQQ und der Katalyse beteiligt sind, sind fett hervorgehoben. Das Ende des möglichen Signalpeptids ist durch ein Dreieck gekennzeichnet.

3.1.2 Untersuchung der genetischen Organisation der *sldAB* Gene

Die Sequenzanalyse der *sldAB* Gene aus *G. oxydans* DSM 7145 zeigte weiterhin, dass der letzte Buchstabe des Stoppcodons (TGA) des *sldB* Gens mit dem ersten Buchstaben des Startcodons (ATG) des *sldA* Gens überlappte. Somit liegen die *sldAB* Gene, wie auch in

G. oxydans ATCC 621H, in einem Operon vor. Anhand der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels 5' RLM RACE und einer RT PCR wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145 kotranskribiert werden.

3.1.2.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der *sldAB* Gene

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der *sldAB* Gene wurde zunächst die Gesamt RNA von *G. oxydans* DSM 7145 Zellen, die auf VM mit 50 mM D-Mannitol angezogen worden waren, präpariert (II.4.3). Die so erhaltene RNA diente als Ausgangsmaterial zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels 5' RLM-RACE (II.3.14). Bei der auf die cDNA Synthese folgenden *nested* PCR mit den Primern RACE_in/*sldB*_RC_in wurde ein Produkt mit einer Größe von 500 bp erhalten, das in den Vektor pSC-A kloniert wurde (II.3.9.1). Die Inserts von vier Klonen wurden sequenziert und anhand der Sequenzanalyse wurde das 24 Basen stromaufwärts vom Startcodon des *sldB* Gens gelegene Thymin als Transkriptionsstart identifiziert. Bei der in Abbildung 5 eingerahmten DNA Sequenz könnte es sich folglich um die -10 Region der *sldAB* Gene handeln.

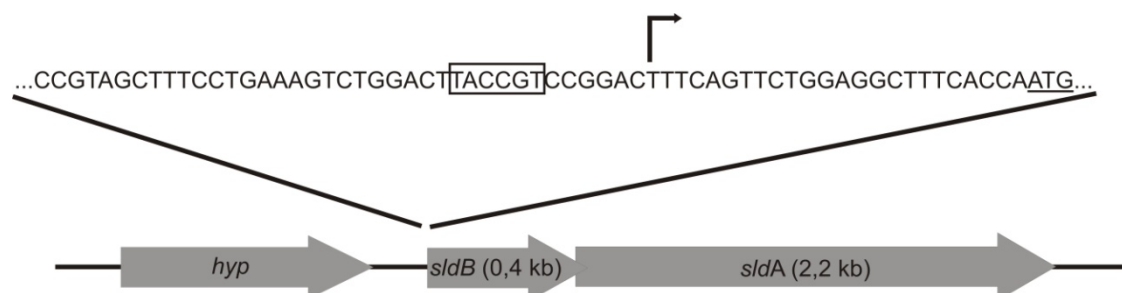


Abbildung 5: Genomische Region der *sldAB* Gene. Das Startcodon des *sldB* Gens ist unterstrichen. Der identifizierte Transkriptionsstartpunkt durch einen gebogenen Pfeil gekennzeichnet. Die mögliche Pribnow Box ist eingerahmt.

3.1.2.2 Untersuchung der Kotranskription der *sldAB* Gene

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der *sldAB* Gene legte die Vermutung nahe, dass diese kotranskribiert werden. Um die Kotranskription zu bestätigen, wurde eine RT PCR mit der Primerkombination *sldB*_for, *sldA*_w2 durchgeführt. Dabei bindet der Primer *sldB*_for am Anfang des *sldB* Gens und der Primer *sldA*_w2 in der Gegenrichtung im *sldA* Gen. Bei einer Kotranskription beider Gene wäre demnach ein Produkt mit einer Größe von 924 bp zu erwarten. Aus Abbildung 6B wird ersichtlich, dass sowohl bei der Gesamt RNA von auf VM + D-Glucose/D-Mannitol angezogenen Zellen (Spur 1) als auch bei der Gesamt RNA von auf VM + D-Glucose angezogenen Zellen (Spur 2) nach der RT PCR eine deutliche Bande mit einer Größe von 920 bp zu erkennen war. Somit zeigte die Bestimmung des

Transkriptionsstartpunktes und die RT PCR mit Primern, die im *sldB* und im *sldA* Gen banden, dass die *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145 kotranskribiert werden.

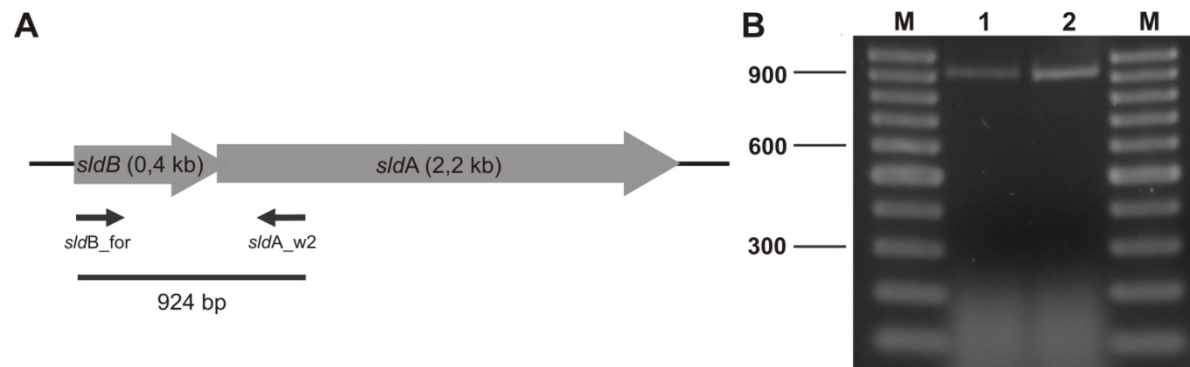


Abbildung 6: Untersuchung der Transkription der *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145. 800 ng Gesamt RNA von *G. oxydans* DSM 7145 angezogen auf VM + D-Glucose bzw. D-Glucose/D-Mannitol wurden mit den Primern *sldB_for* und *sldA_w2* in einer RT PCR eingesetzt. **A** Schematische Abbildung der Anordnung der *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145. Die Bindungstellen der Primer *sldB_for*, *sldA_w2* sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Größe des zu erwartenden PCR-Produktes durch einen schwarzen Balken dargestellt. **B** 1,5% iges Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten der RT PCR. M: 100 bp Marker; Spur 1: Gesamt RNA *G. oxydans* DSM 7145 VM + D-Glucose/D-Mannitol; Spur 2: Gesamt RNA *G. oxydans* DSM 7145 VM + D-Glucose.

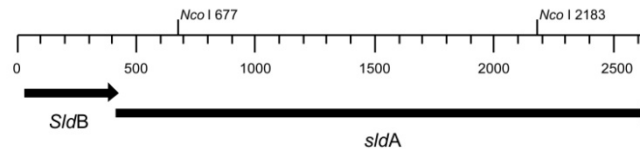
3.1.3 Konstruktion des Deletionsplasmids

Zur Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase wurden zunächst die *sldAB* Gene mit den Primern *sldB_for* und *sldA_rev* aus genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 mittels *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert.

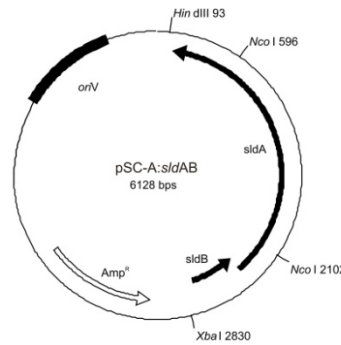
Das erhaltene PCR-Produkt mit einer Größe von 2659 bp wurde in den Vektor pSC-A (II.3.9.1) kloniert und die erfolgreiche Klonierung des PCR-Produktes wurde durch Restriktion der Plasmid DNA überprüft. Das erhaltene Konstrukt pSC-A:*sldAB* wurde nachfolgend mit dem Restriktionsenzym *NcoI* hydrolysiert. Dieses schneidet an den Positionen 256 und 1762 des *sldA* Gens, so dass Homologieregionen von 677 bp (*sldBA'*) bzw. 476 bp (*sldA'*) zurückblieben. Das herausgeschnittene Fragment mit einer Größe von 1506 bp wurde durch eine Gentamycin-Kassette (1030 bp) ersetzt, die zuvor durch einen Restriktionsverdau des Vektors pSC-A:Genta mit *NcoI* gewonnen wurde. Bei der nachfolgenden Restriktionsanalyse wurden diejenigen Plasmide ausgewählt, die die Gentamycin Kassette kolinear zum *sldB* Gen trugen. Das damit erhaltene Plasmid wurde als pSC-A::*sldBA'*_sldA'_Genta bezeichnet. Schließlich wurden die Homologieregionen samt der Gentamycin-Kassette (2261 bp) durch Hydrolyse des Konstruktes pSC-A::*sldBA'*_sldA'_Genta mit *XbaI*, *HindIII* gewonnen und in den mit *XbaI*, *HindIII* hydrolysierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) ligiert.

Abbildung 7 fasst die beschriebenen Schritte zur Konstruktion des Vektor (pJV5) zusammen.

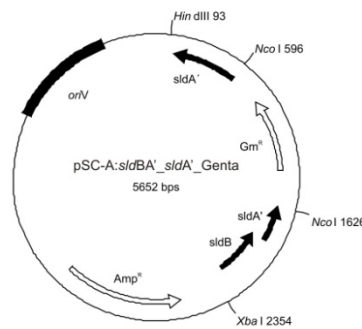
1. PCR Amplifikation der *sldAB* Gene aus genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145



2. Klonierung des *sldAB* PCR Produkts in den Vektor pSC-A



3. Restriktion pSC-A:*sldAB* mit *Nco*I, Ligation mit der Gentamicin Kasette



4. Restriktion pSC-A:*sldBA'_sldA'_Genta* mit *Xba*I, *Hind*III. Ligation des 2261 bp Fragments in den Vektor pK19mobsacB (*Xba*I, *Hind*III)

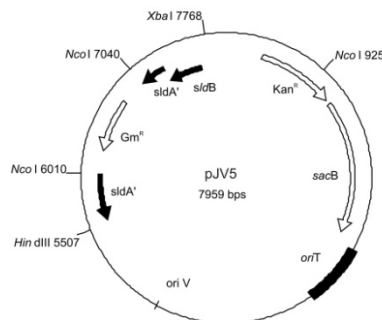


Abbildung 7: Übersicht über die Konstruktion des Plasmids pJV5 zur Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145. Amp^R: Ampicillin Resistenzgen; Gm^R: Gentamycin Resistenzgen; *oriV*: Replikationsursprung *E. coli*; *sacB*: Gen für Levansucrase; *oriT*: Sequenz für DNA Transfer durch Konjugation

3.1.3.1 Verifikation der Inaktivierung des *sldA* Gens von *G. oxydans* DSM 7145

Zur Konjugation des Plasmids pJV5 in *G. oxydans* DSM 7145 wurde dieses zunächst in *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) transformiert. Die Konjugation wurde wie unter II.3.12.5 beschrieben durchgeführt. Von den erhaltenen kanamycin- und cefoxitinresistenten Kolonien wurden 20 nochmals auf dem Selektivmedien (VM + 50 mM D-Glucose + 50 µg/ml Kanamycin + 50 µg/ml Cefoxitin) in einem Raster ausgestrichen.

Die korrekte Integration des Plasmids pJV5 in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 wurde durch eine Kolonie-PCR (II.3.8.2) überprüft. Dazu wurden zwei PCR Reaktionen mit den Primerkombinationen *sldB_v_for*/pK19_Seq_for bzw. *sldA_v_rev*/pK19_Seq_rev und Koloniematerial als Matrize verwendet.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, bindet der Primer *sldB_v_for* stromwärts des *sldB* Gens und der Primer pK19_Seq_for im Rückgrat des Plasmids pK19mobsacB. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von ~ 2,5 kb.

Die Primer *sldA_v_rev* und pK19_Seq_rev binden stromabwärts des *sldA* Gens bzw. wiederum im Rückgrat des Plasmids pK19mobsacB. Das erwartete PCR-Produkt hatte bei dieser Primerkombination eine Größe von ~3 kb.

Anhand der Kolonie-PCR wurden 20 Klone identifiziert, die das Plasmid pJV5 korrekt in das Chromosom inseriert trugen (Daten nicht gezeigt). Diese wurden erneut in Flüssigmedium angezogen und verschiedene Verdünnungen auf VM + 50 mM D-Glucose Agarplatten plattiert. Zur Identifizierung des 2. Rekombinationsereignisses wurden 50 Kolonien sowohl auf VM + 50 mM D-Glucose + 50 µg/ml Kanamycin als auch auf VM + 50 mM D-Glucose + 50 µg/ml Gentamycin ausgestrichen. Kolonien des Phänotyps Kan^S/Gm^R wurden wiederum in einer Kolonie-PCR mit der Primerkombination *sldB_v_for/sldA_v_rev* überprüft. Diese Primerkombination ergab bei *G. oxydans* DSM 7145 eine Fragmentgröße von 3,1 kb, während nach der Unterbrechung der Glycerin-Dehydrogenase durch die Gentamycin-Kassette eine Fragmentgröße von 2,6 kb zu erwarten war.

Insgesamt wiesen fünf der untersuchten Km^S/Gm^R Kolonien die erwartete Fragmentgröße von ca. 2,6 kb auf. Die Inaktivierung des *sldA* Gens wurde weiterhin durch eine *Southern Blot* Analyse bestätigt. Dazu wurde zunächst die genomische DNA von *G. oxydans* DSM 7145, *G. oxydans* DSM 7145 *sldB*::pJV5 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta wie unter II.3.5 beschrieben präpariert und der *Southern Blot* wie unter II.3.11 beschrieben durchgeführt.

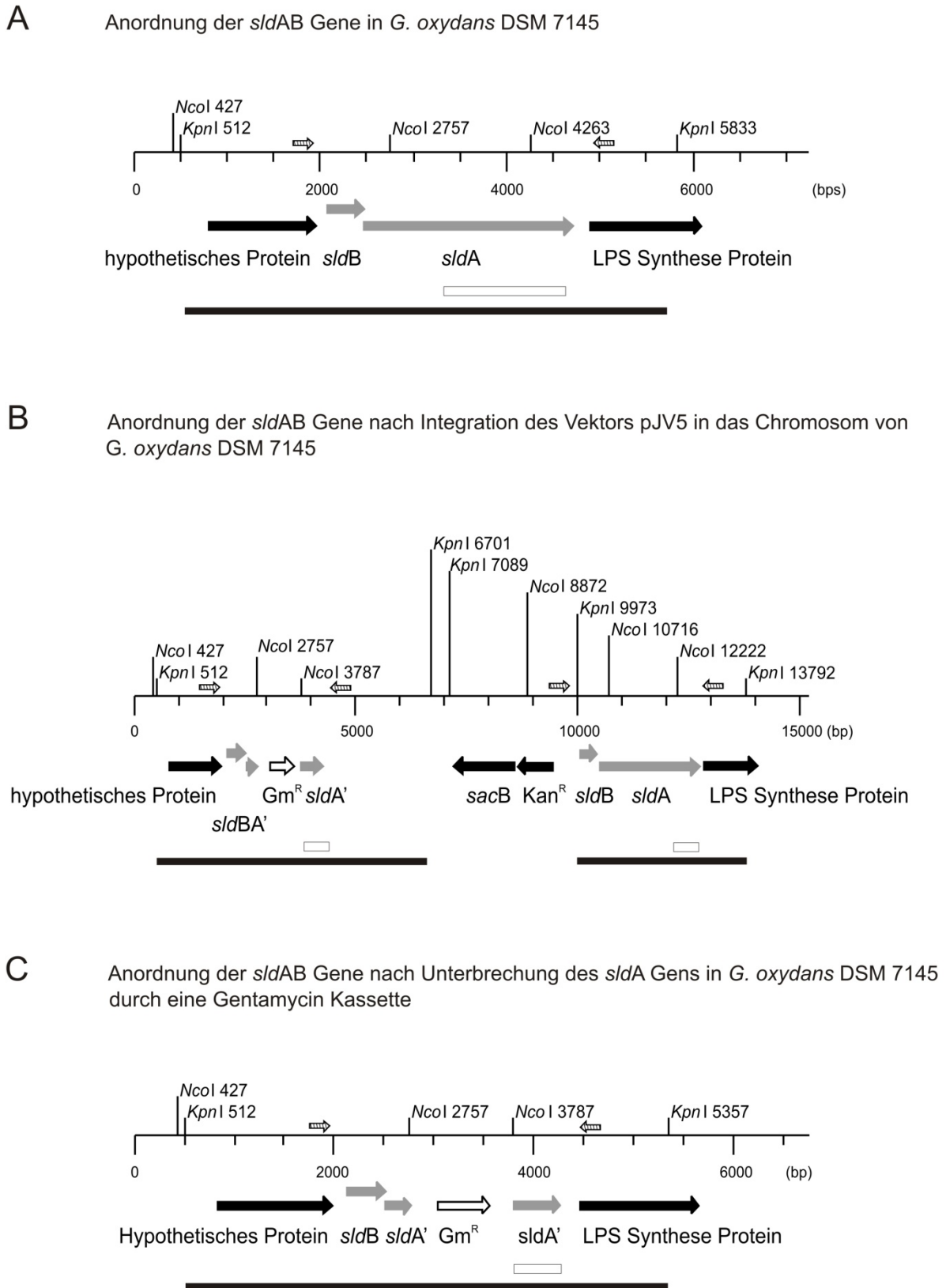


Abbildung 8: Schema der Anordnung der *sl*dAB Gene in *G. oxydans* DSM 7145, nach der Integration des Vektors pJV5 in das Chromosom und nach Inaktivierung des *sl*dA Gens durch eine Gentamycin-Kassette. Primer zur Verifikation sind durch schraffierte Pfeile dargestellt. Die in der *Southern Blot* Analyse zu erwartenden Fragmente sind durch schwarze Balken dargestellt. Die im *Southern Blot* verwendeten Sonden sind durch weiße Rechtecke dargestellt. (LPS Synthese Protein = Lipopolysaccharid Synthese Protein). Die stromaufwärts bzw. stromabwärts der *sl*dAB Gene gelegenen Gene wurden anhand der Annotation von *G. oxydans* ATCC 621H bezeichnet.

Die genomischen DNAs wurden durch eine Restriktion mit *KpnI* vollständig hydrolysiert. Die DIG markierte Sonde hatte eine Größe von 481 bp und wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primer *sldA_p_for/sldA_rev* und dem Plasmid pJV5 als Matrize generiert. Die im *Southern Blot* zu erwartenden Fragmentgrößen und die Bindungsstelle der Sonde an das zu erwartende DNA Fragment sind in Abbildung 8 dargestellt.

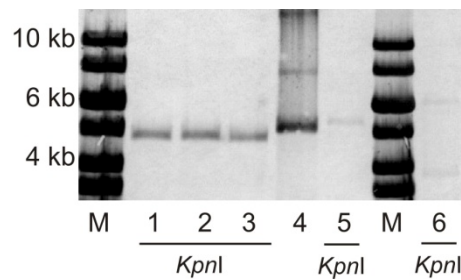


Abbildung 9: *Southern Blot* zum Nachweis der Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145. Genomische DNAs von *G. oxydans* DSM 7145, *G. oxydans* 7145 *sldB*::pJV9 und *G. oxydans* 7145 *sldA*::Genta wurden mit *KpnI* hydrolysiert, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung mit der DIG markierten *sldA* DNA Sonde erfolgte bei 68°C. Spuren 1-3: *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta Klone 1-3; Spur 4: Positivkontrolle Plasmid pJV5; Spur 5: *G. oxydans* DSM 7145; Spur 6: *G. oxydans* 7145 *sldB*::pJV9; M: Marker

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse des *Southern Blots* zur Bestätigung der Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145. Auf den Spuren 1-3 sind deutlich Fragmente mit einer Größe von ca. 4,8 kb zu erkennen, was der erwarteten Fragmentgröße der Mutante *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta entspricht.

Da bei der Konstruktion des Vektors pJV5 ein 1,5 kb Fragment aus dem *sldA* Gen herausgeschnitten wurde und dieses durch die Gentamycin-Kassette mit einer Größe von 1030 bp ersetzt wurde, ist bei *G. oxydans* DSM 7145 nach der *KpnI* Hydrolyse der genomischen DNA ein ca. 500 bp größeres Fragment zu erwarten als bei *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta (vgl Seite 60, Abbildung 8). Entsprechend ist in Spur 5 ein Fragment mit einer Größe von ca. 5,3 kb zu erkennen.

Nach Integration des Vektors pJV5 in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 waren zwei Fragmente mit Größen von ~ 6,2 bzw. 3,8 kb zu erwarten, da die *sldA*-Sonde an der die Gentamycin-Kassette flankierenden Homologieregion und am Ende des *sldA* Gens band. Die erwarteten Fragmentgrößen sind in Spur 6 des *Southern Blot* schwach zu erkennen. Die *Southern Blot* Analyse bestätigte somit die Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase durch Insertion einer Gentamycin-Kassette.

3.1.4 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta*

Das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* wurde in VM (II.2.1.1.1) mit 50 mM der folgenden Substrate untersucht: D-Glucose, D-Mannitol, *meso*-Erythritol, Glycerin. Darüber hinaus wurde das Wachstum in VM, dem ein Gemisch aus 25 mM D-Glucose und 25 mM D-Mannitol zugegeben worden war, verfolgt. Die in drei unabhängigen Experimenten ermittelten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht über die in drei unabhängigen Experimenten ermittelten Wachstumsraten von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf verschiedenen Substraten. μ : Wachstumsrate (h^{-1}); t_d : Verdopplungszeit (min); N/D: Wachstumsrate (μ) und Verdopplungszeit (t_d) nicht zu bestimmen.

	<i>G. oxydans</i> DSM 7145		<i>G. oxydans</i> DSM 7145 <i>sldA::Genta</i>	
	μ (h^{-1})	t_d (min)	μ (h^{-1})	t_d (min)
D-Glucose	0,69 (+/- 0,05)	60 (+/- 5)	0,58 (+/- 0,02)	71 (+/- 2)
D-Glucose/D-Mannitol	0,48 (+/- 0,07)	90 (+/- 1)	0,60 (+/- 0,06)	70 (+/- 7)
D-Mannitol	0,48 (+/- 0,04)	84 (+/- 7)	N/D	N/D
<i>meso</i> -Erythritol	0,44 (+/- 0,02)	95 (+/- 2)	N/D	N/D
Glycerin	0,47 (+/- 0,02)	87 (+/- 3)	0,16 (+/- 0,01)	264 (+/- 11)

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche zeigten, dass ein Wachstum der Mutante *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf VM mit D-Glucose möglich, das Wachstum jedoch verlangsamt war. Darüber hinaus war die von der Mutante nach 24 Stunden erreichte Optische Dichte von $\sim 0,7$ deutlich geringer als die vom Wildtyp erreichte Optische Dichte von $\sim 1,1$. Interessanterweise wuchs die Mutante auf VM mit einem Gemisch von 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol schneller als der Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145, erreichte jedoch auch auf diesem Substratgemisch nach 24 h eine deutlich geringere Optische Dichte ($\sim 0,7$) als *G. oxydans* DSM 7145 (~ 2). Die Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase hatte einen gravierenden Einfluss auf das Wachstum der Mutante auf den C3-C6 Polyolen Glycerin, *meso*-Erythritol und D -Mannitol. Bei einer Anzucht auf VM + Glycerin war die berechnete Wachstumsrate um etwa den Faktor drei vermindert, die Mutante erreichte jedoch nach 24 Stunden eine mit dem Wildtyp vergleichbare Optische Dichte von $\sim 1,1$. Im Gegensatz dazu war bei Anzucht auf VM + *meso*-Erythritol und VM + D-Mannitol auch nach 24 Stunden nur ein sehr geringes Wachstum nachweisbar.

Die in den Wachstumsversuchen gemachten Beobachtungen deuteten bereits darauf hin, dass die Glycerin-Dehydrogenase eine wichtige Rolle bei der Oxidation von D-Mannitol, Glycerin

und *meso*- Erythritol spielt. Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurde der Effekt der Inaktivierung der Glycerin Dehydrogenase auf biochemischer Ebene untersucht, indem die Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* gegenüber verschiedenen Substraten ermittelt wurde.

3.1.5 Biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta*

3.1.5.1 Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose

Um die Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* zu untersuchen, wurden beide Stämme in VM + 50 mM D-Glucose bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Nach Präparation der Membranfraktion (II.5.2) wurde die membranständige Dehydrogenaseaktivität mittels des unter II.5.3.1 beschriebenen enzymatischen Tests gemessen. Dabei wird die Reduktion des Redoxindikators Dichlorindophenol durch die bei der Oxidation des Substrates gewonnenen Elektronen photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt. Die genaue Zusammensetzung des Testansatzes findet sich unter II.5.3.1.

Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* bei Anzucht auf VM mit 50 mM D-Glucose. Die Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase hat keinen negativen Einfluss auf die membranständige Glucose Oxidation. Es konnte in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* sogar eine leicht erhöhte Glucose-Dehydrogenase Aktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu war die Oxidation die Zuckersäure D-Gluconat in der Membranfraktion von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* um den Faktor zwei verringert. Die Inaktivierung der Glycerin-Dehydrogenase hatte darüber hinaus einen besonders ausgeprägten Effekt auf die Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 gegenüber Polyolen. So war nach Inaktivierung des Enzyms die Oxidation des C3- Polyols Glycerin, des C4-Polyols *meso*-Erythritol und des C5-Polyols D-Arabitol und der C6-Polyole D-Mannitol und D-Sorbitol deutlich reduziert, wobei die Reduktion der spezifischen Aktivität gegenüber Glycerin und *meso*-Erythritol stärker war (Faktor 14,6 bzw 9,5) als die Reduktion der spezifischen Aktivität gegenüber D-Arabitol, D-Mannitol und D-Sorbitol (Faktor 5).

Das bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose ermittelte Oxidationsspektrum von *G. oxydans* und *G. oxydans* *sldA::Genta* zeigte, dass die Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 anscheinend eine entscheidende Rolle bei der Oxidation von D-Gluconat und C3- C6- Polyolen spielt. Zugleich lieferte die fehlende Oxidation von Glycerin, *meso*-Erythritol und D-Mannitol in der Membranfraktion von *G. oxydans* *sldA::Genta* eine Erklärung für das

deutlich verlangsamte Wachstum auf Glycerin und das Unvermögen auf *meso*-Erythritol und D-Mannitol zu wachsen.

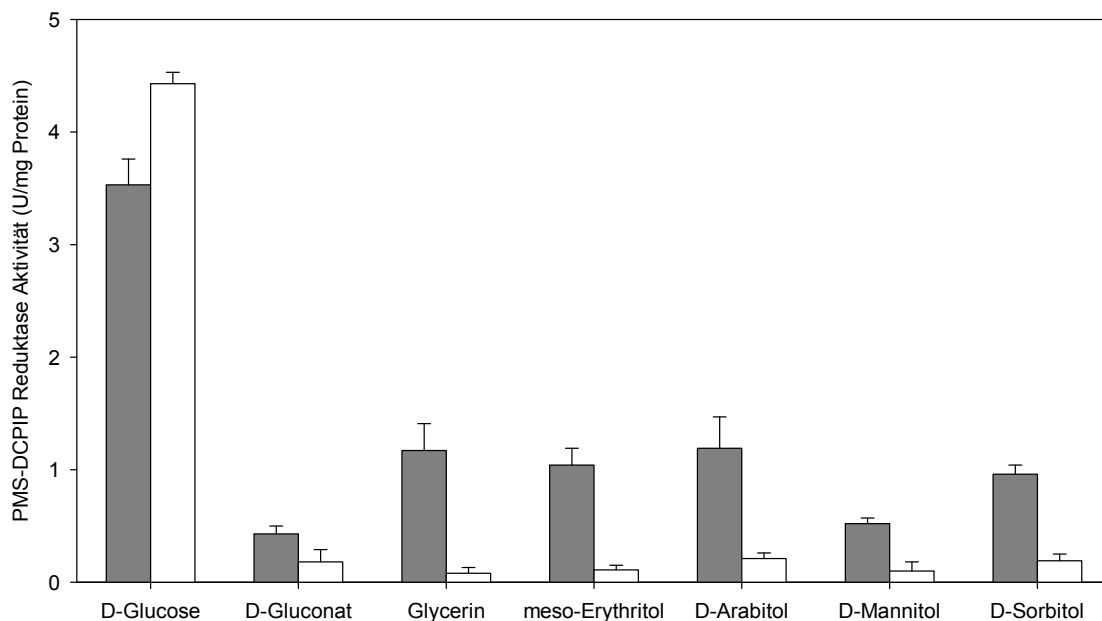


Abbildung 10: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (weiße Balken) bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose. Beide Stämme wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIllvaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

In dem folgenden Abschnitt wurde die Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* bei Anzucht auf VM mit 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol untersucht, um festzustellen, ob durch Änderung der Anzuchtbedingungen weitere Enzyme induziert werden, die die oben untersuchten Substrate oxidieren.

3.1.5.2 Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol

Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen ist, war auch bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Mannitol/ 25 mM D-Glucose eine höhere Glucose-Dehydrogenase Aktivität in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* messbar. Der Aktivitätsanstieg um den Faktor 2,2 war jedoch ausgeprägter als bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose (Faktor 1,3).

Die Aktivitätsmessungen bestätigten weiterhin die Reduktion der membranständigen D-Gluconat Oxidation um etwa den Faktor zwei. Auch konnte keine Oxidation von Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol und D-Mannitol bei einer Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf dem D-Glucose/D-Mannitol Gemisch nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Anzucht auf VM mit 50 mM D-Glucose, wo die Oxidation von D-Sorbitol um den Faktor

5 vermindert war, konnte bei Anzucht auf VM mit 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol nur eine Verminderung der D-Sorbitol Oxidation um den Faktor 2,9 nachgewiesen werden.

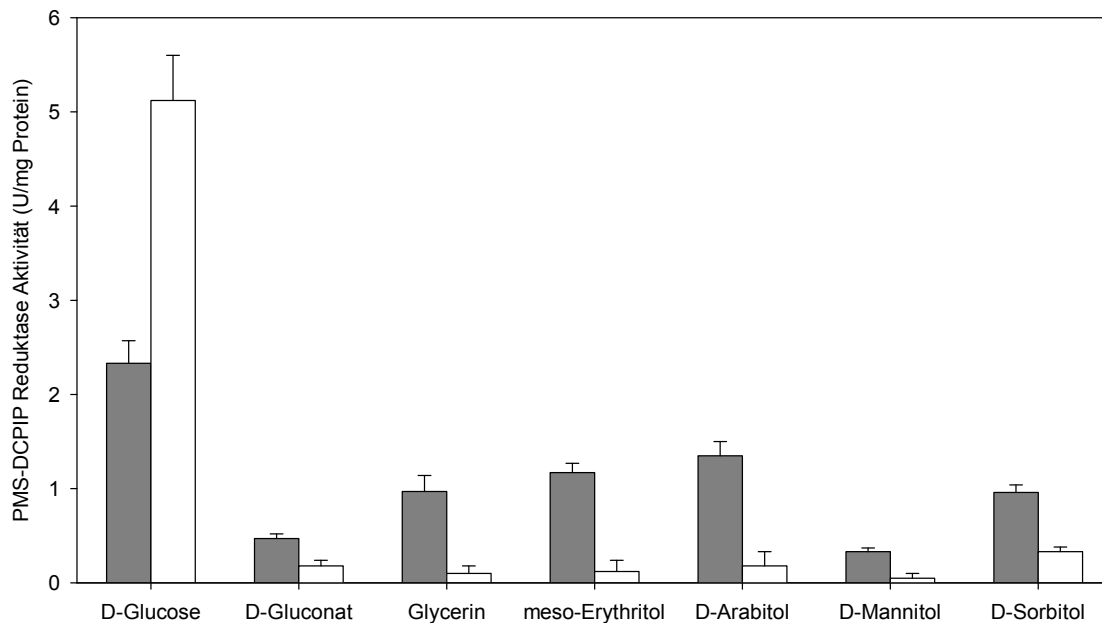


Abbildung 11: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (weiße Balken) bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol. Beide Stämme wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

Die in der Membranfraktion von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* bei Anzucht auf VM mit 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol gemessenen spezifischen Aktivitäten bestätigten das auf VM mit 50 mM D-Glucose ermittelte Substratspektrum der Glycerin-Dehydrogenase, das D-Gluconat und C3- C6 Polyole umfasst. Des weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Glycerin- Dehydrogenase unabhängig von dem in der Anzucht verwendeten Substrat alleinig die Oxidation der untersuchten Substrate vermittelt. Eine Ausnahme könnte die Oxidation von D-Sorbitol darstellen, da bei Anzucht von *G. oxydans sldA::Genta* auf dem D-Glucose/D-Mannitol Gemisch eine höhere spezifische Aktivität gegenüber D-Sorbitol nachweisbar war als bei Anzucht auf VM mit D-Glucose.

3.1.6 Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta*

3.1.6.1 Konstruktion des Komplementationsvektors pJV8

Zur Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* wurde das Strukturgen *sldA* mit seiner putativen Promotorregion in den Vektor pBBR-1 MCS2 (Kovach *et al.*, 1995)

3.1.6.2 Wachstum von *G. oxydans sldA::Genta* (pJV8)

In Wachstumsversuchen wurde zunächst untersucht, ob das Komplementationsplasmid das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf D-Mannitol, Glycerin und *meso*-Erythritol wieder herstellen konnte. Dazu wurde *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) und als Kontrolle *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) in VM mit 25 µg/ml Kanamycin und den in Tabelle 6 aufgeführten Kohlenstoffquellen angezogen.

Tabelle 6: Übersicht über die in zwei biologischen Experimenten ermittelten Wachstumsraten (h^{-1}) von *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8). Die Zellanzucht erfolgte auf VM mit 50 mM der angegebenen Substrate bzw. mit 25 mM D-Glucose/D-Mannitol bei 30°C.

Substrat	<i>G. oxydans</i> 7145 pBBR-1 MCS2 μ (h^{-1})	<i>G. oxydans</i> 7145 <i>sldA::Genta</i> pJV8 μ (h^{-1})
D-Mannitol	0,38 +/- 0,01	0,35 +/- 0,03
D-Glucose	0,40 +/- 0,08	0,44 +/- 0,14
Glycerin	0,36 +/- 0,02	0,45 +/- 0,02
<i>meso</i> -Erythritol	0,32	0,48 +/- 0,05
D-Glucose/D-Mannitol	0,35 +/- 0,01	0,44 +/- 0,01

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, war nach Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* mit (pJV8) wieder deutliches Wachstum auf D-Mannitol, Glycerin und *meso*-Erythritol zu beobachten. Während die Wachstumsrate von *G. oxydans sldA::Genta* (pJV8) auf VM + 50 mM D-Mannitol im wesentlichen der der Kontrolle *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) entsprach, wuchs die komplementierte *SldA* Mutante auf Glycerin und *meso*-Erythritol schneller als die Vektorkontrolle *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2).

Unterschiede zeigten sich auch in dem erreichten Endwert der Optischen Dichte. So war diese nach Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) auf VM + D-Mannitol gegenüber der Kontrolle um den Faktor zwei verringert. Im Gegensatz dazu erreichte die komplementierte Mutante bei Anzucht auf Glycerin und *meso*-Erythritol nach 49 Stunden etwa 80 % der Optischen Dichte des Kontrollstammes *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2).

3.1.6.3 Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8)

Da das Komplementationsplasmid pJV8 das Wachstum von *G. oxydans sldA::Genta* auf VM mit D-Mannitol, Glycerin und *meso*-Erythritol wiederherstellen konnte, wurde mit den folgenden Experimenten untersucht, ob durch die Komplementation auch wieder die

Oxidation von D-Gluconat und die Oxidation der unter genannten III.1.5.2 C3-C6 Polyolen in der Membranfraktion nachweisbar war. Dazu wurden *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase auf VM mit 50 mM D-Mannitol (II.2.1.1.1) angezogen. Die Membranfraktion wurde wie unter II.5.2 beschrieben präpariert und die Aktivität der membranständigen Dehydrogenasen mit dem PMS-DCPIP Enzymtest gemessen (II.5.3.1). Es wurden drei biologische Experimente durchgeführt.

Da die absoluten Enzymaktivitäten zwischen den einzelnen biologischen Experimenten stark schwankten, wurden die Aktivitäten relativ zur gemessenen membranständigen Glucose-Dehydrogenase Aktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) angegeben. Die in Abbildung 13 aufgeführten relativen Aktivitäten zeigen, dass durch Komplementation mit dem Plasmid pJV8 zwar wieder eine deutliche Oxidation von D-Gluconat und den C3- bis C6- Polyolen Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol und D-Sorbitol nachweisbar war, die Aktivitäten waren jedoch niedriger als in der Kontrolle pBBR 1 MCS2.

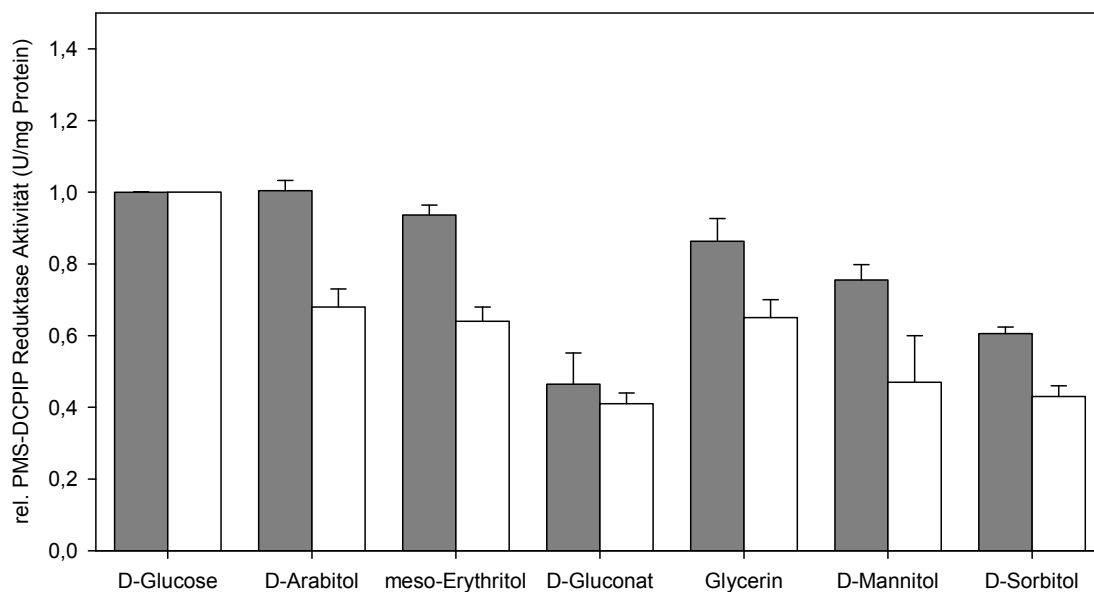


Abbildung 13: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) (weiße Balken) bei Anzucht auf VM mit 50 mM D-Mannitol. Die gezeigten Aktivitäten sind relativ zu der in der Membranfraktion von *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) bzw. *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) gemessenen Glucose-Dehydrogenase Aktivität angegeben. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

Während die für Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Mannitol und D-Sorbitol erhaltenen Werte denen der Kontrolle zu 70% entsprachen, korrelierten die gemessenen Aktivitäten von

komplementierter Mutante und Kontrolle gegenüber D-Gluconat zu 89%. Dies könnte damit zu erklären sein, dass D-Gluconat nicht nur durch die Glycerin Dehydrogenase zu 5-Keto-D-Gluconat, sondern auch durch die membrangebundene D-Gluconat Dehydrogenase auch zu 2-Keto-D-Gluconat weiteroxidiert werden kann. Die Aktivität der D-Gluconat Dehydrogenase trägt damit vermutlich zur besseren Korrelation der D-Gluconat Oxidation in *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS) und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (pJV8) bei.

Die in Abbildung 13 gezeigten Aktivitäten konnten auch nicht durch ein Komplementationsplasmid, das die mögliche Promotorregion und die *sldAB* Gene enthielt, weiter verbessert werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.7 Membranständige Glucose-Dehydrogenase Aktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle

Die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* zeigte Unterschiede in der membranständigen Glucose-Dehydrogenase Aktivität in Abhängigkeit von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle auf, während die Aktivität der Glycerin Dehydrogenase nicht von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle beeinflusst zu sein scheint (vgl. Abbildungen 10 und 11).

In *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* wurde sowohl bei Anzucht auf VM + D-Glucose als auch bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol eine höhere Glucose-Dehydrogenase Aktivität als im Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 gemessen. Während bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose eine 1,3 fache Steigerung der Glucose-Dehydrogenase Aktivität in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* nachgewiesen werden konnte, fiel diese bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol mit einem Faktor von 2,2 deutlicher aus. Im Gegensatz dazu war im Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 mit abnehmender Glucose Konzentration ein gegenläufiger Effekt nachweisbar. Hier nahm die Glucose-Dehydrogenase Aktivität von 3,5 U/mg Protein bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose über 2,3 U/mg Protein bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol bis zu 1,2 U/mg Protein bei Zellanzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol ab. Die biochemischen Daten deuteten auf Regulation der membranständigen Glucose Dehydrogenase Aktivität in Abhängigkeit von der im Medium enthaltenen Glucose- Konzentration hin. Zudem warfen sie die Frage auf, ob durch die Deletion einer membranständigen Dehydrogenase die Aktivitäten weiterer membranständiger Dehydrogenasen, wie beispielsweise der Glycerin Dehydrogenase, gesteigert werden können. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde die Transkription der Glucose- und der Glycerin Dehydrogenase mittels Real-Time RT-PCR untersucht und im

nächsten Schritt die membranständige Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 deletiert.

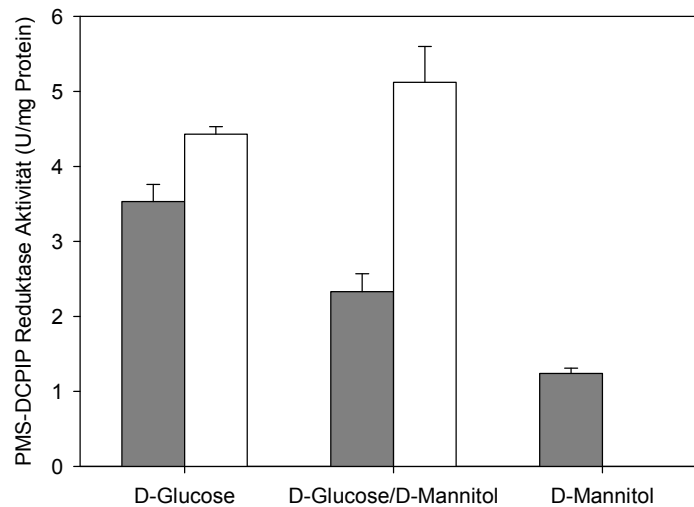


Abbildung 14: Membranständige Glucose-Dehydrogenase Aktivitäten von *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM7145 *sldA::Genta* (weiße Balken) bei Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Beide Stämme wurden auf VM + 50 mM D-Glucose, VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. *G. oxydans* DSM 7145 wurde auf VM + 50 mM D-Mannitol ebenfalls bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

3.1.8 Untersuchung der Transkription des *mgdh*- und *sldA*-Gens in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta*

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchung der Transkription der membranständigen Glucose und Glycerin-Dehydrogenase dienten Zellpellets aus denselben Zellanzuchten, die zuvor für die biochemischen Untersuchungen verwendet worden waren. Die RNA wurde aus diesen wie unter II.4.3 beschrieben isoliert und die Transkription mittels relativer quantitativer Real-Time RT-PCR verfolgt (II.4.10). Als endogene Kontrolle, deren Expression unter den untersuchten Bedingungen konstant sein sollte und die dazu dient Unterschiede in der eingesetzten RNA-Konzentration zu eliminieren, wurde die β -Untereinheit der DNA Gyrase verwendet. Da die Genomsequenz von *G. oxydans* DSM 7145 noch nicht vorliegt, wurde zunächst das Strukturgen der DNA Gyrase sequenziert (vgl. III.2.5.5.1 und Anhang Seite xyz). Die ermittelte Expressionsänderung wurde schließlich über die $\Delta\Delta\text{ct}$ Formel ausgedrückt (Talaat *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der *sldA* und *mgdh* Gene in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* sind in Abbildung 15 dargestellt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde der $\log_2(\text{Expressionsänderung})$ angegeben. Ein Wert größer null bezeichnet eine stärkere

Transkription in *G. oxydans* DSM 7145, während ein Wert kleiner null für eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta steht. Wie zu erwarten, war eine deutlich stärkere Transkription des *sldA* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 messbar. So war bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose eine $1,5 \cdot 10^6$ fach höhere Transkription, bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol eine $2,8 \cdot 10^6$ fach verstärkte Transkription in *G. oxydans* DSM 7145 nachweisbar. Eine verstärkte Transkription des *mgdh* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta ist anhand der in Abbildung 15 gezeigten Daten nicht zu erkennen. Für die Anzucht auf VM + D-Glucose ergab sich ein Wert von Null, was eine konstante Expression des Gens impliziert. Bei Anzucht auf VM + D-Glucose/D-Mannitol wurde sogar eine leicht verstärkte Transkription des *mgdh* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 ermittelt.

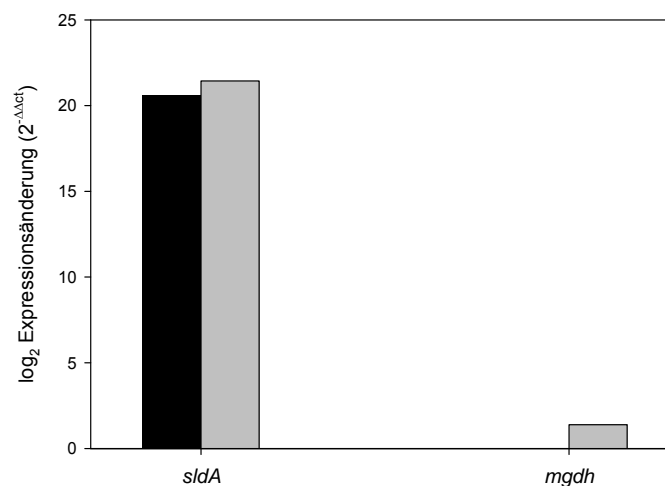


Abbildung 15: \log_2 (Expressionsänderung) ($2^{-\Delta\Delta ct}$) des *sldA* bzw. des *mgdh* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 bzw. *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta. Ein Wert größer eins bezeichnet eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145, ein Wert kleiner eins bezeichnet eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta; schwarze Balken: Zellanzucht auf VM + 50 mM D-Glucose; graue Balken: Zellanzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol.

Die Transkriptionsanalyse des *mgdh* und des *sldA* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen konnte die in Abbildung 14 gezeigten biochemischen Daten ebenfalls nicht untermauern. Bei den in Abbildung 16 gezeigten Expressionsänderungen bezeichnet ein Wert größer null eine verstärkte Transkription der Gene in *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol, während Werte kleiner null für eine verstärkte Transkription bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose (VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol) stehen. Zwar konnte eine leicht verstärkte Transkription des *mgdh* Gens bei Anzucht auf VM + D-Glucose (0,3) bzw. VM + D-Glucose/D-Mannitol (0,2) nachgewiesen werden, diese fiel jedoch im Gegensatz zu den

biochemischen Daten bei Anzucht auf VM + D-Glucose/D-Mannitol stärker als bei Anzucht auf VM + D-Glucose aus (vgl. Abbildung 16). Die Transkriptionsdaten deuteten weiterhin auf eine Veränderung, besonders bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol, der Transkription des *sldA* Gens hin. Eine Tatsache, die durch die biochemischen Daten ebenfalls nicht bestätigt werden konnte.

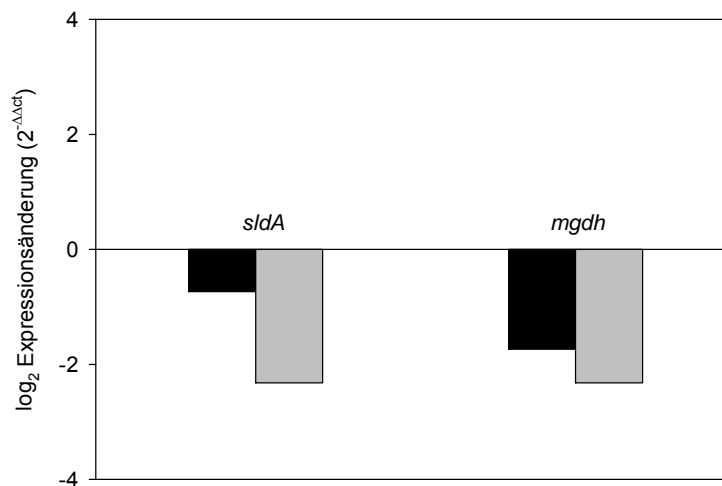


Abbildung 16: $\log_2(\text{Expressionsänderung } (2^{-\Delta\text{Act}}))$ des *sldA* bzw. des *mgdh* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol, VM + 25 mM D-Mannitol/ 25 mM D-Glucose (graue Balken), VM + 50 mM D-Glucose (schwarze Balken). Ein Wert größer null bezeichnet eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol, ein Wert kleiner null bezeichnet eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol (bzw. VM + 50 mM D-Glucose).

3.2 Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts zeigten, dass nach Deletion der Glycerin-Dehydrogenase auf biochemischer Ebene eine erhöhte Glucose-Dehydrogenase Aktivität in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* in Abhängigkeit von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle nachweisbar war. Im folgenden sollte untersucht werden, ob die Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Glycerin-Dehydrogenase hat und so die Produktion von biotechnologisch bedeutsamen Substanzen, wie L-Erythrulose beschleunigt werden kann. Da die Sequenz der membranständigen Glucose-Dehydrogenase von *G. oxydans* DSM 7145 noch nicht vorlag, wurde das Strukturgen zunächst vollständig sequenziert. Zur Untersuchung der genetischen Organization des *mgdh* Gens von *G. oxydans* DSM 7145 wurde die Transkriptlänge durch eine *Northern Blot* Analyse bestimmt.

3.2.1 Sequenzierung des Gens der membranständigen Glucose-Dehydrogenase

Das *mgdh* Gen von *G. oxydans* DSM 7145 wurde mit den Primern *mgdh_compl_for/mgdh_compl_for*, die anhand der Sequenz von *G. oxydans* ATCC 621H abgeleitet worden waren, mit *Pfu*-Polymerase und genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Das erhaltene PCR Produkt mit einer Größe von ~2,7 kb wurde in den Vektor pJET1.2 kloniert (II.3.9.2) und nachfolgend beide DNA Stränge mit den Primern pJET1.2_for/pJET1.2_rev und *mgdh_w1 – mgdh_w8* vollständig sequenziert.

3.2.1.1 Aminosäuresequenz Glucose-Dehydrogenase von *G. oxydans* DSM 7145

Die Sequenzierung des *mgdh* Gens von *G. oxydans* DSM 7145 zeigte, dass dieses auf Ebene der Nukleinsäuresequenz eine 99 %ige Identität zum *mgdh* Gen aus *G. oxydans* ATCC 621H aufwies. Aus Abbildung 17 geht hervor, dass sich die Quinoprotein Glucose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 7145 und ATCC 621H folglich auch auf Ebene der Aminosäuresequenz sehr ähnlich waren. Lediglich an Position 497 war ein Austausch von Threonin zu Asparagin nachweisbar. Ein Datenbankabgleich mit dem BlastP Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) ergab neben der 99 %igen Identität zu der Glucose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* ATCC 621H, eine Identität von 58 % zu der putativen PQQ-abhängigen Glucose-Dehydrogenase aus *Gluconateobacter diazotrophicus* PAI 5. Darüber hinaus war eine 54% ige Identität zu der Quinoprotein Glucose-Dehydrogenase von *E. coli* K12 subsp. W3110 nachweisbar. Da die Struktur dieses Proteins bereits vorliegt (Cozier & Anthony, 1995), wurde die Aminosäuresequenz in das in Abbildung 17 gezeigte Alignment mit aufgenommen. Die N-terminale Region der Quinoprotein Glucose- Dehydrogenase von *E. coli* K12 bildet mit fünf Transmembransegmenten den Membrananker des Proteins und enthält vermutlich auch die Ubichinonbindestelle (Anthony & Ghosh, 1998). Eine Vorhersage von Transmembranhelices mit dem TMHMM Server (Hunter *et al.*, 2009) zeigte, dass auch in der N-terminalen Region der Glucose- Dehydrogenase von *G. oxydans* DSM 7145 fünf potentielle Transmembransegmente zu finden sind.

Des weiteren sind in beiden Proteinen einige wichtige funktionelle Aminosäurereste konserviert. So ist aus Abbildung 17 zu entnehmen, dass das Asp-466 der *E. coli* Glucose-Dehydrogenase die gleiche Position wie das Asp-470 der *G. oxydans* Glucose Dehydrogenase einnimmt. Diesem Aminosäurerest kommt eine Schlüsselrolle bei der Initiation der Reaktion durch Abstraktion eines Protons von dem Substrat zu (Cozier & Anthony, 1995). Auch die beiden an der Positionierung des Cofaktors PQQ beteiligten Aminosäurereste, das His-262 und das Trp-404 der *E. coli* Glucose-Dehydrogenase (Cozier & Anthony, 1995) sind im *mgdh*

Gen von *G. oxydans* DSM 7145 konserviert (His-264, Trp-408). Schließlich sind die an der Komplexierung der Ca^{2+} Ions im aktiven Zentrum beteiligten Aminosäurereste Asp-354, Asn-355 und Thr-424 in der Sequenz von *G. oxydans* DSM 7145 nachweisbar (Asp-357, Asn-358 und Thr-428).

DSM7145	--MSTTSRPLWALITAAVFALCGAILTVGGAWVAIIGGPLYVYIILGLALLATAFLSFR	58
ATCC621H	--MSTTSRPLWALITAAVFALCGAILTVGGAWVAIIGGPLYVYIILGLALLATAFLSFR	58
K12	MAINNTGSRRLVLTALFAALCGLYLLIGGGWLVAIGGSWYYP ^I AGLVMLGVAWMLWRS	60
	* * * * *	
DSM7145	NPAALYLFAVVVFGTVIWE ^L TVVGLDIWALIPRSDIVIILGIWLLLPFVSRQIGGTRTTV	118
ATCC621H	NPAALYLFAVVVFGTVIWE ^L TVVGLDIWALIPRSDIVIILGIWLLLPFVSRQIGGTRTTV	118
K12	KRAALWLYAALLLGTMIWGVVEVGFDFWALTPRSDILVFFGIWLLLPFVWRRL-----V	114
	*** *	
DSM7145	LPLAGAVGVAVLALFAS-----LFTDPHDISGDLPTQIANASPADPDNPVASEWHAYG	171
ATCC621H	LPLAGAVGVAVLALFAS-----LFTDPHDISGDLPTQIANASPADPDNPVASEWHAYG	171
K12	IPASGAVAALVVAL ^L ISGGILTWAGFNDPQ ^E INGT ^L SADATPAEAI ^S P--VADQDWPAYG	172
	* *	
DSM7145	RTQAGDRWSPLN ^Q INASN ^V SNLKVAWHIHTKDMN ^S NDPGEATNEAT ^P IEFNNTLYMCSL	231
ATCC621H	RTQAGDRWSPLN ^Q INASN ^V SNLKVAWHIHTKDMN ^S NDPGEATNEAT ^P IEFNNTLYMCSL	231
K12	RNQEGRF ^S PLK ^Q INADNVHNLKEAVFRTGDV ^K QPNDPGEITNEV ^T PIKVGDTLYLCTA	232
	* *	
DSM7145	HQKLF ^A VDGATGNV ^K WVYDPK ^L QINPG ^F QHLTCR ^G VSFHETPANAT ^D SDGNPAPT ^D CAKR	291
ATCC621H	HQKLF ^A VDGATGNV ^K WVYDPK ^L QINPG ^F QHLTCR ^G VSFHETPANAT ^D SDGNPAPT ^D CAKR	291
K12	HQRLFALDAASGKEKWHYDPE ^L TNESF ^Q HVTCR ^G VSYHEAKAET ^A SP---EVMAD ^C PRR	289
	** *	
	262	
DSM7145	IILPVNDGRLVEVDAD ^T GK ^T C ^S GFGN ^G EIDLRVNPQY ^T TPGQY ^E PTSP ^P VI ^T DKLIIA	351
ATCC621H	IILPVNDGRLVEVDAD ^T GK ^T C ^S GFGN ^G EIDLRVNPQY ^T TPGQY ^E PTSP ^P VI ^T DKLIIA	351
K12	IILPVNDGRLIAINAENGLCE ^T FANK ^G VLN ^L Q ^S -NMPDTK ^P GLY ^E PTSP ^P II ^T DKTIVM	348
	***** *	
DSM7145	NSAITDNGSVKQASGATQAFD ^V YTGKRV ^V FDASNPD ^N QLPDDSH ^P VFHPNSPNSWIVS	411
ATCC621H	NSAITDNGSVKQASGATQAFD ^V YTGKRV ^V FDASNPD ^N QLPDDSH ^P VFHPNSPNSWIVS	411
K12	AGSVT ^D NFSTRE ^T SGVIRG ^F VDVNTGELL ^W AFDPGAK ^D PNAI ^P SDEH-TFTFNSPNSWAPA	407
	*** *	
	354 355	404
DSM7145	SYDRNLNLVYIPMGVGT ^P DQWGGDR ^T KD ^S ERFAPGIVAL ^N ADTGK ^L AWFY ^Q TVH ^H DLWDM	471
ATCC621H	SYDRNLNLVYIPMGVGT ^P DQWGGDR ^T KD ^S ERFAPGIVAL ^N ADTGK ^L AWFY ^Q TVH ^H DLWDM	471
K12	AYDAKLDLVYLPMGV ^T PDIWGN ^R TP ^E QERYASSILALNAT ^T GK ^L AWSY ^Q TVH ^H DLWDM	467
	* *	
	424	466
DSM7145	DVPSQPSLVDV ^T QKDG ^T LVP ^A IYAP ^N KTG ^D IFV ^L DRRTG ^K EIVP ^A PET ^P V ^P QGAAP ^G DHT	531
ATCC621H	DVPSQPSLVDV ^T QKDG ^T LVP ^A IYAP ^N KTG ^D IFV ^L DRRTG ^K EIVP ^A PET ^P V ^P QGAAP ^G DHT	531
K12	DLPAQPTLADI ^T VN-GQK ^V PV ^I YAPAK ^T GNI ^F V ^L DRRNG ^E LVP ^A EKP ^V QGAAG ^K GDYV	526
	* *	
DSM7145	SPTQPMSQLTLRPKN ^L NSDIWGG ^T IFDQ ^M FCS ^I YFHT ^L RYEG ^P FT ^P PSL ^K GSLIF ^P PGD	591
ATCC621H	SPTQPMSQLTLRPKN ^L NSDIWGG ^T IFDQ ^M FCS ^I YFHT ^L RYEG ^P FT ^P PSL ^K GSLIF ^P PGD	591
K12	TPTQPFSELSFRPTKDL ^S GMW ^G ATMF ^D QLVCR ^V MFHQ ^M RYEG ^I F ^T PPSE ^Q GT ^L V ^F PGN	586
	*** *	
DSM7145	LGMFEWGLAVDPQRQVAFAN ^P ISL ^P FVS ^Q L ^V PRG ^P GN ^L WPEK ^D AKGTG ^G ETGL ^Q HNYG	651
ATCC621H	LGMFEWGLAVDPQRQVAFAN ^P ISL ^P FVS ^Q L ^V PRG ^P GN ^L WPEK ^D AKGTG ^G ETGL ^Q HNYG	651
K12	LGMFEWGGISVDPNREVAIANP ^M ALP ^F VSK ^L I ^P RG ^P GN ^P MEQ ^P K ^D AKGTG ^T ESGI ^P QY ^G	646
	***** *	
DSM7145	IPYAVNLHPFLDPVLLPFG ^I KMP ^C RT ^P PPW ^G YVAGID ^L KT ^N KV ^V WQ ^H RNG ^T L ^R DS ^M Y ^G SSL	711
ATCC621H	IPYAVNLHPFLDPVLLPFG ^I KMP ^C RT ^P PPW ^G YVAGID ^L KT ^N KV ^V WQ ^H RNG ^T L ^R DS ^M Y ^G SSL	711
K12	VPYGVTLNPFLS----PFG--LPCKQPAW ^G YISAL ^D LKT ^N EVV ^W KKR ^I G ^T P ^Q D ^S MP-FPM	699
	* *	
DSM7145	PIPLPPIKIGVPSLGG ^P LSTAG ^N L ^G F ^L TAS ^M DY ^I RAYN ^L T ^T GK ^V LW ^Q DR ^L PAGA ^Q AT ^P I	771
ATCC621H	PIPLPPIKIGVPSLGG ^P LSTAG ^N L ^G F ^L TAS ^M DY ^I RAYN ^L T ^T GK ^V LW ^Q DR ^L PAGA ^Q AT ^P I	771
K12	PVPVP-FNMGMPMLGG ^P I ^S TAG ^N V ^L FAATAD ^N Y ^L RAYN ^S NGE ^K LW ^Q GR ^L PAG ^Q AT ^P M	758
	* *	
DSM7145	TYAINGKQYIVTYAGGHNS ^F PT ^R MGDDIIAYAL ^P DQK- 808	808
ATCC621H	TYAINGKQYIVTYAGGHNS ^F PT ^R MGDDIIAYAL ^P DQK- 808	808
K12	TYEVNGKQYVVISAGGHG ^S FG ^T KMG ^D YIVAYAL ^P DD ^V K 796	796
	** *	

Abbildung 17: Alignment (ClustalW) der Aminosäuresequenzen der Quinoprotein Glucose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 7145, ATCC 621H und *E. coli* K12 subsp. W3110. Sterne bezeichnen identische Aminosäurereste in allen Sequenzen. Sequenzunterschiede zwischen den Proteinen aus *G. oxydans* DSM 7145 und ATCC 621H sind durch einen Rahmen hervorgehoben. Mögliche Transmembranhelices sind durch Unterstreichung der entsprechenden Aminosäuren markiert. Funktionell wichtige Aminosäuren sind fett hervorgehoben.

3.2.2 Untersuchung der genetischen Organisation des *mgdh* Gens

Um die genetische Organisation des *mgdh* Gens zu untersuchen, wurde zunächst die Transkriptlänge mittels einer Northern Blot Analyse bestimmt. Dazu wurde die Gesamt RNA von *G. oxydans* DSM 7145 Zellen, die auf VM + 50 mM D-Glucose, VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol und VM + 50 mM D-Mannitol anbezogen worden waren, wie unter II.4.3 beschrieben, präpariert. Je 5 µg der erhaltenen Gesamt RNA wurden auf einem 1 %igen Agarosegel, das 3% (w/v) Formaldehyd enthielt, aufgetrennt und nachfolgend auf eine Nylonmembran transferiert (II.4.11.2). Ein 556 bp großes PCR-Fragment, das die ersten 549 Basen vom 5'-Ende des *mgdh* Gens umfasste, diente als Matrize zur Herstellung einer DIG-markierten anti-sense RNA Sonde (II.4.11.1).

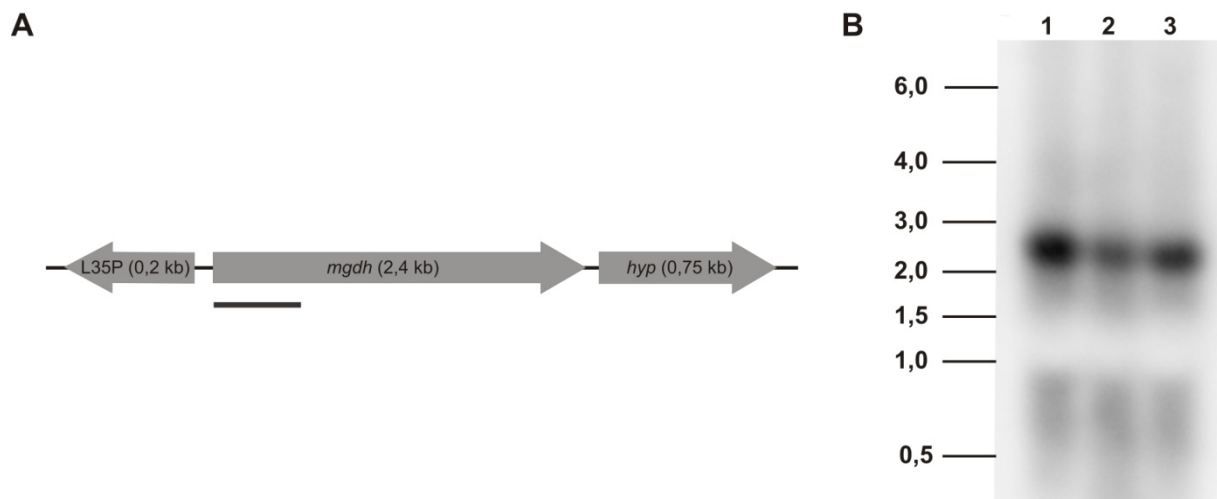


Abbildung 18: Northern Blot Analyse zur Untersuchung der Transkriptlänge des *mgdh* Gens. 5 µg der Gesamt RNA von *G. oxydans* DSM 7145, angezogen auf VM + 50 mM D-Glucose, VM + 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol und VM + 50 mM D-Mannitol wurden auf einer 1,0 %igen Agarosegel mit 3 % (w/v) Formaldehyd aufgetrennt und nach einem Transfer auf eine Nylonmembran mit einer DIG markierten *anti-sense* RNA Sonde bei 68° hybridisiert. A Genetische Organisation des *mgdh* Gens in *G. oxydans* ATCC 621H: *hyp*: hypothetisches Protein; *mgdh*: membranständige Glucose-Dehydrogenase; L35P: LSU ribosomales Protein L35P. Der Bindungsort der Sonde ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. B Northern Blot Analyse: Spur 1: Gesamt RNA *G. oxydans* DSM 7145 VM + 50 mM D-Glucose; Spur 2: Gesamt RNA *G. oxydans* DSM 7145 VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol; Spur 3: Gesamt RNA *G. oxydans* DSM 7145 VM + 50 mM D-Mannitol; Größenstandard: *High Range RNA ladder* (kb)

Abbildung 18 verdeutlicht, dass in der Northern Blot Analyse für das *mgdh* Gen ein Transkript mit einer Größe von ca. 2,3 kb erhalten wurde. Die Sequenzierung des *mgdh* Gens von *G. oxydans* DSM 7145 hatte zuvor gezeigt, dass dieses eine Größe von 2427 bp hat. Da die verwendete Sonde am 5'-Ende des Transkripts band und die Größe des erhaltenen Fragments in etwa der Größe des *mgdh* Gens entsprach, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *mgdh* Gen monocistronisch transkribiert wird.

3.2.3 Konstruktion des Vektors zur Deletion der Glucose- Dehydrogenase

Zur Erstellung des Deletionsvektors wurden zunächst die Regionen unmittelbar stromaufwärts des Startcodons und unmittelbar stromabwärts des Stoppcodons der membranständigen Glucose-Dehydrogenase durch PCR-Reaktionen amplifiziert. Die mit den Primern *mgdh_up_for/mgdh_up_rev* amplifizierte Homologieregion hatte eine Größe von 727 bp, die mit den Primern *mgdh_down_for/mgdh_down_rev* generierte Homologieregion eine Größe von 818 bp. Nach der Aufreinigung beider PCR-Produkte (II.3.7) wurden diese mit der *long flanking homology* PCR Methode (Wach, 1996) (II.3.8.4) miteinander fusioniert. Das durch die Fusion erzeugte PCR-Produkt (1518 bp) wurde zunächst in den Vektor pSC-A kloniert (II.3.9.1) und nachfolgend aus diesem mit einer durch die PCR eingefügten *Bam*HI Schnittstelle und einer der im Vektor vorhandenen *Eco*RI Schnittstelle herausgeschnitten. Schließlich wurden die Homologieregionen in den mit *Bam*HI und *Eco*RI hydrolysierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer, 1994) ligiert. Nach Überprüfung der korrekten Insertion erfolgte die Transformation des nun als pJV7 bezeichneten Vektors in *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983).

3.2.3.1 Verifikation der Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase

Der Deletionsvektor pJV7 wurde wie unter II.3.12.5 beschrieben in *G. oxydans* DSM 7145 konjugiert. Die nach zwei Tage erhaltenen kanamycin-resistenten Kolonien wurden nochmals auf dem Selektivmedium (VM + 50 mM D-Mannitol + 50 µg/ml Kanamycin + 50 µg/ml Cefoxitin) ausgestrichen. Die Integration des Deletionsvektors in das Chromosom wurde durch eine Kolonie-PCR mit den Primerkombinationen *mgdh_v_for/pk19_Seq_rev* bzw. *mgdh_v_rev/pk19_seq_for* nachgewiesen. Wie in Abbildung 20 zu erkennen bindet der Primer *mgdh_v_rev* stromaufwärts der oberen Homologieregion, während der Primer *pk19_Seq_rev* im Plasmidrückgrat bindet. Das PCR-Produkt dieser Reaktion hatte eine Größe von 1,6 kb, während das Produkt der Primerkombination *pk19_Seq_for/mgdh_v_rev* eine Größe von 4,1 kb hatte. Der Primer *pk19_Seq_for* band dabei wiederum im Plasmidrückgrat, der Primer *mgdh_v_rev* stromabwärts der unteren Homologieregion.

Bei acht der zehn untersuchten Kolonien konnte eine korrekte Integration des Deletionsvektors in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 nachgewiesen werden. Zwei dieser Kolonien wurden nochmals in VM + 50 mM D-Mannitol angeimpft und in diesem für 72 h inkubiert. Nachdem verschiedene Verdünnungen dieser Kulturen ausplattiert worden waren, wurden tausend Kolonien je einmal auf einem Selektivmedium (VM + 50 mM D-Mannitol + 50 µg/ml Kanamycin) und einem Vollmedium ohne Selektionsdruck (VM + 50

mM D-Mannitol) ausgestrichen. Das zweite Rekombinationsereignis wurde durch den Verlust der Kanamycinresistenz identifiziert. Eine der tausend ausgestrichen Kolonien wies den erwarteten kanamycin-sensitiven Phänotyp auf. Eine Kolonie-PCR mit der Primerkombination *mgdh_v_for/mgdh_v_rev* ergab für diese Kolonie ein Fragment von 1689 bp, während mit genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 ein Fragment mit einer Größe von 4116 bp erhalten wurde. Die Deletion der membranständigen Dehydrogenase wurde weiterhin mit dem in Abbildung 19 gezeigten *Southern Blot* bestätigt.

Die im *Southern Blot* verwendete *mgdh* Sonde wurde durch eine PCR mit den Primern *mgdh_p_for/mgdh_up_rev* und Plasmid pJV7 als Matrize erstellt und nachfolgend wie unter II.3.11.1 beschrieben mit Biotin markiert.

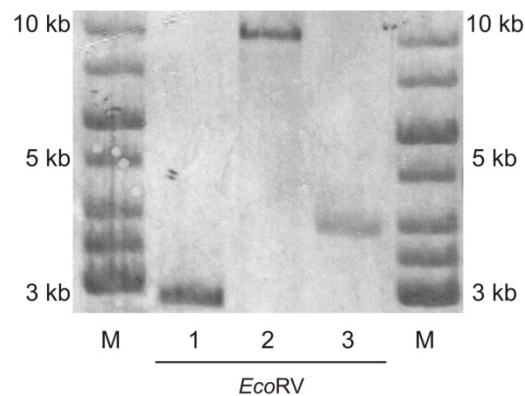
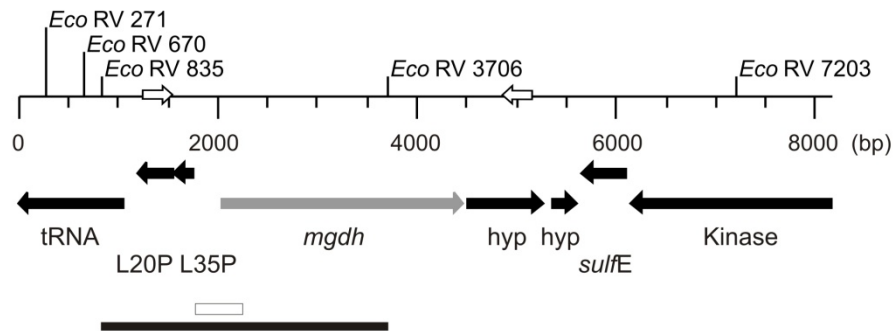


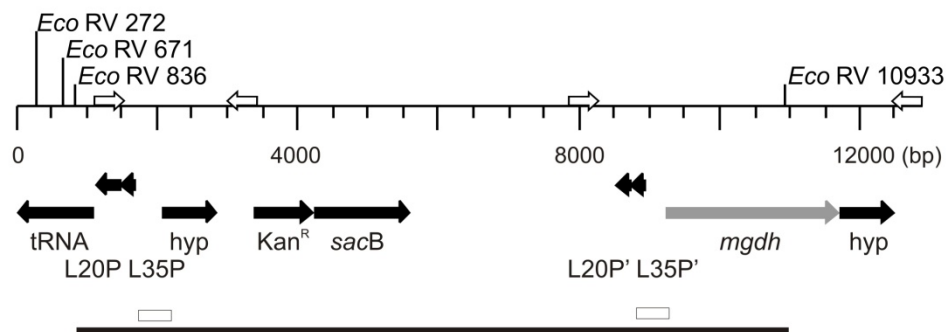
Abbildung 19: *Southern Blot* Analyse zur Bestätigung der Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145. Genomische DNAs von *G. oxydans* DSM 7145, *G. oxydans* 7145 *mgdh::pJV7* und *G. oxydans* 7145 Δ *mgdh* wurden mit *EcoRV* hydrolysiert, auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung mit der DIG markierten *mgdh* DNA Sonde erfolgte bei 68°C. Spuren 1: *G. oxydans* DSM 7145; Spur 2: *G. oxydans* DSM 7145 *mgdh::pJV7* Spur 3: *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*; M: Marker

Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass nach der *EcoRV* Hydrolyse genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145, *G. oxydans* DSM 7145 *mgdh::pJV7* und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* und nachfolgender Hybridisierung mit der *mgdh* Sonde Fragmentgrößen von etwa 2,8 kb (*G. oxydans* DSM 7145), 10 kb (*G. oxydans* DSM 7145 *mgdh::pJV7*) und 3,9 kb (*G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*) erhalten wurden. Ein Abgleich mit Abbildung 20 verdeutlicht, dass durch die Deletion eine in dem Gen der membranständigen Glucose-Dehydrogenase vorhandene *EcoRV* Schnittstelle wegfällt und somit nach der Deletion ein größeres Fragment als im Wildtyp zu erwarten war.

- A Anordnung der membranständigen Glucose Dehydrogenase und der flankierenden Gene in *G. oxydans* DSM 7145



- B Anordnung der membranständigen Glucose Dehydrogenase und der flankierenden Gene nach Integration des Vektors pJV7 in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145



- C Anordnung der die membranständigen Dehydrogenase flankierenden Gene nach Deletion der membranständigen Dehydrogenase

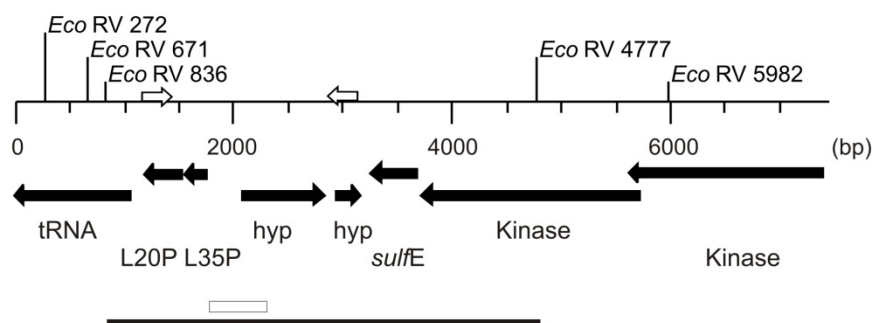


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Anordnung der die Glucose-Dehydrogenase flankierenden Gene in *G. oxydans* DSM 7145, nach Integration des Deletionsvektors pJV7 in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 und nach Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase. tRNA, Phenylalanyl tRNA Synthetase α Kette; L20P, LSU ribosomales Protein (L20P); L35P, LSU ribosomales Protein (L35P); hyp, hypothetische Proteine; *sulfE*, SulfE vermutlich an der Assemblierung von Fe-S-Clustern beteiligt; Kinase, an der Signaltransduktion beteiligte Proteinkinase; *mgdh*, membranständige Glucose-Dehydrogenase; Kan^R, Kanamycin Resistenzgen; *sacB*, Levansucrase Die im *Southern Blot* zu erwartenden Fragmente sind durch schwarze Rechtecke, die Bindungstellen der *mgdh* Sonde sind durch weiße Rechtecke dargestellt. Die die Glucose-Dehydrogenase flankierenden Gene wurden anhand der Annotation von *G. oxydans* ATCC 621H bezeichnet.

3.2.4 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*

Das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* wurde auf VM (II.2.1.1) mit 50 mM der folgenden Kohlenstoffquellen untersucht: D-Glucose, D-Mannitol, *meso*-Erythritol und Glycerin. Darüber hinaus wurde das Wachstum auf einem Substratgemisch von jeweils 25 mM D-Glucose und 25 mM D-Mannitol verfolgt. Die in Tabelle 7 gezeigten Wachstumsraten für *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* wurden in vier biologischen Experimenten ermittelt. Aus diesen wird ersichtlich, dass die Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase das Wachstum in der exponentiellen Wachstumsphase auf Zuckeralkoholen und D-Glucose/D-Mannitol nicht wesentlich beeinflusste. Die auf D-Mannitol, *meso*-Erythritol und Glycerin ermittelten Wachstumsraten waren verglichen mit *G. oxydans* DSM 7145 um den Faktor $\sim 1,2$ erhöht und es konnte auf kein Einfluss der Deletion auf die nach 24 Stunden erreichte Optische Dichte beobachtet werden. Bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol waren die Wachstumsraten von Wildtyp und Glucose-Dehydrogenase Mutante gut zu vergleichen, es zeigte sich jedoch, dass *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* nach 24 Stunden mit einer $OD_{600} \sim 3$ eine höhere Optische Dichte als *G. oxydans* DSM 7145 ($OD_{600} \sim 2$) erreichte.

Tabelle 7: Übersicht über die Wachstumsraten (h^{-1}) von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf den angegebenen Kohlenstoffquellen. Die Zellanzucht erfolgte bei 30 C in VM mit 50 mM der angegebenen Kohlenstoffquellen. Bei der Anzucht auf Substratgemischen wurden je 25 mM der Substrate eingesetzt. Die gezeigten Wachstumsraten wurden in vier biologischen Experimenten ermittelt.

	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 μ (h^{-1})	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 Δ <i>mgdh</i> μ (h^{-1})
D-Mannitol	0,48 (+/- 0,04)	0,62 (+/- 0,09)
D-Glucose/D-Mannitol	0,48 (+/- 0,07)	0,50 (+/- 0,06)
<i>meso</i> -Erythritol	0,44 (+/- 0,02)	0,53 (+/- 0,09)
Glycerin	0,47 (+/- 0,02)	0,53 (+/- 0,04)

Interessanterweise war auch ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf VM mit 50 mM D-Glucose nachweisbar. Wie in Abbildung 21 zu erkennen, war die in der logarithmischen Wachstumsphase ermittelte Wachstumsrate von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* mit $0,37$ (+/- $0,03$) h^{-1} zwar deutlich niedriger als die des Wildtyps ($0,69$ +/- $0,05$), die Mutante erreichte jedoch nach 24 Stunden eine um den Faktor 2,8 höhere Optische Dichte als der Wildtyp ($OD_{600} \sim 1,16$ für *G. oxydans* DSM 7145 gegenüber $OD_{600} \sim 2,99$ für *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*).

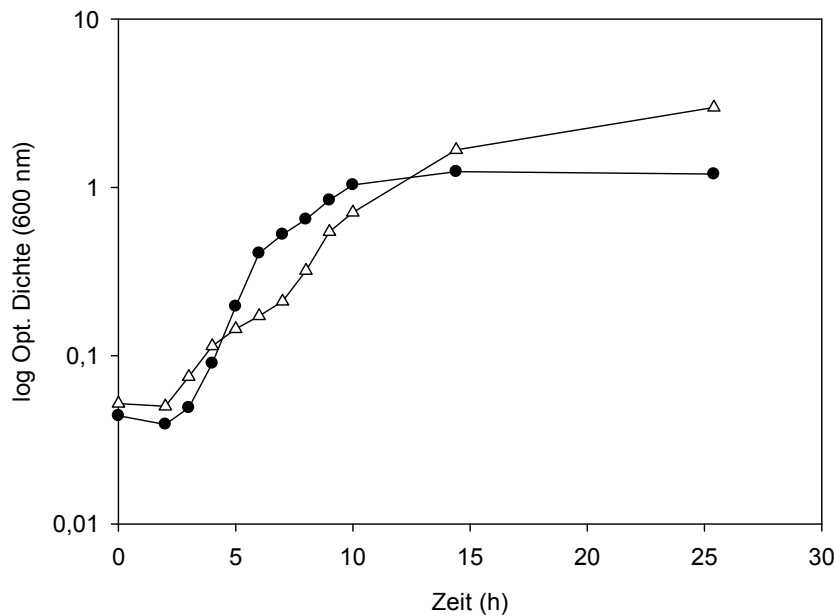


Abbildung 21: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 (●) und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (Δ) auf VM + 50 mM D-Glucose. Die Zellanzucht erfolgte bei 30°C, 150 rpm.

3.2.5 Biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$

3.2.5.1 Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol

Um die Auswirkung der Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase auf biochemischer Ebene zu untersuchen, wurden *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + 50 mM D-Mannitol angezogen. Die Präparation der Membranfraktion erfolgte wie unter II.5.2 beschrieben. Die Aktivität der membranständigen Dehydrogenasen wurde wiederum mit dem PMS-DCPIP Enzymtest an nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion gemessen (II.5.3.1). Die in Abbildung 22 gezeigten Aktivitäten wurden in drei biologischen Experimenten ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase erheblichen Einfluss auf die membranständige Glucose Oxidation hatte. So war die Glucose-Dehydrogenase Aktivität in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ verglichen mit dem Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 um den Faktor 8 vermindert. Auch die spezifische Aktivität gegenüber D-Gluconat war um 40 % vermindert, im Gegensatz dazu konnte eine leicht erhöhte Oxidation von Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol und D-Sorbitol nach Deletion der membranständigen Dehydrogenase nachgewiesen werden. Der beobachtete Aktivitätsanstieg war jedoch mit einer durchschnittlichen Erhöhung um den Faktor 1,5 wiederum recht gering.

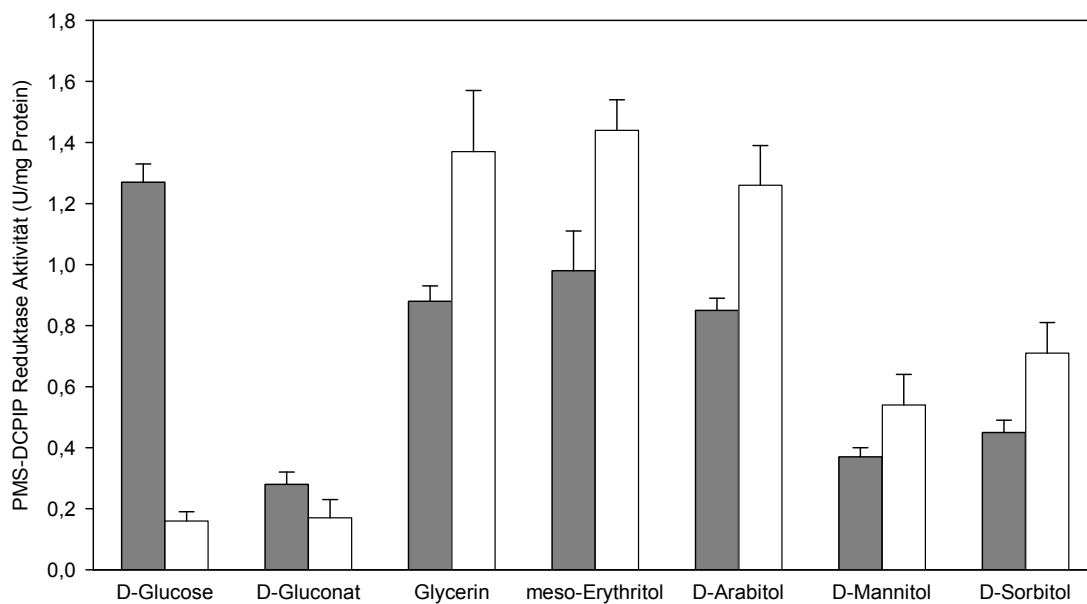


Abbildung 22: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (weiße Balken) bei Anzucht auf VM + 50 mM D-D-Mannitol. Beide Stämme wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest und nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

3.2.5.2 Oxidationsaktivität bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol

Das bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol ermittelte Substratspektrum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ sollte im nächsten Schritt durch Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol verifiziert werden. Dazu wurden *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM mit 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol angezogen. Nach Präparation der Membranfraktion (II.5.2) wurde die membranständige Dehydrogenaseaktivität mit dem PMS-DCPIP Enzymtest ermittelt (II.5.3.1).

Aus Abbildung 23 wird wiederum die erhebliche Reduktion der Glucose- Dehydrogenase Aktivität nach Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase deutlich. Diese fiel mit dem Faktor 33 deutlicher als bei der Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol aus, was zum Teil darauf zurückzuführen war, dass im Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/D-Mannitol mit 2,33 +/- 0,24 U/mg Protein eine höhere Glucose-Dehydrogenase Aktivität, als bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol (1,27 +/- 0,06) messbar war.

Wie schon bei der Anzucht auf VM mit D-Mannitol war auch bei Anzucht auf VM mit D-Glucose/D-Mannitol eine geringere D-Gluconat Oxidation in der Membranfraktion von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ nachweisbar, diese war jedoch deutlicher (60%) als bei der

Anzucht auf D-Mannitol. Die von der Glycerin-Dehydrogenase katalysierten Aktivitäten waren in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol nur für *meso*-Erythritol, Glycerin und D-Mannitol erhöht. Die Oxidation von D-Arabitol war in der Mutante unwesentlich verändert, während die D-Sorbitol Oxidation in *G. oxydans* DSM 1745 $\Delta mgdh$ niedriger als in *G. oxydans* DSM 7145 war.

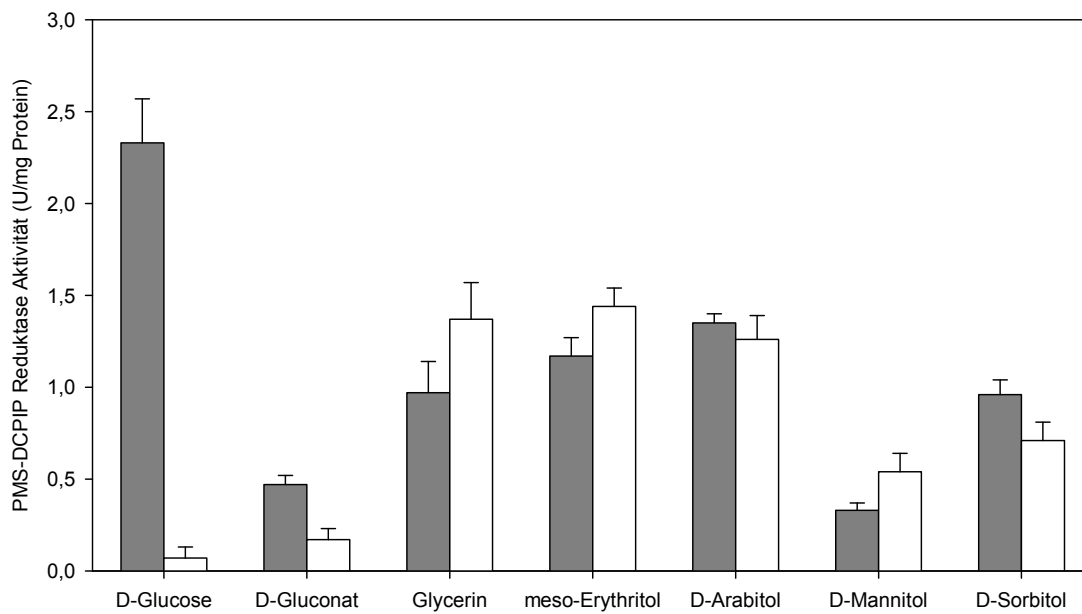


Abbildung 23: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (weiße Balken) bei Anzucht auf VM + 25 mM D-Glucose/ 25 mM D-Mannitol. Beide Stämme wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

3.2.6 Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$

3.2.6.1 Konstruktion des Komplementationsvektors pJV 12

Zur Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ wurde das Strukturgen der membranständigen Dehydrogenase mit der möglichen Promotorregion in den Vektor pBBR-1 MCS2 (Kovach, 1995) kloniert. Die Vorhersage der Promotorregion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase erfolgte mit dem Neural Network Promoter *prediction tool* (Reese, 2001). Diese *in silico* Analyse identifizierte das 86 bp stromaufwärts von Startcodon gelegene Thymin als putativen Transkriptionsstartpunkt (vgl. Abbildung 24).

Eine PCR-Amplifikation der membranständigen Glucose-Dehydrogenase samt der putativen Promotorregion mit den Primern *mgdh_compl_for/mgdh_compl_rev* und genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 als Matrize ergab ein PCR-Produkt mit einer Größe von 2724 bp. Dieses wurde zunächst in den Vektor pSC-A (II.3.9.1) subkloniert und schließlich aus diesem

mit den in der PCR-Reaktion eingefügten *EcoRI*, *SalI* Schnittstellen hydrolysiert. Nach Ligation des *EcoRI/SalI*-Fragments in den mit *EcoRI/SalI* geöffneten Vektor pBBR-1 MCS2 und Überprüfung der korrekten Orientierung des Fragments, wurde das nun als pJV12 bezeichnete Konstrukt in *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* konjugiert. Als Vektorkontrolle diente das Plasmid pBBR-1 MCS2 in *G. oxydans* DSM 7145.

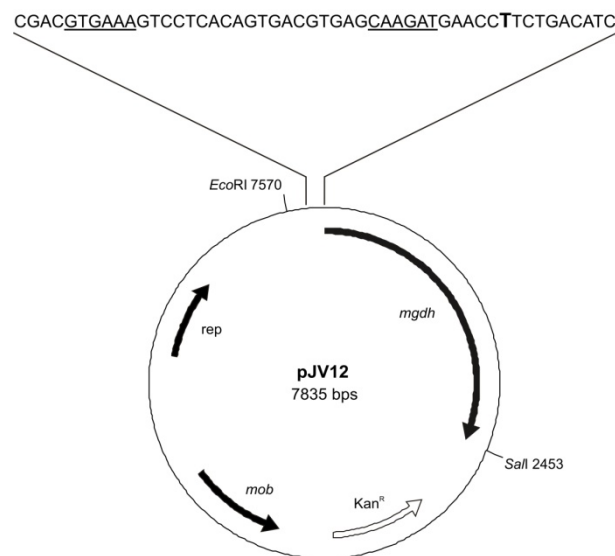


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Komplementationsvektors pJV12. Der putative Transkriptionsstart ist durch einen Großbuchstaben hervorgehoben. Die möglichen -10 und -35 Regionen sind unterstrichen.

3.2.6.2 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12)

Um zu untersuchen, ob nach Komplementation durch das Plasmid pJV12 wieder ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* nachweisbar war, wurden *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) in VM mit 50 mM D-Glucose und 25 μ g/ml Kanamycin bei 30°C und 150 rpm angezogen. Die Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 erfolgte unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Zugabe von Kanamycin. Abbildung 25 zeigt die Wachstumsverläufe eines repräsentativen Experiments. Aus dieser wird ersichtlich, dass *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Verdopplungszeit von 89 min nicht den Wert des Wildtyps (60 +/- 5 min) erreichte. Die Komplementation mit Plasmid pJV12 führte jedoch dazu, dass *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) nach 24 mit einer OD₆₀₀ ~1,2 eine Optische Dichte erreichte, die derjenigen des Wildtyps weitestgehend entsprach (1,0). Die Vektorkontrolle *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) wuchs mit einer Verdopplungszeit von 123 min langsamer als *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12), erreichte nach 24 Stunden jedoch auch eine Optische Dichte (600 nm) von 1. Der

hier gezeigte Wachstumsversuch ließ vermuten, dass die Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* mit dem Plasmid pJV12, zumindest teilweise, erfolgreich war. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob in der Membranfraktion von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) wieder die Oxidation von D-Glucose nachweisbar war.

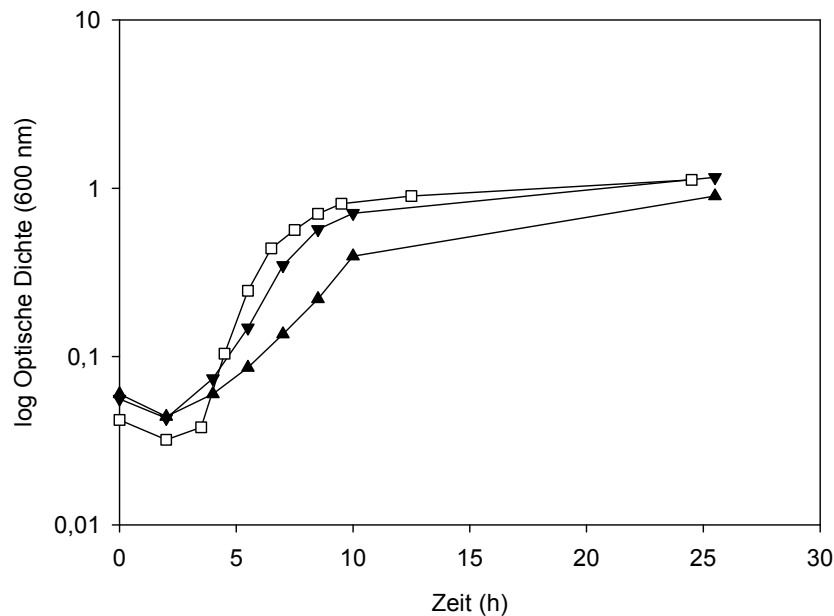


Abbildung 25: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 (□), *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) (▲) und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) (▼) auf VM + 50 mM D-Glucose. Die Zellanzucht erfolgte bei 30°C und 150 rpm.

3.2.6.3 Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12)

Zur Messung der Glucose Oxidation in *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) wurden dieser Stamm und als Kontrolle *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) auf VM mit D-Mannitol (50 mM) bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Präparation der Membranfraktion erfolgte wie unter II.5.2 beschrieben und zur Aktivitätsmessung wurde PMS-DCPIP Enzymtest verwendet (II.5.3.1). Es wurden drei biologische Experimente und für jedes Substrat Doppelbestimmungen durchgeführt. Da die interexperimentellen Aktivitäten stark schwankten, wurden diese relativ zu der von der Glycerin-Dehydrogenase katalysierten D-Arabitol Oxidation in *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) angegeben.

Abbildung 26 veranschaulicht die Ergebnisse der biochemischen Messungen. Wie zu erwarten, waren die von der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase vermittelten Aktivitäten wurden durch die Komplementation nicht beeinflusst. In der Membranfraktion von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (pJV12) konnte wieder eine deutliche D-Glucose Oxidation nachgewiesen werden, die gemessene spezifische Aktivität war jedoch im

Vergleich mit der Kontrolle *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS) um die Hälfte vermindert.

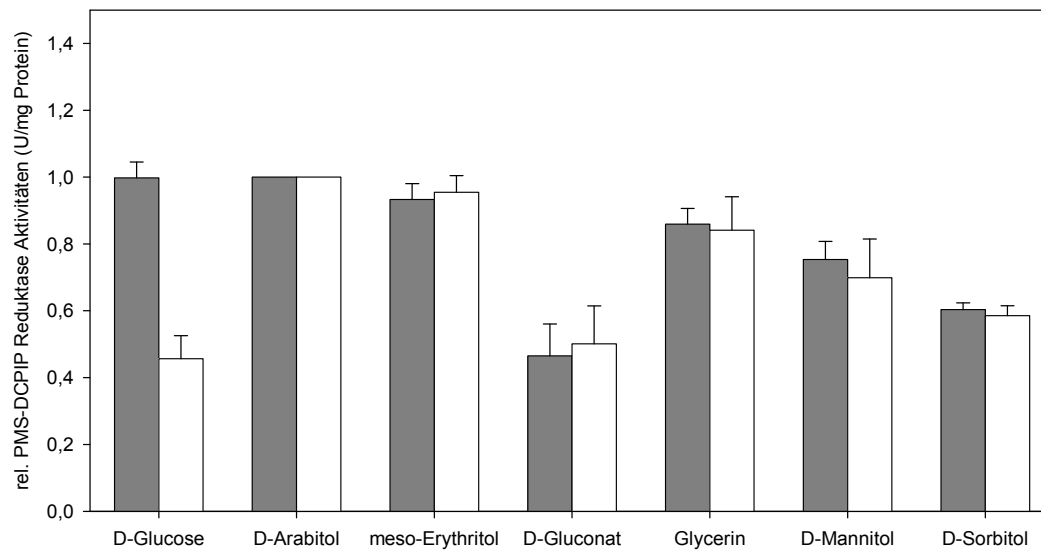


Abbildung 26: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (pBBR-1 MCS2) (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pJV12) (weiße Balken) bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol. Beide Stämme wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlivaine Puffer (pH 5,0) durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

3.2.7 Stoffwechsel von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + D-Glucose

Wie in Abschnitt III.2.4 dargestellt, war ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM mit 50 mM D-Glucose möglich. Weitere Wachstumsversuche auf VM + 12,5 mM bzw. 25 mM D-Glucose zeigten, dass auch geringere Konzentration von D - Glucose das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ ermöglichten (Daten nicht gezeigt). Die biochemische Charakterisierung der Mutante ergab jedoch, dass bei Anzucht auf VM mit D-Mannitol und VM mit D-Mannitol/D-Glucose die Glucose Oxidation in der Membranfraktion deutlich reduziert war. Somit stellte sich die Frage, wie *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ D-Glucose verstoffwechselt. Um dies zu untersuchen, wurden *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + 50 mM Glucose angezogen. Aktivitätsmessungen in der Membranfraktion sollten zeigen, ob in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ bei Anzucht auf D-Glucose eine Dehydrogenase induziert wird, die die Funktion der membranständigen Glucose- Dehydrogenase übernimmt. Zudem wurden die Aktivitäten von Schlüsselenzymen der Pentosephosphat- und des Entner-Doudoroff-Weges und der cytoplasmatischen Glucose-Dehydrogenase gemessen, um zu untersuchen, ob ein erhöhter Flux durch die intrazellulären Stoffwechselwege das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + D-Glucose

ermöglicht. Dies erscheint durchaus möglich, da auch Krajewski (2008) ein Wachstum von *G. oxydans* N44-1 $\Delta mgdh$ auf VM + D-Glucose beobachten und eine Aktivierung des cytoplasmatischen Stoffwechsels nachweisen konnte.

3.2.7.1 Aktivitäten ausgewählter Dehydrogenasen in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ bei Anzucht auf VM + D-Glucose

G. oxydans DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase auf VM mit 50 mM D-Glucose angezogen. Die Präparation der Membranfraktion erfolgte wie unter II.5.2 beschrieben. Die nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt gewonnene cytoplasmatische Fraktion wurde mit einer Vivaspin Säule (II.5.1.6) auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens einkonzentriert.

Die Membranfraktion diente zur Messung der membrangebundenen Glucose- Dehydrogenase Aktivität mit dem PMS-DCPIP Enzymtest (II.5.2). In der Cytoplasmafraktion wurde neben der NAD(P)⁺ abhängigen Glucose Oxidation, die Aktivität der Glucose-6-Phosphat und der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase bestimmt. Die Glucose 6-Phosphat Dehydrogenase katalysiert die erste Reaktion des Entner-Doudoroff- als auch des oxidativen Pentosephosphat-Weges, nämlich die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat. Dieses wird von dem zweiten Enzym des Pentosephosphat Weges, der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase, zu D-Ribulose-5-Phosphat decarboxyliert.

(Tonouchi *et al.*, 2003) zeigten, dass die Glucose-6-Phosphat- und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die bei der Oxidation gewonnenen Elektronen sowohl auf NAD⁺ als auch auf NADP⁺ übertragen können. Biochemische Messungen an aufgereinigter Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zeigten jedoch, dass NADP⁺ der physiologische Elektronenakzeptor der Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase und NAD⁺ der physiologische Elektronenakzeptor der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ist (Adachi *et al.*, 1979; Deppenmeier, unveröffentlicht). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die NADP⁺ abhängige Glucose-6-Phosphat- und die NAD⁺ abhängige 6-Phosphogluconat-Oxidation, wie unter II.5.3.2 beschrieben, gemessen.

Die Ergebnisse der biochemischen Messungen sind in Abbildung 27 zusammengefasst. Unter den untersuchten Bedingungen konnte in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auch bei Anzucht auf VM + 50 mM Glucose keine Aktivität der membranständigen Glucose- Dehydrogenase nachgewiesen werden. Diese war verglichen mit dem Wildtyp um etwa den Faktor 170 vermindert. Die Messung der Aktivität der cytoplasmatischen Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ergab, dass diese in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ höher

als im Wildtyp waren. So zeigte sich ein um den Faktor 3,5 erhöhte Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und eine um den Faktor 4,5 erhöhte Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Keine signifikante Veränderung war bei Messung der Aktivität der cytoplasmatischen Glucose- Dehydrogenase erkennbar.

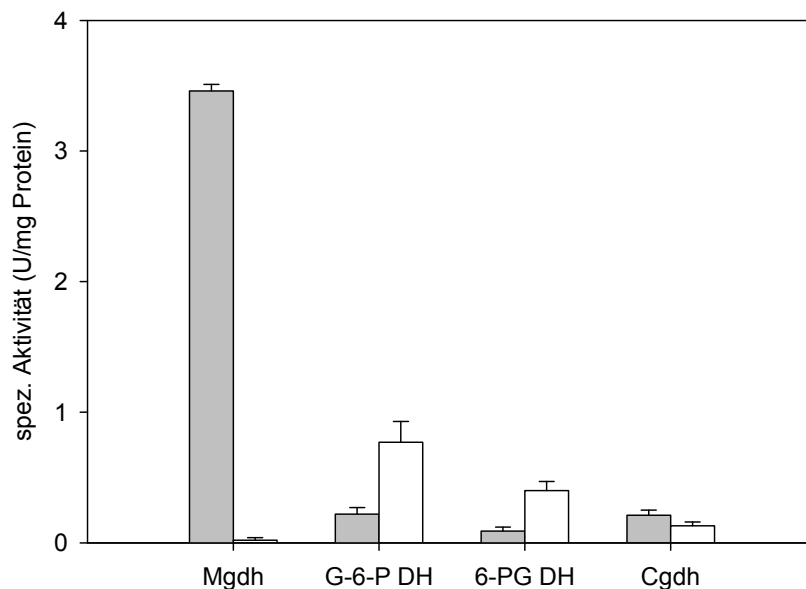


Abbildung 27: Übersicht über die gemessene membranständige Aktivität der Glucose- Dehydrogenase und den Aktivitäten der cytoplasmatischen Glucose-6-Phosphat-, 6-Phosphogluconat- und Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh (weiße Balken). Die Zellanzucht erfolgte auf VM + 50 mM D-Glucose bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase. Die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase Aktivität wurde mit dem PMS-DCPIP Enzymtest mit nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine-Puffer (pH 5,0) gemessen. Die cytoplasmatischen Dehydrogenaseaktivitäten wurden in Gegenwart von 5 mM Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat oder 25 mM D-Glucose in 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) untersucht.

Die gezeigten biochemischen Daten deuten darauf hin, dass der Pentosephosphat- und möglicherweise auch der Entner-Doudoroff-Weg das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh auf D-Glucose ermöglichen. Die cytoplasmatische Glucose Oxidation scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die auf biochemischer Ebene gezeigte Aktivierung der cytoplasmatischen Stoffwechselwege werden im folgenden Abschnitt auf transkriptioneller Ebene mittels qualitativer Real-Time RT-PCR untersucht.

3.2.7.2 Untersuchung der Transkription ausgewählter Dehydrogenasen in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh

Um die Transkription ausgewählter cytoplasmatischer Dehydrogenasen in *G. oxydans* DSM 7145 untersuchen zu können, mussten zunächst die DNA Sequenzen der entsprechenden Gene ermittelt werden, da der hier verwendete Stamm nicht vollständig sequenziert ist. Dazu

wurden anhand der Sequenz von *G. oxydans* ATCC 621H Oligonukleotide zur Amplifikation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, der cytoplasmatischen Glucose-Dehydrogenase und der DNA-Gyrase (β -Untereinheit) abgeleitet. Die Gene wurden mit genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 als Matrize und *Pfu*-Polymerase amplifiziert und je nach Größe der PCR-Produkte die Enden bzw. das gesamte Produkt sequenziert. Die generierten Sequenzen befinden sich im Anhang auf den Seiten . .

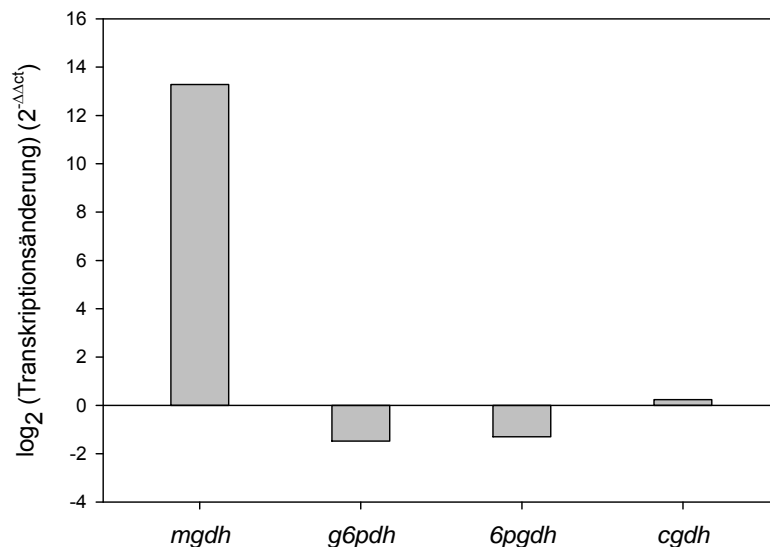


Abbildung 28: \log_2 (Expressionsänderung) ausgewählter Gene in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose. Werte größer null bezeichnen eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145, Werte kleiner null bezeichnen eine stärkere Transkription in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$; *mgdh*: membranständige Glucose- Dehydrogenase; *g6pdh*: Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase; *6pgdh*: 6-Phosphogluconat Dehydrogenase; *cgdh*: cytoplasmatische Glucose-Dehydrogenase

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Präparation dienten Pellets, die aus denselben Kulturen stammten, die für die unter III.2.5.5 gezeigten biochemischen Messungen verwendet wurden. Die RNA wurde wie unter II.4.3 beschrieben präpariert und die relative quantitative Real-Time RT-PCR, wie unter II.4.10 gezeigt, durchgeführt. Als endogene Kontrolle, deren Expression unter den untersuchten Bedingungen konstant sein sollte, diente in dieser Arbeit die β -Untereinheit der DNA-Gyrase. Die Expressionsänderung wurde schließlich durch die $\Delta\Delta ct$ Formel (Talaat *et al.*, 2002) ausgedrückt.

Die in Abbildung 28 gezeigten Expressionsdaten spiegeln demnach die n-fache Veränderung der Expression der untersuchten Gene im Vergleich von *G. oxydans* DSM 7145 mit *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ wider. Zur besseren Darstellung der Daten wurde der \log_2 (Expressionsänderung) angegeben. Ein Wert größer null bezeichnet dabei eine stärkere Expression des Gens in *G. oxydans* DSM 7145, während ein Wert kleiner null für eine stärkere Expression in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ steht. Wie zu erwarten, war in

G. oxydans DSM 7145 eine deutlich stärkere Expression des *mgdh* Gens nachweisbar (13,2). Im Gegensatz dazu wurde für das *cgdh* Gen (cytoplasmatische Glucose-Dehydrogenase) ein Wert von 0,24 erhalten, was darauf hindeutet, dass das Gen unter beiden untersuchten Bedingungen etwa gleich stark exprimiert wird. Für die Gene der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase wurden Werte von -1,4 bzw. -1,3 erhalten, was eine leicht verstärkte Expression in *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* impliziert. Die in weiteren biologischen Experimenten erhaltenen Expressionsdaten deuteten jedoch auf eine verstärkte Expression des *g6pdh* und des *6pgdh* Gens in *G. oxydans* DSM 7145 hin (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte somit auf transkriptioneller Ebene eine Aktivierung der cytoplasmatischen Stoffwechselwege in *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* bei Anzucht auf D-Glucose nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3.2.8 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf P1-Medium

Mit dem im P1-Medium (Gupta *et al.*, 1999) enthaltenen Calciumcarbonat lässt sich die Produktion von Säure durch Klärung der anfangs trüben Platten nachweisen. Abbildung 29 verdeutlicht, dass bei Ausstrich von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* eine Klärung des Mediums zu erkennen war. Diese war jedoch bei *G. oxydans* DSM 7145 deutlich ausgeprägter als bei der Mutante *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*. Zusammen mit den unter III.2.6.5.1 gezeigten biochemischen Daten ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* D-Glucose über einen anderen Stoffwechselweg verwertet als der Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145.

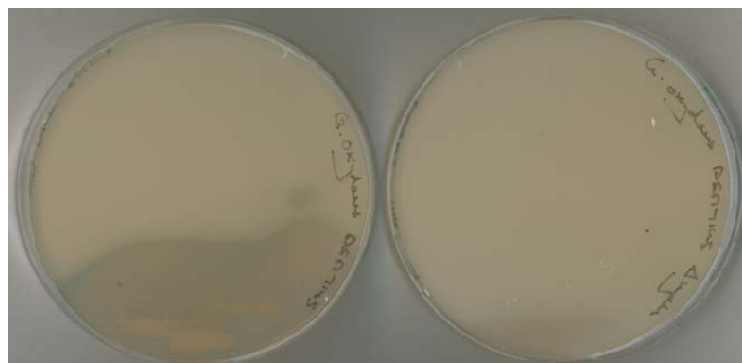


Abbildung 29: Ausstrich von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf P1 Medium. Die Inkubation der Platten erfolgte für 9 Tage bei 30°C.

3.2.8.1 Identifizierung von Ausscheidungsprodukten von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh

Der Ausstrich von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh auf dem P1 Medium zeigte, dass anscheinend beide Stämme, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, Säuren ausscheiden. Um diese näher zu charakterisieren, wurden Kulturüberstände von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh, die bei Anzucht auf VM + D-Glucose zu den Zeitpunkten $t = 0, 6, 12$ und 24 h entnommen worden waren, auf einer AS-11 HC HPLC Säule, die der Detektion von Anionen dient, aufgetrennt.

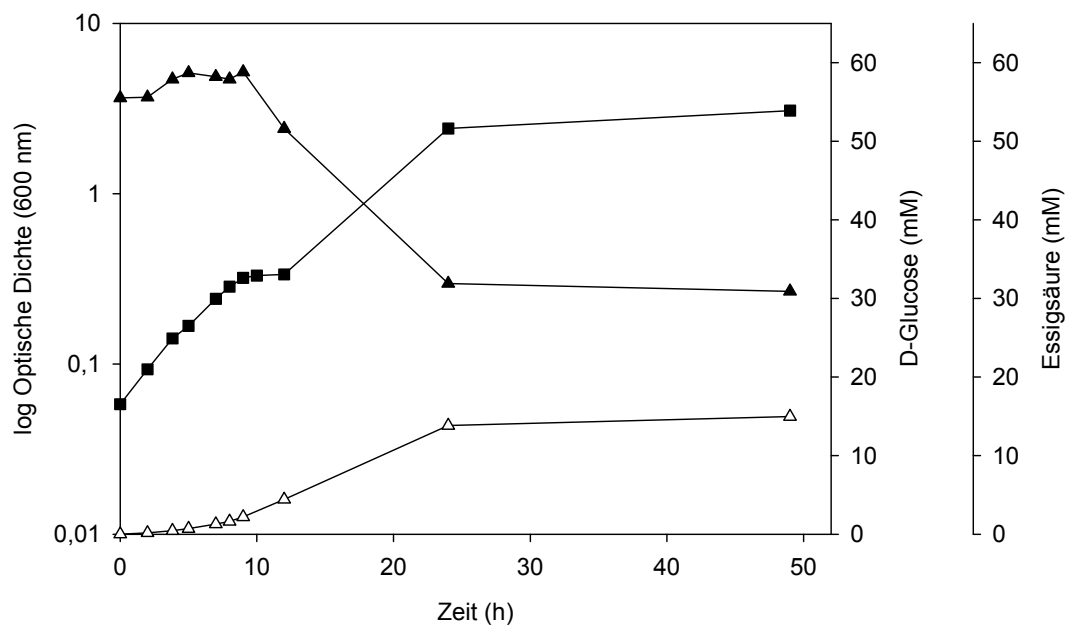


Abbildung 30: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh auf VM + 50 mM D-Glucose und Quantifizierung von D-Glucose und Essigsäure im Kulturüberstand. (■): Optische Dichte (600 nm); (▲): Konzentration D-Glucose (mM); (△): Konzentration Essigsäure (mM).

Im Verlauf dieser Zeitreihe trat bei den Überständen von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh, nicht jedoch bei den Überständen von *G. oxydans* DSM 7145, ein *peak* mit einer Retentionszeit von $t = 4$ min auf, was unter den untersuchten Bedingungen der Retentionszeit von Acetat entspricht (Daten nicht gezeigt). Die Akkumulation von Acetat im Kulturüberstand von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh konnte auch durch eine nachfolgende GC-MS Analyse bestätigt werden. Abbildung 30 zeigt einen Wachstumsverlauf von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh auf VM + 50 mM D-Glucose und die D-Glucose- und Essigsäure-Konzentration im Kulturüberstand. Zu Beginn des Experiments ($t_0 - t_9$) war keine deutliche Abnahme der D-Glucose Konzentration und nur eine geringe Veränderung der Essigsäurekonzentration im Überstand nachweisbar, jedoch war eine Zunahme der Optischen Dichte von 0,058 auf 0,32 zu beobachten. Im folgenden Zeitabschnitt von $t_{12} - t_{24}$ war ein deutliches Wachstum ($\Delta OD_{600} \sim 2$) verbunden mit einem D-Glucose Verbrauch von 20 mM erkennbar. Gleichzeitig nahm

die Essigsäurekonzentration im Kulturüberstand um ca. 9,5 mM zu. Interessanterweise wurden nur 45% der im Medium enthaltenen D-Glucose von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* verwertet und dabei häuften sich 15 mM Essigsäure im Kulturüberstand an. Im Gegensatz dazu setzte der Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 56 mM D-Glucose in 7 h um und erreichte dabei eine Optische Dichte von 0,85 (Abbildung 31).

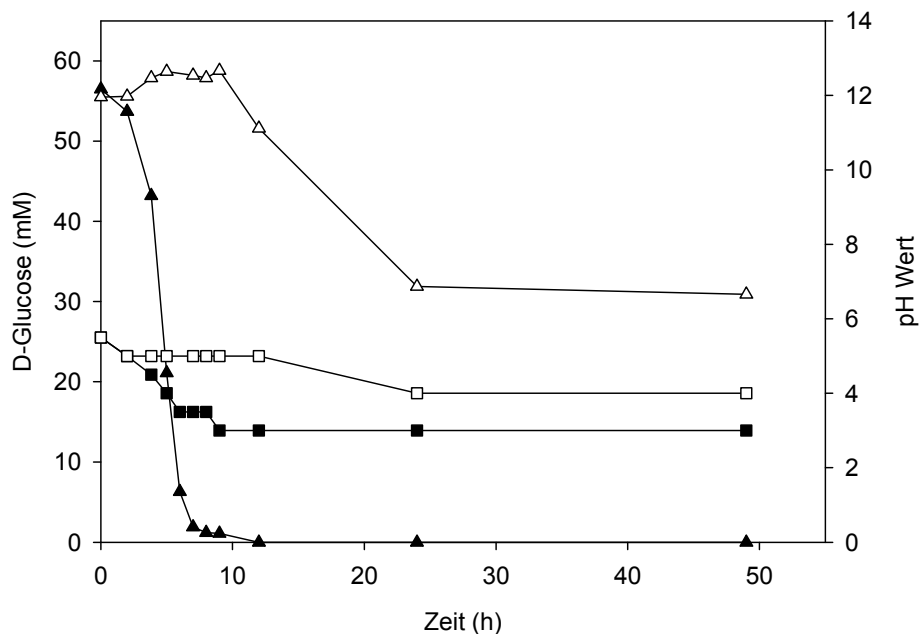


Abbildung 31: Quantifizierung von D-Glucose und Veränderung des pH-Wertes im Kulturüberstand von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* bei Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose. (▲): D-Glucose (mM) *G. oxydans* DSM 7145; (△): D-Glucose (mM) *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*; (■): pH-Wert *G. oxydans* DSM 7145; (□): pH-Wert *G. oxydans* DSM 7145

Aus Abbildung 31 geht weiterhin hervor, dass die Oxidation von D-Glucose durch *G. oxydans* DSM 7145 mit einem raschen Absinken des pH-Wertes im Kulturüberstand einherging, während bei *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* ein deutlich langsames und weniger ausgeprägtes Absinken des pH-Wertes zu beobachten war, das aber mit der Akkumulation von Essigsäure im Kulturüberstand korrelierte. Die in Abbildung 31 gezeigten Daten verdeutlichen, dass auch *G. oxydans* DSM 7145 Säuren produziert. Diese wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert. Allerdings zeigte, die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta, dass auch dieser Stamm über Enzyme zur Produktion von D-Gluconat und 2- bzw. 5-D-Keto-Gluconat verfügt.

3.3 Umsatz von *meso*-Erythritol durch *G. oxydans* DSM 7145

Die Deletion der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 zeigte, dass dieses Enzym die Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose vermittelt. Wie

in Abschnitt III.1.4.1 gezeigt, ist ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM mit 50 mM *meso*-Erythritol möglich, während kein Wachstum der Mutante *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf demselben Medium zu beobachten war. Die im folgenden beschriebenen Experimente dienen der Untersuchung des *meso*-Erythritol Verbrauchs und der Akkumulation von L-Erythrulose bei Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol.

3.3.1 Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol

Zur Quantifizierung des *meso*-Erythritol Verbrauchs und der Akkumulation von L-Erythrulose wurde *G. oxydans* DSM 7145 auf VM mit 50 mM *meso*-Erythritol angezogen und in regelmäßigen Abständen die Optische Dichte ($\lambda = 600$ nm) verfolgt und Proben des Zellkulturüberstandes entnommen. Die Kulturüberstände wurden zur HPLC Analyse zunächst verdünnt und das darin erhaltene *meso*-Erythritol bzw. die L-Erythrulose mittels einer Carbowac MA-1 oder Carbowac PA-1 Säule (II.6.1.1) und Standardkurven beider Substanzen quantifiziert.

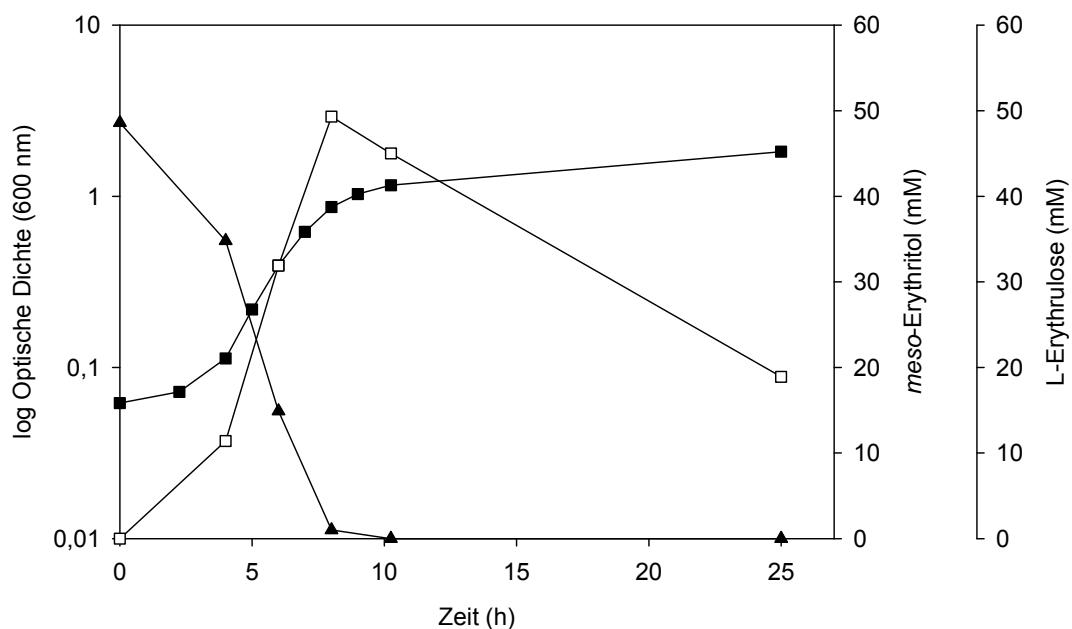


Abbildung 32: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol und Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose. ■: Optische Dichte (600 nm) *G. oxydans* DSM 7145; ▲: mM *meso*-Erythritol; □: mM L-Erythrulose

Abbildung 32 zeigt ein repräsentatives Experiment zum Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM mit 50 mM *meso*-Erythritol. Es wird deutlich, dass das im Medium enthaltene

meso-Erythritol in der exponentiellen Wachstumsphase aufgebraucht und fast äquimolar zu L-Erythrose oxidiert wird. Ausgehend von einer Optische Dichte (600 nm) von 0,062 und einer *meso*-Erythritol Konzentration von 48 mM zu Beginn des Experiments war nach 8 Stunden eine Optische Dichte (600 nm) von 0,86 messbar. Zu diesem Zeitpunkt war kein *meso*-Erythritol im Kulturüberstand mehr nachweisbar und die Konzentration des Produktes L-Erythrose im Überstand betrug 49 mM. Nach der Oxidation des vorhandenen *meso*-Erythritols kam es zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums. So veränderte sich die Optische Dichte vom Zeitpunkt $t = 8$ h bis zum Punkt $t = 10$ h lediglich um den Faktor 0,3, was mit einer Abnahme der L-Erythrose Konzentration im Kulturüberstand einherging. Diese Abnahme setzte sich im Verlauf des weiteren Wachstums fort, so dass nach 24 Stunden eine Optische Dichte (600 nm) von 1,82 und eine L-Erythrose Konzentration von 19 mM erreicht wurde.

Die hier gezeigten Daten legen den Schluss nahe, dass bei Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM mit 50 mM *meso*-Erythritol zwei Wachstumsphasen zu beobachten sind. In der ersten Wachstumsphase wird das vorhandene *meso*-Erythritol zu L-Erythrose oxidiert, was mit einem schnellen Wachstum der Kultur verbunden ist. In der zweiten Phase findet ein langsames Wachstum auf dem Oxidationsprodukt der ersten Wachstumsphase statt.

3.3.2 Identifizierung von Ausscheidungsprodukten von *G. oxydans* DSM 7145 bei Wachstum auf L-Erythrose

Um die am Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf L-Erythrose beteiligten Stoffwechselwege zu identifizieren, wurden Zellkulturüberstände die bei Anzucht auf *meso*-Erythritol zu den Zeitpunkten $t = 0, 8, 24$ h entnommen worden waren, auf einer AS-11 HC HPLC Säule aufgetrennt. Diese Säule dient zusammen mit dem Leitfähigkeitsdetektor des HPLC Systems der Detektion von Anionen und wurde ausgewählt, da zuvor abgesehen von *meso*-Erythritol und L-Erythrose auf der Carboxpac MA-1 bzw. PA-1 Säule elektrochemisch keine weiteren Substanzen nachgewiesen werden konnten. Die Analyse der Zeitreihe zeigte, dass zum Zeitpunkt $t = 24$ h ein deutlicher peak mit einer Retentionszeit von 4 min auftrat, der zuvor nicht ($t = 0$ h) bzw. nur schwach ($t = 8$ h) vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Unter den verwendeten Bedingungen hat Acetat auf der AS-11 HC Säule eine Retentionszeit von 4 min. Demnach scheint der L-Erythrose Verbrauch von *G. oxydans* DSM 7145 mit einem Ausscheiden von Acetat in den Kulturüberstand einherzugehen. Die Produktion von Acetat konnte auch durch eine GC-MS Analyse der oben genannten Kulturüberstände zweifelsfrei nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 33 verdeutlicht nochmals den *meso*-Erythritol Verbrauch und die Akkumulation von L-Erythrose und Essigsäure im Kulturüberstand bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol. Es zeigt sich, dass zu Beginn des Experimentes keine Essigsäure im Kulturüberstand nachweisbar war und die Essigsäurekonzentration bis zum Zeitpunkt $t = 8$ h auch nur geringfügig zunahm. Erst nach Verbrauch des *meso*-Erythritol ($t = 8$ h) war eine Zunahme der Essigsäurekonzentration verbunden mit einer Abnahme der L-Erythrose Konzentration im Kulturüberstand messbar. So nahm die L-Erythrose Konzentration vom Zeitpunkt $t = 10$ h bis zum Zeitpunkt $t = 24$ h um die Hälfte von 49 mM auf 25 mM ab, während die Essigsäurekonzentration im Kulturübersatnd von 3 auf 10 mM anstieg.

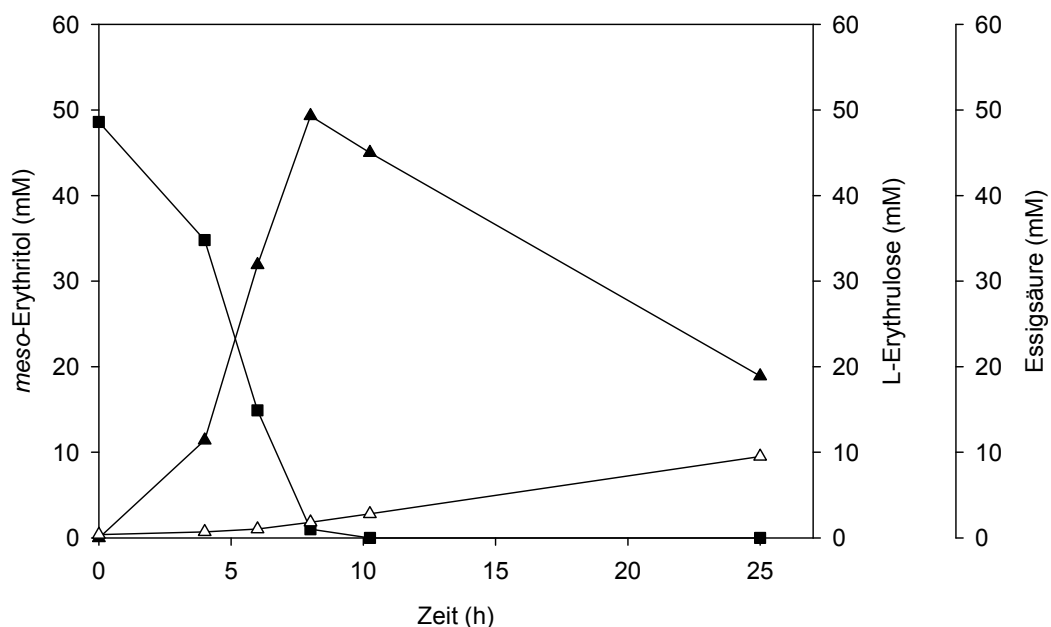


Abbildung 33: Quantifizierung von *meso*-Erythritol, L-Erythrose und Essigsäure im Kulturüberstand von *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol. ■: *meso*-Erythritol Konzentration (mM) im Kulturüberstand; ▲: L-Erythrose- Konzentration (mM) im Kulturüberstand; △ Essigsäure-Konzentration (mM) im Kulturüberstand.

3.3.3 Umsatz von *meso*-Erythritol durch *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145

Die im vorherigen Abschnitt gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die in der ersten Wachstumsphase angehäuften L-Erythrose in der zweiten Wachstumsphase zu Acetat verstoffwechselt wird. Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob eine Abnahme der L-Erythrose Konzentration auch bei Umsatz von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose durch *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145 nachweisbar ist. Der Umsatz von Substraten wie D-Glucose zu 5-Keto-D-Gluconat oder D-Sorbitol zu L-Sorbose durch *resting cells* von

G. oxydans ATCC 621H bzw. *G. suboxydans* IFO 3255 ist in der Literatur bereits belegt (Elfari *et al.*, 2005; Shinjoh *et al.*, 2002).

Zur Herstellung von *resting cells* wurde *G. oxydans* DSM 7145 bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase in 300 ml VM + 50 mM D-Glucose angezogen. Nach zweimaligen Waschen in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 wurden die Zellen aus 150 ml Kultur in 100 ml Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 50 bzw. 200 mM *meso*-Erythritol aufgenommen und für 24 Stunden bei 30°C, 150 rpm inkubiert. Die Optische Dichte wurde in regelmäßigen Abständen gemessen und Proben zur späteren Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrose entnommen (II.6.1.1). Die Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrose erfolgte mittels HPLC Analyse auf einer Carbopac PA-1 Säule und Standardkurven beider Substanzen im Bereich von 31,25 – 500 µM.

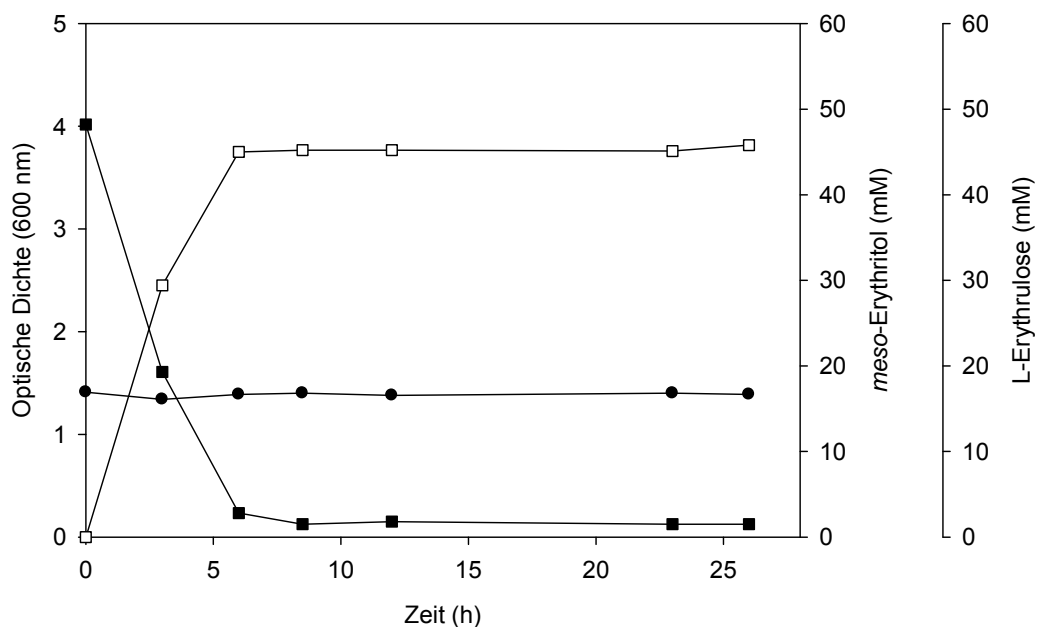


Abbildung 34: Umsatz von 50 mM *meso*-Erythritol durch *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145. Die Zellanzucht erfolgte auf VM + 50 mM D-Glucose bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase. Die Präparation der *resting cells* wurde wie unter II.2.8 beschrieben durchgeführt. (●) Optische Dichte (600 nm); (■) *meso*-Erythritol (mM); (□) L-Erythrose.

Wie Abbildung 34 zu entnehmen ist, war im Verlauf des Experiments eine konstante Optische Dichte ($\lambda = 600$ nm) von 1,4 messbar. Das im Medium enthaltene *meso*-Erythritol hatte eine Konzentration von 48 mM wurde in 6 Stunden mit einer Ausbeute von 94 % zu L-Erythrose oxidiert. Im Gegensatz zu der in Abbildung 32 gezeigten Wachstumskurve von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM mit 50 mM *meso*-Erythritol war jedoch bei dem Umsatz von *meso*-Erythritol durch *resting cells* keine Abnahme des Oxidationsproduktes L-Erythrose in dem untersuchten Zeitraum nachweisbar. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der hier

gezeigten Experimente darauf hin, dass die Abnahme von L-Erythrulose im Zusammenhang mit dem Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf L-Erythrulose steht. Abbildung 35 zeigt, dass mit *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145 auch höhere *meso*-Erythritol Konzentrationen zu L-Erythrulose umgesetzt werden können. So wurden in diesem Experiment 200 mM *meso*-Erythritol in 24h durch *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145 zu 175 mM L-Erythrulose oxidiert.

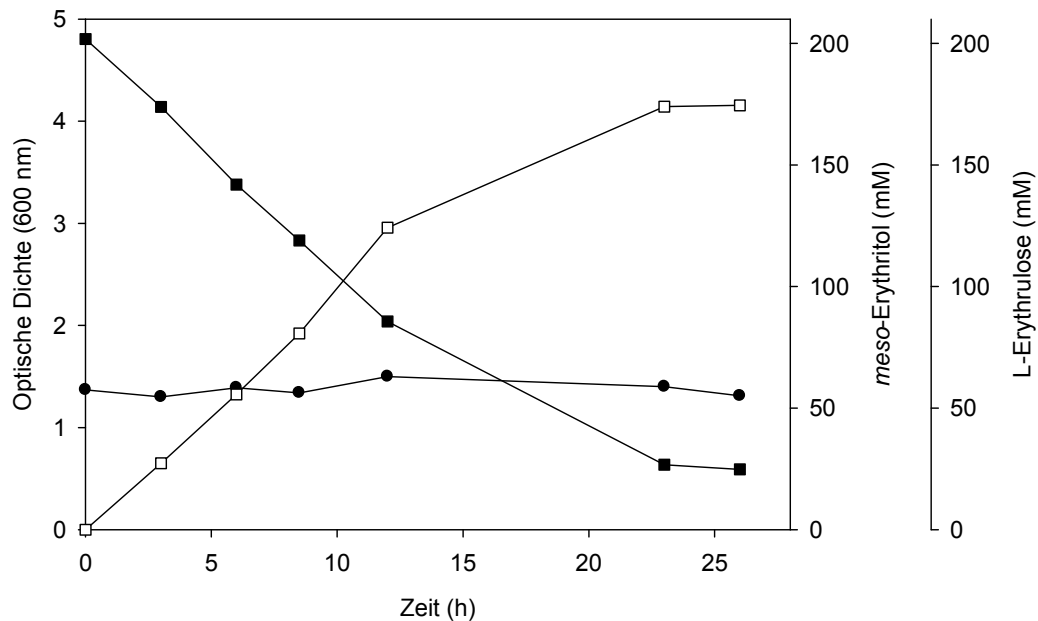


Abbildung 35: Umsatz von 200 mM *meso*-Erythritol durch *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145. Die Zellanzucht erfolgte auf VM + 50 mM D-Glucose bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase. Die Präparation der *resting cells* wurde wie unter II.2.8 beschrieben durchgeführt. (●) Optische Dichte (600 nm); (■) *meso*-Erythritol (mM); (□) L-Erythrulose

3.4 Überexpression der Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*

Die Daten des vorherigen Abschnitts zeigten, dass *G. oxydans* DSM 7145 *meso*-Erythritol nahezu quantitativ zu L-Erythrulose oxidiert. Um die membranständige Oxidation von *meso*-Erythritol zu steigern, wurden in den folgenden Experimenten versucht die Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* über zu exprimieren. Dazu wurden die *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145 in den Vektor pEXGOX(K) (Schleyer *et al.*, 2007) kloniert. Dieses Plasmid enthält zur Überexpression von Genen den Promotor des Elongationsfaktors TU (*tufB* Promotor), ein *mob* Gen, das die Mobilisierung des Plasmids ermöglicht, und schließlich ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion in *G. oxydans*. Der *tufB* Promotor von *G. oxydans* scheint für die Überexpression

besonders geeignet, da die Expression von diesem Promotor nicht von der verwendeten Kohlenstoffquelle und der Wachstumsphase beeinflusst wird (Schleyer *et al.*, 2007).

3.4.1 Konstruktion des Plasmids zur Überexpression der *sldAB* Gene

Zur Konstruktion des Überexpressionsplasmids wurden die *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145 mit der Primerkombination *sldAB_pEXG_for*/M13_rev und dem Plasmid pSC-A::*sldAB* als Matrize amplifiziert. Der dabei verwendete Primer *sldAB_pEXG_for* begann mit dem ATG Triplet des *sldB* Gens, während mit dem Primer M13_rev eine *EcoRI* Schnittstelle des Plasmids pSC-A (II.3.9.1) mitamplifiziert wurde. Das generierte 2,7 kb Fragment wurde mit *EcoRI* hydrolysiert und nach einer Gel Extraktion (II.3.6.2) in den mit *SwaI*, *EcoRI* hydrolysierten Vektor pEXGOX(K) ligiert. Die nach der Transformation in *E. coli* XL-1 blue erhaltenen Kolonien wurden in Flüssigmedium kultiviert und schließlich die Plasmid DNA präpariert. Eine Restriktionsanalyse und eine nachfolgende Sequenzierung bestätigten die korrekte Insertion der *sldAB* Gene in das Plasmid pEXGOX(K). Das Konstrukt wird im folgenden mit pJV17 bezeichnet.

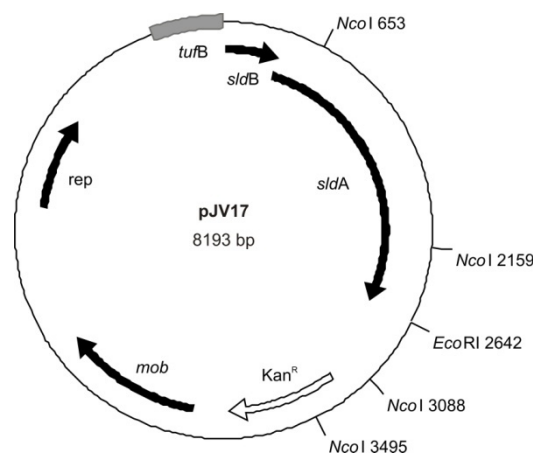


Abbildung 36: Übersicht über das Expressionsplasmid pJV17. Die *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145 stehen unter Kontrolle des *tufB* Promotors von *G. oxydans*. *tufB*: Promotor Elongationsfaktor TU von *G. oxydans*; *rep*: Replikationsursprung; *Kan^R*: Kanamycin Resistenzgen; *mob*: DNA Sequenz zur Mobilisierung des Plasmids.

3.4.2 Konstruktion der Vektorkontrolle pEXGOX(K)'

Da das Plasmid pEXGOX(K)' aus der Konstruktion noch Fragmente der *sldAB* Gene enthielt, wurden diese zunächst mit einem *SwaI*, *EcoRI* Restriktionsverdau herausgeschnitten. Der durch die *EcoRI* Hydrolyse zurückgebliebene 5'-Überhang wurde durch Inkubation des Vektorrückgrats mit der T4-DNA Polymerase (II.3.10.3) geglättet. Eine Re-Ligation (II.3.10.4) ergab schließlich das Kontrollplasmid pEXGOX(K)' mit einer Größe von 5567 bp.

3.4.3 Konjugation von pEXGOX(K)' (pJV17) in *G. oxydans* DSM 7145 & *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh

Die Plasmide pEXGOX(K)' und pJV17 wurden nach der erfolgreichen Konstruktion zunächst zur Mobilisierung in *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) transformiert und anschließend nach der unter II.3.12.5 beschriebenen Methode in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh konjugiert. Die erhaltenen Kanamycin/Cefoxitin resistenten Kolonien wurden wiederholt auf Selektivmedium ausgestrichen und die Plasmide durch eine PCR mit der Primerkombination pEXG_v_for/pEXG_v_rev und eine Plasmidpräparation mit nachfolgendem Restriktionsverdau nachgewiesen.

3.4.4 Auswirkung der Überexpression auf die Oxidation von meso-Erythritol

Das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17) und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh (pJV17) und der Vektorkontrollen wurde auf VM (II.2.1.1.1) mit 50 mM meso-Erythritol verfolgt. Die Zellanzucht erfolgte wie unter II.2.2.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die verwendeten Hauptkulturen ein Volumen von 40 ml hatten. Neben der Optischen Dichte wurden in regelmäßigen Abständen Proben für die spätere Quantifizierung von meso-Erythritol und L-Erythrulose mittels HPLC Analyse entnommen. Die Quantifizierung erfolgte auf einer Carbowac MA-1 Säule und Standardkurven von meso-Erythritol und L-Erythrulose im Bereich von 31,25 – 500 μ M (II.6.1.1).

Die Wachstumsverläufe von *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)'/pJV17) sind in Abbildung 37 A, der Verbrauch von meso-Erythritol und die Akkumulation von L-Erythrulose in Abbildung 37 B dargestellt. Abbildung 37 A zeigt, dass sowohl in der exponentiellen Wachstumsphase als in der erreichten Optischen Dichte nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17) zu erkennen waren. Dies spiegelte sich auch in dem in Abbildung 37 B dargestellten meso-Erythritol Verbrauch wider. Bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)') war ebenso wie bei *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17) zum Zeitpunkt $t = 10,5$ h kein meso-Erythritol im Zellkulturüberstand mehr nachweisbar. Bei beiden Stämmen erreichte die angehäuften L-Erythrulose zum Zeitpunkt ($t = 10,5$ h) ihr Maximum und nahm im weiteren Verlauf des Experiments um ca. 10 mM ab.

Auch bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh (pJV17) auf VM + 50 mM meso-Erythritol waren, wie in Abbildung 38 A gezeigt, keine Unterschiede im Wachstum erkennbar. Auch die Quantifizierung des meso-

Erythritol Verbrauchs ergab, dass die Überexpression der Glycerin- Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ keinen signifikanten Einfluss auf die Oxidation von *meso*-Erythritol hatte (Abbildung 38 B). Wie schon bei *G. oxydans* DSM 7145 konnte nach 10,5 h kein *meso*-Erythritol mehr im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Lediglich der Verbrauch der ausgeschiedenen L-Erythrose in einer zweiten Wachstumsphase konnte wie bei *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17) nachgewiesen werden.

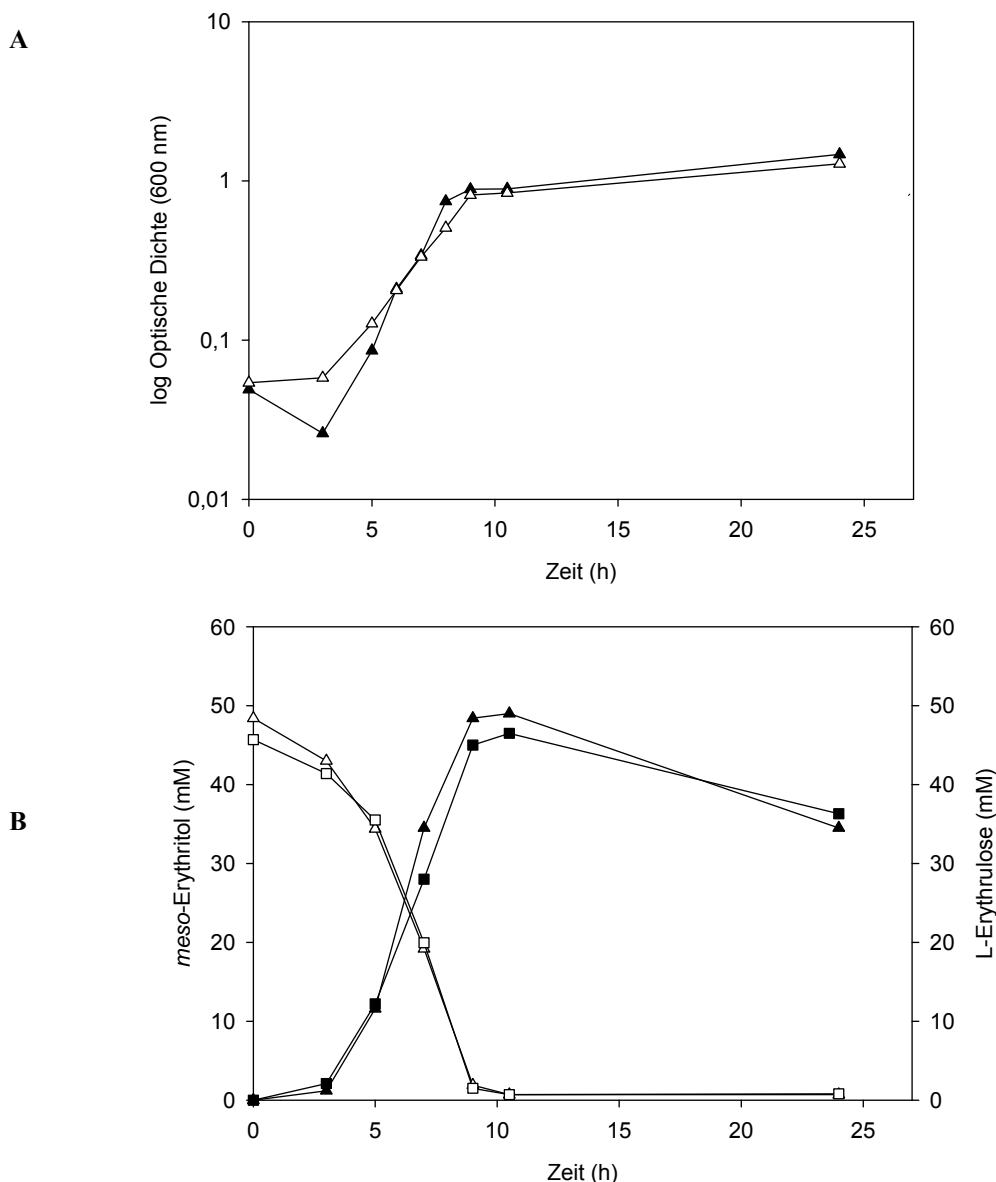


Abbildung 37A: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17) auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol. (▲): *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)'); (△): *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17); **Abbildung 37B: Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrose bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17) bei Anzucht auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol. (△): *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)'), mM *meso*-Erythritol; (▲): *G. oxydans* DSM 7145 (pEXGOX(K)'), mM L-Erythrose; (□): *G. oxydans* DSM7145 (pJV17), *meso*-Erythritol mM; (■): *G. oxydans* DSM 7145 (pJV17), mM L-Erythrose.**

A

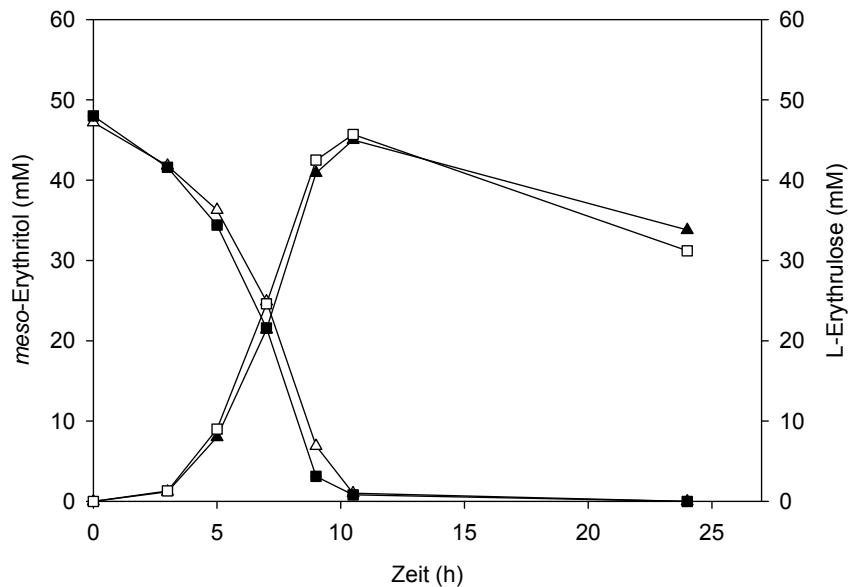
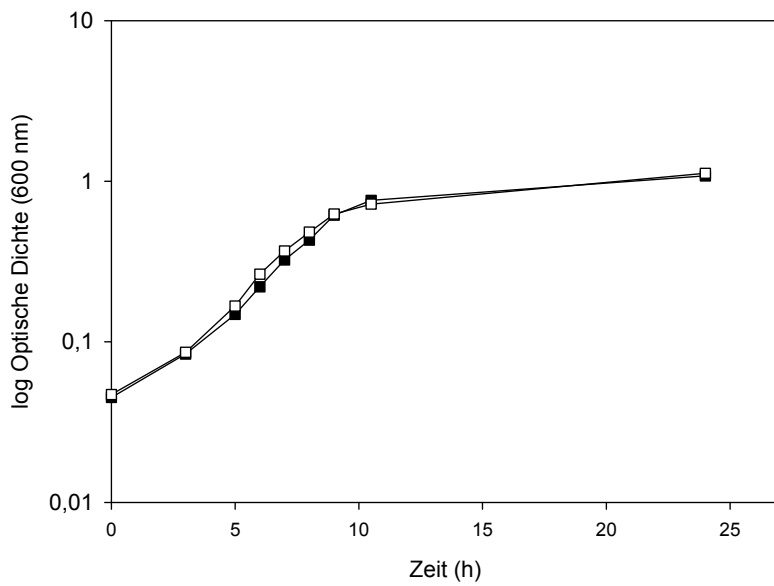


Abbildung 38A: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pJV17) auf VM + 50 mM meso-Erythritol. (■): *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pEXGOX(K)'); (□): *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pJV17); **Abbildung 38B:** Quantifizierung von meso-Erythritol und L-Erythrose bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pEXGOX(K)') und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pJV17) bei Anzucht auf VM + 50 mM meso-Erythritol. (△): *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pEXGOX(K)'), mM meso-Erythritol; (▲): *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pEXGOX(K)'), mM L-Erythrose; (■): *G. oxydans* DSM7145 $\Delta mgdh$ (pJV17), meso-Erythritol mM; (□): *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ (pJV17), mM L-Erythrose

3.5 Chromosomaler Austausch des *mgdh*-Gens gegen die *sldAB*-Gene

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts zeigten, dass die plasmidbasierte Überexpression der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase keinen Einfluss auf die Oxidation von *meso*-Erythritol hatte. In einem weiteren Versuch die Oxidation von *meso*-Erythritol zu steigern, wurde in den folgenden Experimenten auf chromosomaler Ebene das Gen für die membranständige Glucose-Dehydrogenase (*mgdh*) gegen die *sldAB* Gene ausgetauscht.

3.5.1 Konstruktion des Vektors zum Austausch des *mgdh*-Gens gegen die *sldAB*-Gene

Der Vektor zum Austausch der Glucose-Dehydrogenase gegen die Glycerin Dehydrogenase enthielt neben dem *sldAB* Gen zwei Homologieregionen, die die Integration des Vektors in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 ermöglichten. Die Homologieregionen wurden dabei so gewählt, dass das Startcodon des *sldB* Gens nach der Rekombination an der gleichen Stelle lag, wo zuvor der Startcodon der Glucose-Dehydrogenase zu finden war. Somit stehen die *sldAB* Gene nach dem Austausch unter Kontrolle des Promotors der Glucose-Dehydrogenase.

Die Homologieregionen wurden in separaten PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen *mgdh_up_for/up_sldB_rev* und *down_sldA_for/mgdh_down_rev* und genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Die Größen der Homolgieregionen betrug 818 bzw. 828 bp.

Die *sldAB* Gene wurden ebenfalls aus genomischer DNA als Matrize mit der Primerkombination *up_sldB_for/down_sldA_rev* mittels PCR amplifiziert. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 2644 bp. Im nächsten Schritt wurden beide Homologieregionen und die *sldAB* Gene mit der *long flanking homology* PCR (Wach, 1996) miteinander fusioniert (II.3.8.4). Das resultierende PCR-Produkt mit einer Größe von 4219 bp wurde in den Vektor pSC-A kloniert und nachfolgend aus diesem durch eine Restriktionshydrolyse mit *XbaI*, *EcoRI* gewonnen. Die dafür notwendige *XbaI* Schnittstelle wurde zuvor durch die PCR Reaktion eingefügt, während die *EcoRI* Schnittstelle bereits im Vektor vorhanden war. Das 4225 bp große *XbaI-EcoRI* Fragment wurde in den mit *XbaI*, *EcoRI* geöffneten Vektor pK19mobsacB (Schäfer, 1994) ligiert und nachfolgend in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Ein Restriktionsverdau bestätigte die korrekte Insertion der Homologieregionen samt *sldAB* Genen in den Vektor pK19mobsacB. Nachfolgend erfolgte die Transformation des nun mit pJV15 bezeichneten Konstruktes in *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983).

3.5.2 Identifizierung von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh:sldAB*

Die Konjugation des Konstruktes pJV15 in *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* wurde wie unter II.3.12.5 beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Kanamycin resistenten Kolonien wurden nochmals auf Selektivmedium (VM + 50 mM D-Mannitol + 50 μ g/ml Kanamycin + 50 μ g/ml Cefoxitin) ausgestrichen und danach mittels Kolonie-PCR (II.3.8.2) auf die korrekte Integration des Plasmids pJV15 in das Chromosom untersucht. Für die Kolonie-PCR wurden die Primerkombinationen *mgdh_sldAB_v_for*/pk19_Seq_rev und *mgdh_v_rev*/pk19_Seq_for verwendet, wobei die Primer pk19_Seq_for bzw. pk19_Seq_rev im Rückgrat des Plasmids pK19mobsacB, die Primer *mgdh_sldAB_v_for* bzw. *mgdh_v_rev* unmittelbar außerhalb der Homologieregionen banden. Das PCR-Produkt der Primerkombination *mgdh_sldAB_v_for*/pk19_Seq_rev hatte eine Größe von 4519 bp, das Produkt der Kombinationen *mgdh_v_rev*/pk19_Seq_for eine Größe von 4150 bp bei Integration des Plasmids in das Chromosom *G. oxydans* DSM 7145 bzw. 1812 bp bei Integration des Plasmids in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (vgl. Abbildung 40).

Die Kolonie-PCR bestätigte bei zwei von zehn überprüften Klonen die korrekte Insertion des Plasmids pJV15 in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*, indes konnte nur bei einem von zehn überprüften *G. oxydans* DSM 7145 *mgdh*::pJV15 Klone die korrekte Insertion in das Chromosom nachgewiesen werden.

Zwei Klone, die das Plasmid pJV15 korrekt in das Chromosom integriert trugen, wurden nochmals in Flüssigmedium (VM + 50 mM D-Mannitol) angeimpft und für 48 h bei 30°C inkubiert. Zur Identifikation des zweiten Rekombinationsereignisses wurden verschiedene Verdünnungen auf ein saccharosehaltiges VM (II.3.13) plattiert. Die auf diesem Medium erhaltenen Kolonien wurden nochmals auf VM mit/ohne Kanamycin ausgestrichen und die erhaltenen Kan^S/Suc^R Kolonien mit den Primern *mgdh_sldAB_v_for*/*mgdh_v_rev* in einer Kolonie-PCR überprüft. Bei Reversion zum Ausgangszustand wäre in der PCR ein Produkt mit einer Größe von 1914 bp, während nach dem Austausch der Glucose -Dehydrogenase gegen die Glycerin-Dehydrogenase ein Produkt mit einer Größe von 4526 bp zu erwarten war. Bei drei von zehn überprüften Klonen konnte der chromosomale Austausch des *mgdh* Gens gegen die *sldAB* Gene nachgewiesen werden.

Dies wurde auch durch die in Abbildung 39 gezeigte *Southern Blot* Analyse bestätigt. Dazu wurde chromosomale DNA von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*, *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*::pJV15 und *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*::*sldAB* mit *SacI* bzw. *SacII* vollständig hydrolysiert und mit der unter III.2.2.1 beschriebenen *mgdh*-Sonde hybridisiert. Wie aus

Tabelle 8 zu entnehmen ist, waren die folgenden Fragmentgrößen nach der *SacI*, *SacII* Hydrolyse zu erwarten:

Tabelle 8: Erwartete Fragmentgrößen in der Southern Blot Analyse nach Restriktion von genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$, *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::pJV15$ und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ mit *SacI*, *SacII*.

	<i>SacI</i> Hydrolyse	<i>SacII</i> Hydrolyse
<i>G. oxydans</i> DSM 7145	4720	4171
<i>G. oxydans</i> DSM 7145 $\Delta mgdh::pJV15$	7942, 4719	7807, 6284
<i>G. oxydans</i> DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$	7332	6783

Ein Vergleich der Abbildungen 39 und 40 zeigt, dass der Austausch des Gens der membranständigen Glucose-Dehydrogenase gegen die Gene der Glycerin- Dehydrogenase gelungen ist.

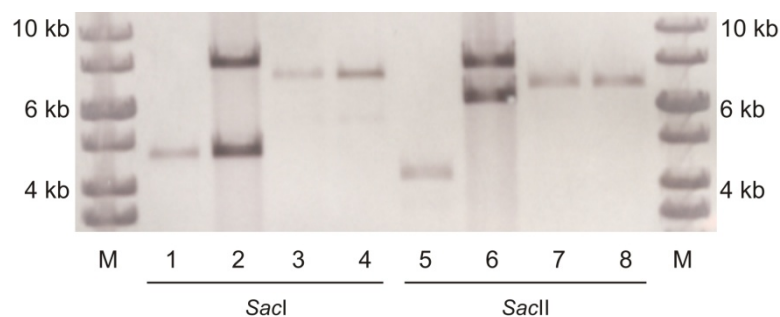


Abbildung 39: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des Austausches der Glucose- Dehydrogenase gegen die Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145. Genomische DNAs von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$, *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::pJV15$ und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ wurden mit *SacI*, *SacII* vollständig hydrolysiert und mit der biotin markierten *mgdh*-Sonde bei 66°C hybridisiert. Spur 1: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$; Spur 2: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::pJV15$; Spur 3: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ Klon 1; Spur 4: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ Klon 2; Spur 5: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$; Spur 6: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::pJV15$; Spur 7: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ Klon 1; Spur 8: *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ Klon 2;

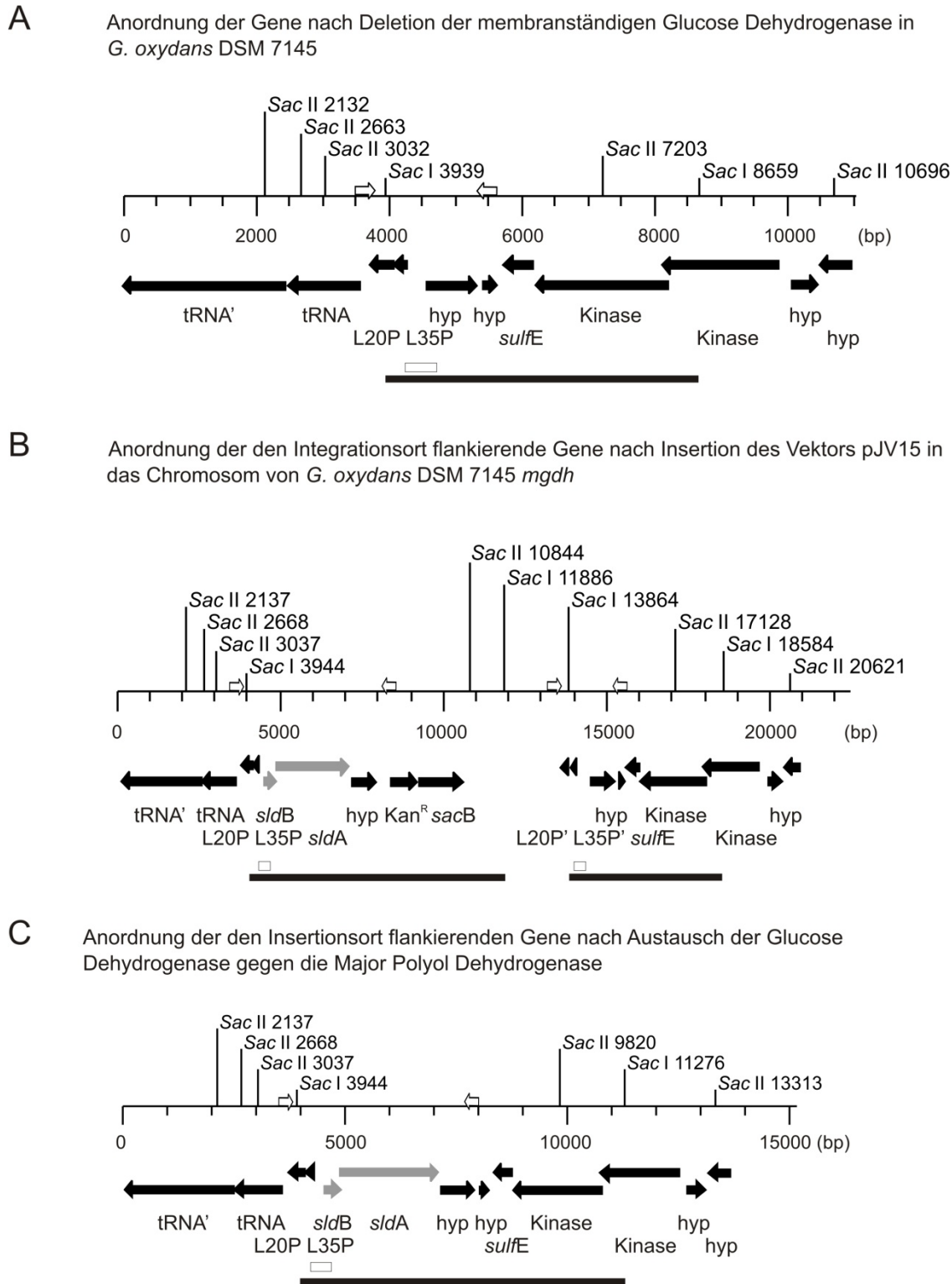


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Anordnung der Gene nach Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase (A), nach Integration des Vektors pJV15 in das Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* (B) und nach Austausch der Glucose-Dehydrogenase durch die Glycerin-Dehydrogenase (C). tRNA', Phenylalanyl tRNA Synthetase β Kette tRNA, Phenylalanyl tRNA Synthetase α Kette; L20P, LSU ribosomales Protein (L20P); L35P, LSU ribosomales Protein (L35P); hyp, hypothetische Proteine; *sulfE*, SulfE vermutlich an der Assemblierung von Fe-S-Clustern beteiligt; Kinase, an der Signaltransduktion beteiligte Proteinkinase; *mgdh*, membranständige Glucose-Dehydrogenase; Kan^R, Kanamycin Resistenzgen; *sacB*, Levansucrase Die in der *Southern Blot* Analyse zu erwartenden Fragmente sind durch schwarze Rechtecke, die Bindungstellen der *mgdh* Sonde sind durch weiße Rechtecke dargestellt. Die Bindungsstellen der in der Kolonie-PCR verwendeten Primer sind durch weiße Pfeile dargestellt. Die den Integrationsort flankierenden Gene wurden anhand der Annotation von *G. oxydans* ATCC 621H bezeichnet.

3.5.3 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *mgdh::sldAB*

Das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ wurde auf VM mit 50 mM der folgenden Kohlenstoffquellen verfolgt: D-Mannitol, D-Glucose, Glycerin, *meso*-Erythritol bzw. mit 25 mM D-Glucose/D-Mannitol verfolgt. Die Wachstumsversuche wurden wie unter II.2.2.1 beschrieben durchgeführt, wobei die Hauptkulturen ein Volumen von 20 ml hatten. Die in der logarithmischen Wachstumsphase ermittelten maximalen Wachstumsraten sind in Tabelle 9 dargestellt:

Tabelle 9: Übersicht über die in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelten Wachstumsraten (h^{-1}) von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$. Die Zellanzucht erfolgte auf VM + 50 mM der angegebenen Kohlenstoffquelle bzw. auf VM + je 25 mM D-Glucose und D-Mannitol.

	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 μ (h^{-1})	<i>G. oxydans</i> DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ μ (h^{-1})
D-Glucose	0,69 (+/- 0,05)	0,29 (+/- 0,01)
D-Glucose/D-Mannitol	0,48 (+/- 0,07)	0,39 (+/- 0,03)
D-Mannitol	0,48 (+/- 0,04)	0,46 (+/- 0,08)
<i>meso</i> -Erythritol	0,44 (+/- 0,02)	0,42 (+/- 0,03)
Glycerin	0,47 (+/- 0,02)	0,41 (+/- 0,04)

Die oben gezeigten maximalen Wachstumsraten verdeutlichen zunächst, dass das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ auf D-Glucose deutlich verlangsamt war und die maximale Wachstumsrate von von $0,29 h^{-1}$ in etwa mit der für *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ ermittelten Wachstumsrate ($0,38 h^{-1}$) übereinstimmte (vgl. III.2.3). Auch die von beiden Mutanten nach 48 Stunden erreichten Optischen Dichten korrelierten sehr gut (*G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ 2,8 vs. *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ 2,8).

In der logarithmischen Wachstumsphase war das Wachstum auf den untersuchten Polyolen durch den Austausch nicht wesentlich beeinflusst. Auch bei den durch die Kulturen erreichten Optischen Dichten ließen sich keine Unterschiede erkennen. Einzig bei Anzucht auf *meso*-Erythritol war ein Unterschied im Wachstumsverlauf sichtbar. Verglichen mit dem Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 trat *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ deutlich früher in die stationäre Wachstumsphase ein, erreichte jedoch nach 48 Stunden wieder ein dem Wildtyp vergleichbare Optische Dichte. Ein Vergleich der Wachstumsverläufe ist in Abbildung 41 dargestellt.

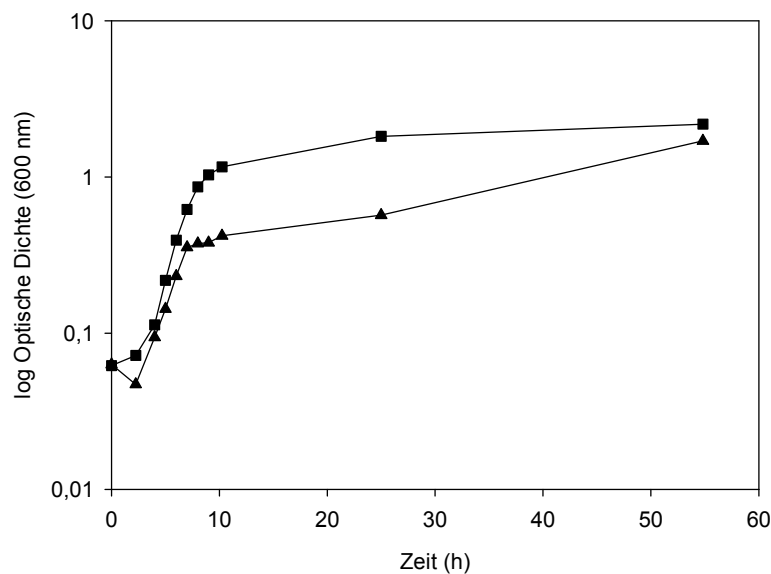


Abbildung 41: Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 (■) und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ (▲) auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol.

3.5.4 Oxidation von *meso*-Erythritol durch *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$

Zur Quantifizierung des *meso*-Erythritol Verbrauchs und der Anhäufung von L-Erythrulose wurde *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ in 40 ml VM + 50 mM *meso*-Erythritol angezogen. In regelmäßigen Abständen wurden Proben des Zellkulturüberstandes entnommen und nach Verdünnung das in den Proben enthaltene *meso*-Erythritol und die L-Erythrulose auf einer Carbopac MA-1 Säule (II.6.1.1) und Standardkurven von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose quantifiziert. Abbildung 42 gibt die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes wieder. Aus dieser geht hervor, dass die zu Beginn des Experimentes im Medium enthaltenen 53 mM *meso*-Erythritol im Verlauf von 8 Stunden von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ zu 49 mM L-Erythrulose oxidiert wurden, was mit einem Wachstum von einer Anfangs Optische Dichte von 0,063 auf eine Optische Dichte von 0,38 einherging. Nach Verbrauch des *meso*-Erythritols war ein deutlich langsames Wachstum zu beobachten. So erreichte *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ nach 25 h eine Optische Dichte von 0,57. Dieses weitere Wachstum war mit einem L-Erythrulose Verbrauch von 20 mM relativ zum Zeitpunkt $t = 8$ h verbunden. Ein Vergleich der Abbildungen 32 und 42 verdeutlicht, dass *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ eine deutlich geringere Optische Dichte als der Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 (0,86) erreicht, die geringe Zellmasse jedoch eine vergleichbare *meso*-Erythritol Konzentration oxidiert. Dies könnte ein Hinweis auf eine Überproduktion der Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ sein. Die folgenden

Experimente sollten zeigen, ob eine höhere *meso*-Erythritol Oxidation auch auf biochemische Ebene in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ nachweisbar ist.

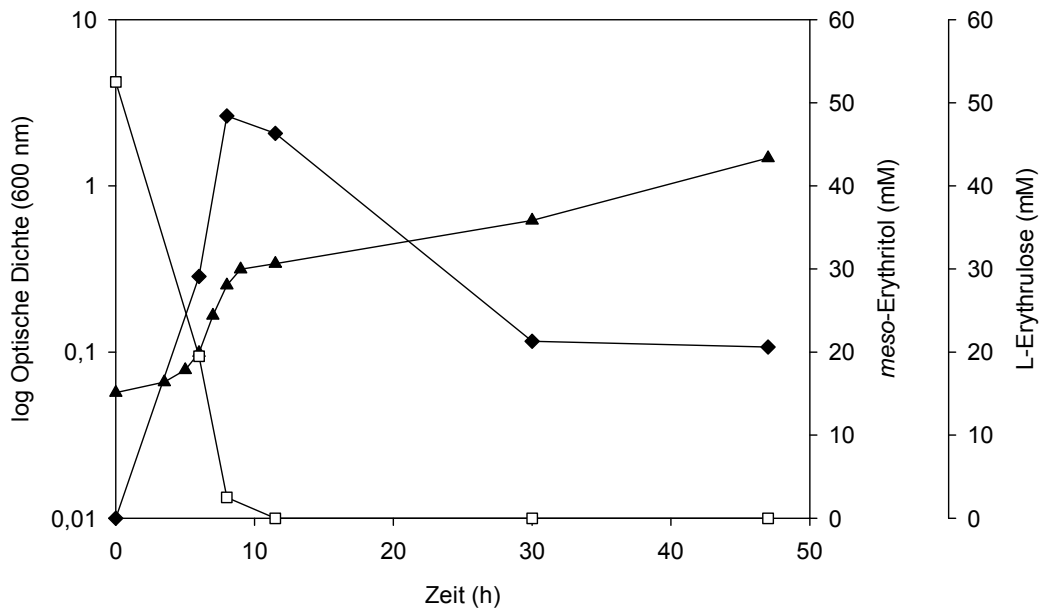


Abbildung 42: Quantifizierung von *meso*-Erythritol, L-Erythrulose bei Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol. ▲: Optische Dichte *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$; □: *meso*-Erythritol (mM); ◆: L-Erythrulose (mM)

3.5.5 Biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$

Zur biochemischen Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ wurden *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Präparation der Membranfraktion erfolgte wie unter II.5.2 beschrieben und es wurde wiederum der PMS-DCPIP Enzymtest zur Messung der membrangebundenen Dehydrogenaseaktivität verwendet (II.5.3.1). Die gewonnenen biochemischen Daten sind in Abbildung 43 dargestellt. Da zwischen den unabhängigen biologischen Experimenten starke Schwankungen in der absoluten spezifischen Aktivität zu beobachten waren, wurden die gezeigten Aktivitäten relativ zu der von der Alkohol Dehydrogenase vermittelten Ethanol Oxidation angegeben.

Es zeigte sich, dass, wie zu erwarten, die membrangebundene Glucose Oxidation in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ deutlich vermindert war. Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Steigerung der von der Glycerin-Dehydrogenase vermittelten Aktivitäten nachgewiesen werden. Diese waren in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$, mit Ausnahme der D-Gluconat Oxidation, um den Faktor 1,2 vermindert.

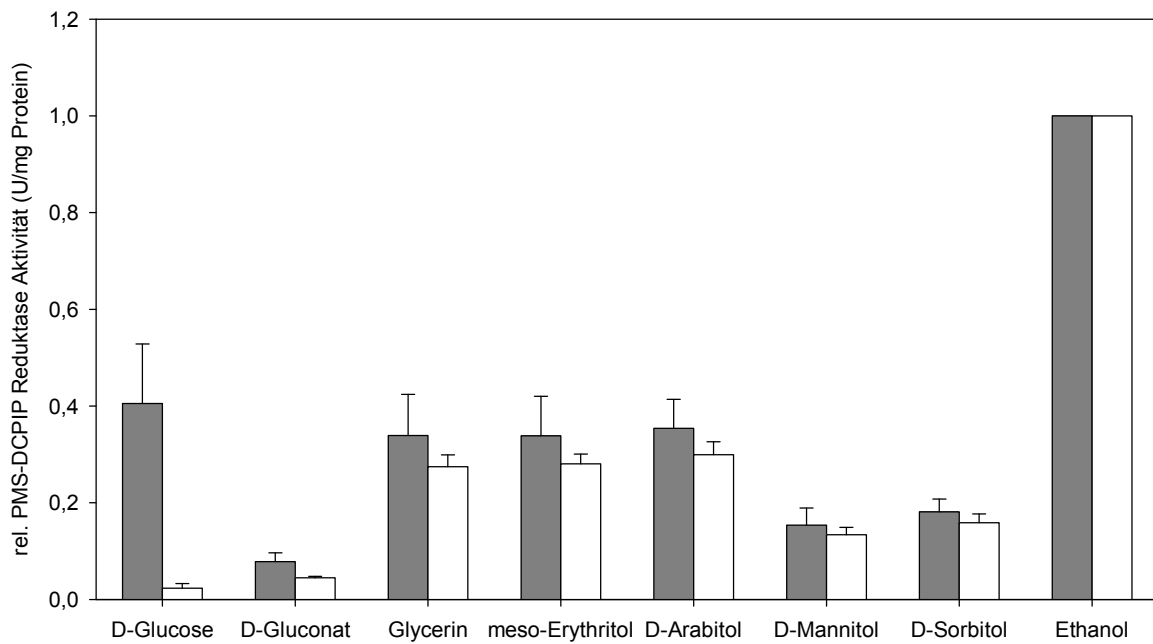


Abbildung 43: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* DSM 7145 (graue Balken) und *G. oxydans* DSM 7145 Δ mgdh::sldAB (weiße Balken) bei Anzucht auf VM + 50 mM meso-Erythritol. Die gezeigten Aktivitäten sind relativ zur spezifischen Aktivität gegenüber Ethanol angegeben. Sämtliche Aktivitäten wurden mit dem PMS-DCPIP Enzymtest in Gegenwart von 25 mM Substrat in MacIlvaine Puffer (pH 5,0) bei 25°C gemessen. Die angegebenen Aktivitäten wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt.

4 Diskussion

Das Essigsäurebakterium *G. oxydans* oxidiert verschiedenste Zucker, Alkohole und Polyole unvollständig zu den entsprechenden Aldehyden, Ketonen und organischen Säuren (Matsushita *et al.*, 1994). Ein Großteil der Oxidationsreaktionen wird von membranständigen Dehydrogenasen vermittelt, deren aktives Zentrum in das Periplasma ragt. Somit müssen die Substrate nicht in die Zelle transportiert und die Oxidationsprodukte können direkt in das umgebende Medium ausgeschieden werden. Dies und die regio- und stereospezifische Oxidation der Substrate machen *G. oxydans* zu einem Organismus von besonderem Interesse für die Biotechnologie.

So wird *G. oxydans* beispielsweise für die Produktion von L-Sorbose, einem wichtigen Zwischenprodukt der Vitamin C Synthese (Reichstein & Grussner, 1934), oder von Dihydroxyaceton, das Anwendung in Selbstbräunern findet, eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation des *meso*-Erythritol oxidierenden Enzyms in *G. oxydans* DSM 7145. Darüber hinaus wurden verschiedene Untersuchungen zur Steigerung der membrangebundenen Oxidation von *meso*-Erythritol Oxidation zu L-Erythrulose durchgeführt. L - Erythrulose ist ähnlich wie Dihydroxyaceton in Selbstbräunern zu finden und das L -Erythrulose-Derivat Dideoxyerythrose weist eine gewisse Aktivität gegen den HIV Virus auf (Tschamber *et al.*, 1996).

4.1 Eigenschaften der Glycerin-Dehydrogenase von *G. oxydans* DSM 7145

Gluconobacter Arten verfügen über eine membranständige Quinoprotein-Glycerin-Dehydrogenase, die ein breites Substratspektrum aufweist. Diese aus den *sldAB* Proteinen bestehende Dehydrogenase wurde zuvor auch als D-Arabitol (Adachi *et al.*, 2001) und D-Sorbitol-Dehydrogenase (Sugisawa & Hoshino, 2002) bezeichnet und auch bei der PQQ-abhängigen Dehydrogenase aus *G. frateurii* CHM 43 (Moonmangmee *et al.*, 2002) handelt es sich vermutlich um die Glycerin- Dehydrogenase.

Matsushita *et al.* (2003) zeigten durch Immunkreuzreaktionen, dass es sich bei der D-Arabitol-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO3257 und der D-Sorbitol- Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO3255 um ein und dasselbe Enzym handelt und führten für dieses Protein die Bezeichnung Glycerin- oder Major-Polyol-Dehydrogenase ein. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch in *G. oxydans* DSM 7145 Homologe zu den *sldAB* Genen vorliegen. Nach der Identifikation von möglichen Homologen sollte eine Inaktivierung der

Glycerin-Dehydrogenase Aufschluss über das Substratspektrum des Enzyms in *G. oxydans* DSM 7145 geben.

Mit Oligonukleotiden, die anhand der Sequenz von *G. oxydans* ATCC 621H abgeleitet worden waren, konnten Homologe der *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145 nachgewiesen werden. Dabei waren die Größen der *sldAB* Gene von *G. oxydans* ATCC 621H und *G. oxydans* DSM 7145 identisch. So hatte das *sldB* Gen sowohl in *G. oxydans* ATCC 621H als auch in *G. oxydans* DSM 7145 eine Größe von 381 bp und auch bei der Größe des *sldA* Gens konnten keine Unterschiede festgestellt werden (2232 bp).

4.1.1 Sequenzvergleiche der SldAB Proteine

Das in Abbildung 3 gezeigte Aminosäurealignment der SldB Proteine von *G. oxydans* ATCC 621H und *G. oxydans* DSM 7145 verdeutlicht, dass diese auf Ebene der Aminosäuresequenz absolut identisch sind. Das berechnete Molekulargewicht von ca. 14 kDa stimmt weiterhin sehr gut mit dem aus *G. suboxydans* IFO 3257 aufgereinigten SldB Protein überein (Adachi *et al.*, 2001).

Die biologische Funktion des SldB Proteins ist biochemisch noch nicht eindeutig belegt, jedoch ist das SldB Protein für die von dem SldA Protein vermittelte Dehydrogenase Aktivität essentiell (Shinjoh *et al.*, 2002). Die mittels des TMHMM Servers vorhergesagten Transmembranhelices und die Sequenzähnlichkeit des Proteins zu den N-terminalen Regionen weiterer PQQ-abhängiger Dehydrogenasen (s. Abbildung 3 und Tabelle 4), die der Verankerung von Proteinen in der Membran und der Weitergabe von Redoxäquivalenten dienen (Yamada *et al.*, 1993), legen die Vermutung nahe, dass es sich bei dem SldB Protein um den Membrananker des SldA Proteins handelt. Dafür spricht weiterhin, dass im SldA Protein keine Transmembranhelices vorhergesagt werden konnten (s. Abbildung 4). Dieser Hypothese widersprechen jedoch die experimentellen Daten von Shinjoh *et al.* (2002), die das SldA Protein in der Membranfraktion von *G. suboxydans* IFO3255 *sldB::Gm-ptac* immunologisch nachweisen konnten. Aus einer weiteren ca. 2 kDa größeren Bande, die in etwa der Größe des nicht prozessierten SldA Proteins entsprach, schlossen die Autoren, dass das SldB Protein möglicherweise nicht der Verankerung, sondern der Prozessierung des SldA Proteins dient. Dabei scheint das SldB Protein bei der Prozessierung eine chaperon-artige Funktion zu innezuhaben (Shinjoh *et al.*, 2002). Da die hypothetische nicht-prozessierte Bande des SldA Proteins durch eine MS-Analyse jedoch nicht weiter untersucht wurde und auch *in vitro* nicht gezeigt werden konnte, dass das SldB Protein eine chaperonartige Funktion hat, bleibt die Funktion dieses Protein weiterhin unklar.

Das in Abbildung 4 gezeigte Aminosäurealignment der SldA Proteine von *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 7145 verdeutlicht, dass auch diese Proteine einander auf Ebene der Aminosäuresequenz sehr ähnlich waren. Es konnten lediglich zwei Aminosäureaustausche an den Positionen 178 (Ile → Leu) und 624 (Lys → Glu) nachgewiesen werden. Auch das berechnete Molekulargewicht des SldA Proteins (80 kDa) korrelierte sehr gut mit der Masse des SldA Proteins aus *G. suboxydans* IFO 3257 (Adachi *et al.*, 2001).

Anhand der Röntgenstrukturanalyse der Quinoprotein-Methanol-Dehydrogenase aus *M. extorquens* (Ghosh *et al.*, 1995) und der Quinoprotein-Glucose-Dehydrogenase von *E. coli* (Cozier & Anthony, 1995) konnten zwei besonders konservierte Aminosäurereste im SldA Protein identifiziert werden. Dabei handelt es sich zum einen um das Asp-404, das dem Asp-303 der Quinoprotein-Methanol-Dehydrogenase entspricht (s. Abbildung 4). Dieser Aspartatrest ist in allen bisher untersuchten PQQ-abhängigen Dehydrogenasen konserviert und vermutlich an der Initiierung der Oxidationsreaktion durch Abstraktion eines Protons beteiligt (Cozier *et al.*, 1995). Des Weiteren liegt das Trp-340 des SldA Proteins in der gleichen Region wie das Trp-243 der Quinoprotein-Methanol-Dehydrogenase. In dieser wird das PQQ-Molekül durch den Indolring des Trp-243 und zwei Cysteinreste eines Disulfidrings in der korrekten Position gehalten. Demnach spielt auch das Trp-340 des SldA Proteins eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Cofaktors. Der zweite an der Bindung des PQQ-Moleküls beteiligte Aminosäurerest, wie die Cysteinreste 103/104 der Methanol-Dehydrogenase oder das His-262 der *E. coli* Quinoprotein-Glucose-Dehydrogenase (Cozier & Anthony, 1995) konnten im SldA Protein nicht identifiziert werden.

Darüber hinaus wurden im SldA Protein acht Regionen mit Ähnlichkeiten zu *Tryptophan docking* Motiven gefunden. Dabei handelt es sich um eine konservierte Sequenz von 11 Aminosäureresten, die die acht β -Faltblätter der PQQ-abhängigen Dehydrogenase zusammenhält. Das SldA Protein könnte demnach ähnlich wie die Methanol-Dehydrogenase aus *M. extorquens* (Ghosh *et al.*, 1995) oder die Alkohol-Dehydrogenase von *A. aceti* (Cozier *et al.*, 1995) einen *propeller fold*, die gemeinsame Struktur aller PQQ-abhängigen Dehydrogenasen bilden.

4.1.2 Genetische Organisation der *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145

Die Sequenzierung der *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145 zeigte, dass der letzte Buchstabe des *sldB* Stoppcodons (TGA) zugleich der erste Buchstabe des Startcodons (ATG) des *sldA* Gens ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die *sldAB* Gene wie auch in *G. oxydans* ATCC 621H in einem Operon organisiert sind. Eine Bestimmung des

Transkriptionsstartpunktes mittels 5-RLM-RACE identifizierte das 24 bp stromaufwärts vom Startcodon des *sldB* Gens gelegene Thymin als Transkriptionsstartpunkt der *sldAB* Gene (s. Abbildung 5). Eine zuvor durchgeführte Promotor Vorhersage mit dem Neural Network *promotor prediction tool* bestätigte, das lediglich vor dem *sldB* nicht jedoch vor *sldA* Gen eine Promotorregion vorhanden ist. Zudem bestätigte eine RT-PCR mit Primern, die das gesamte *sldB* Gen und das 5'-Ende des *sldA* Gens überspannten, dass die *sldAB* Gene von *G. oxydans* DSM 7145 kotranskribiert werden (s. Abbildung 6).

4.1.3 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta

Nachdem die *sldAB* Gene in *G. oxydans* DSM 7145 nachgewiesen werden konnten, sollte eine Inaktivierung des *sldA* Gens Aufschluss über das Substratspektrum der Glycerin-Dehydrogenase geben. Das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta deutete darauf hin, dass die Glycerin-Dehydrogenase eine Schlüsselrolle bei der Oxidation von Glycerin, *meso*-Erythritol und D-Mannitol nicht jedoch bei der Oxidation von D-Glucose spielt. Zwar wurde bei Anzucht auf VM + Glucose ein langsames Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta in der exponentiellen Wachstumsphase und eine geringere Optische Dichte nach 24 h ermittelt (*G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta: 0,7 vs. *G. oxydans* DSM 7145: 1,1). Dies ist jedoch vermutlich auf das im Medium enthaltene Gentamycin zurückzuführen.

Kein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta war bei Anzucht auf VM + D-Mannitol bzw. VM + *meso*-Erythritol zu beobachten (s. Tabelle 5). Das fehlende Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta auf VM + 50 mM D-Mannitol widerspricht den Angaben von Shinjoh *et al.* (2002) für *G. suboxydans* IFO 3255 *sldA*::Km, die bei Anzucht auf einem Vollmedium mit 2,5 % D-Mannitol ein Wachstum nachwiesen. Im Gegensatz dazu kultivierten Matsushita *et al.* (2003) *G. suboxydans* IFO 3257 *sldA*::Km auf einem Vollmedium, das neben Hefeextrakt und Trypton auch 10 g/L Glycerin und 0,5 g/L D-Arabitol enthielt und beobachteten ein verglichen mit dem Wildtyp *G. suboxydans* IFO 3257 um den Faktor drei verlangsamtes Wachstum. In dieser Arbeit konnte ebenfalls ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA*::Genta auf VM + Glycerin beobachtet werden. Zwar war die Verdopplungszeit verglichen mit dem Wildtyp um den Faktor drei vermindert, nach 24 h wurde jedoch eine dem Wildtyp entsprechende Optische Dichte von 1,1 erreicht. Diese Beobachtung erscheint interessant, da Hölscher und Görisch (2006) nach Inaktivierung der PQQ-Synthesegene in *G. oxydans* ATCC 621H kein Wachstum der Mutante auf einem Vollmedium mit Glycerin nachweisen konnten.

Da die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* ergab, dass die membranständige Glycerin Oxidation bei Anzucht auf VM + D-Glucose um den Faktor 10 vermindert war (vgl. IV.1.4), stellte sich die Frage welcher Stoffwechselweg das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf VM + Glycerin ermöglicht. Neben der Induktion einer weiteren membranständigen Dehydrogenase, deren Aktivität unter den hier untersuchten Bedingungen nicht messbar war, wäre eine cytoplasmatische Verstoffwechslung von Glycerin denkbar. Der dafür notwendige Stoffwechselweg ist in *G. oxydans* ATCC 621H bereits biochemisch charakterisiert (Claret *et al.*, 1994). Demnach gelangt Glycerin zunächst durch erleichterte Diffusion in die Zelle und wird durch eine Glycerin Kinase (GOX2090) zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert. Der Phosphorylierung folgt eine Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat, die von der Glycerin 3-Phosphat-Dehydrogenase (GOX2088) vermittelt wird. Das gebildete Dihydroxyacetonphosphat wird nachfolgend zu Glycerinaldehyd 3-Phosphat isomerisiert und weiter zu Pyruvat umgewandelt. Da bei der cytoplasmatischen Verstoffwechslung von Glycerin bis zum Pyruvat durch Substratkettenphosphorylierung netto nur ein ATP und zwei Moleküle $\text{NADH} + \text{H}^+$ gewonnen werden, ließe sich hiermit das langsame Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* erklären.

4.1.4 Biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta*

Die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* zeigte, dass das Substratspektrum der Glycerin-Dehydrogenase die C3-C6 Polyole Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol, D-Sorbitol und D-Gluconat umfasst (s. Abbildungen 10 & 11). Dies korreliert sehr gut mit den beschriebenen Substratspektren der Glycerin-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO 3257 (Matsushita *et al.*, 2003), dem als D-Sorbitol-Dehydrogenase bezeichneten Enzym aus *G. suboxydans* IFO 3255 (Sugisawa & Hoshino, 2002) und der PQQ-abhängigen Dehydrogenase aus *G. frateurii* CHM 43 (Moonmangmee *et al.*, 2002).

Die aus *G. suboxydans* IFO 3257 aufgereinigte D-Arabitol-Dehydrogenase (Glycerin-Dehydrogenase) (Sugisawa & Hoshino, 2002) zeigte bei pH 5,0 die höchste spezifische Aktivität gegenüber D-Arabitol, gefolgt von *meso*-Erythritol, Glycerin, D-Sorbitol, D-Mannitol und D-Gluconat. Die in dieser Arbeit anhand von nicht weiter aufgereinigter Membranfraktion ermittelten spezifischen Aktivitäten lassen eine ähnliche Substratspezifität der Glycerin-Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 7145 erkennen (s. Abbildungen 10 & 11). So war sowohl bei Anzucht auf VM + D-Glucose als auch bei Anzucht auf D-Glucose/D-Mannitol die höchste spezifische Aktivität gegenüber D-Arabitol nachweisbar. Auch die

Abnahme der spezifischen Aktivitäten von *meso*-Erythritol über D-Mannitol zu D-Gluconat war wie bei der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase (D-Arabitol Dehydrogenase) aus *G. suboxydans* IFO 3257 erkennbar (Sugisawa & Hoshino, 2002).

Nach Deletion der membranständigen Glycerin-Dehydrogenase war die D-Gluconat Oxidation im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Substraten lediglich um den Faktor 2 vermindert (s. Abbildungen 10 & 11). Dies liefert einen Hinweis darauf, dass D-Gluconat in *G. oxydans* DSM 7145 wie auch *G. oxydans* ATCC 621H oder *G. dioxyaceticus* IFO 3271 nicht nur von der Glycerin-Dehydrogenase zu 5-Keto-D-Gluconat, sondern auch von der Gluconat-Dehydrogenase zu 2-Keto-D-Gluconat oxidiert werden kann. Bei der Gluconat-Dehydrogenase handelt es sich im Gegensatz zu der PQQ-abhängigen Glycerin-Dehydrogenase, um ein Flavoprotein. In *G. dioxyaceticus* besteht dieses aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 62, 45 und 21 kDa. Die Dehydrogenase Aktivität und die prosthetische Gruppe FAD sind in der großen Untereinheit lokalisiert, während die mittlere Untereinheit ein Häm *c* enthält und vermutlich an der Weiterleitung von Elektronen vom FAD an die Atmungskette beteiligt ist. Der kleinen Untereinheit konnte bis dato noch keine biochemische Funktion zugewiesen werden (Toyama *et al.*, 2007). Das Enzym weist weiterhin eine strikte Substratspezifität auf und vermittelt lediglich die Oxidation von D-Gluconat zu 2-Keto-D-Gluconat. (Shinagawa *et al.*, 1982b).

Des weiteren zeigte die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta*, dass die membranständige D-Sorbitol Oxidation ebenfalls ausschließlich von der Glycerin-Dehydrogenase vermittelt wird (s. Abbildungen 10 & 11). Dies ist bemerkenswert, da in der Literatur zwei weitere membranständige Enzyme, die D-Sorbitol oxidieren, beschrieben worden sind. Dabei handelt es sich zum einen um die aus drei Untereinheiten bestehende Flavoprotein D-Sorbitol-Dehydrogenase, die aus *G. suboxydans* IFO 3254 aufgereinigt wurde (Shinagawa *et al.*, 1982a). Nach Deletion der Glycerin-Dehydrogenase in *G. frateurii* THD32 war in der Membranfraktion von auf D-Sorbitol angezogenen Zellen noch eine dem Wildtyp vergleichbare Oxidation von D-Sorbitol nachweisbar, die von dieser FAD-abhängigen D-Sorbitol-Dehydrogenase vermittelt wurde (Soemphol *et al.*, 2008). Interessanterweise ist die FAD-abhängige D-Sorbitol-Dehydrogenase in *G. oxydans* ATCC 621H, wie möglicherweise auch in dem hier untersuchten *G. oxydans* DSM 7145 nicht funktionell, da die Genomsequenz eine *frameshift* Mutation im für die große Untereinheit kodierenden Gen *gox2095* aufzeigte. Die zweite D-Sorbitol-Dehydrogenase wurde aus *G. oxydans* ATCC 621 aufgereinigt und besteht ebenfalls aus drei Untereinheiten. Dieses

Protein ist jedoch ein Quinoprotein, das zusätzlich noch ein Cytochrom *c* in der mittleren Untereinheit enthält (Choi *et al.*, 1995).

Die membranständige Glucose-Oxidation war durch die Deletion der Glycerin-Dehydrogenase nicht negativ beeinflusst. So konnte beispielsweise bei Anzucht auf VM + D-Glucose im Wildtyp eine spezifische Aktivität gegenüber D-Glucose von 3,43 U/mg Protein, in der Mutante *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* eine spezifische Aktivität gegenüber D-Glucose von 4,43 U/mg Protein nachgewiesen werden (s. Abbildung 14). Es ist demnach anzunehmen, dass *G. oxydans* DSM 7145 über ein weiteres membranständiges Enzym verfügt, das die Glucose-Oxidation vermittelt. Auch die aufgereinigte D-Arabitol-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO 3257 und die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO 3255 zeigten keine spezifische Aktivität gegenüber D-Glucose und nach Deletion der Glycerin-Dehydrogenase in *G. suboxydans* IFO 3257 war die Oxidation von D-Glucose in der Membranfraktion nachweisbar (Matsushita *et al.*, 2003).

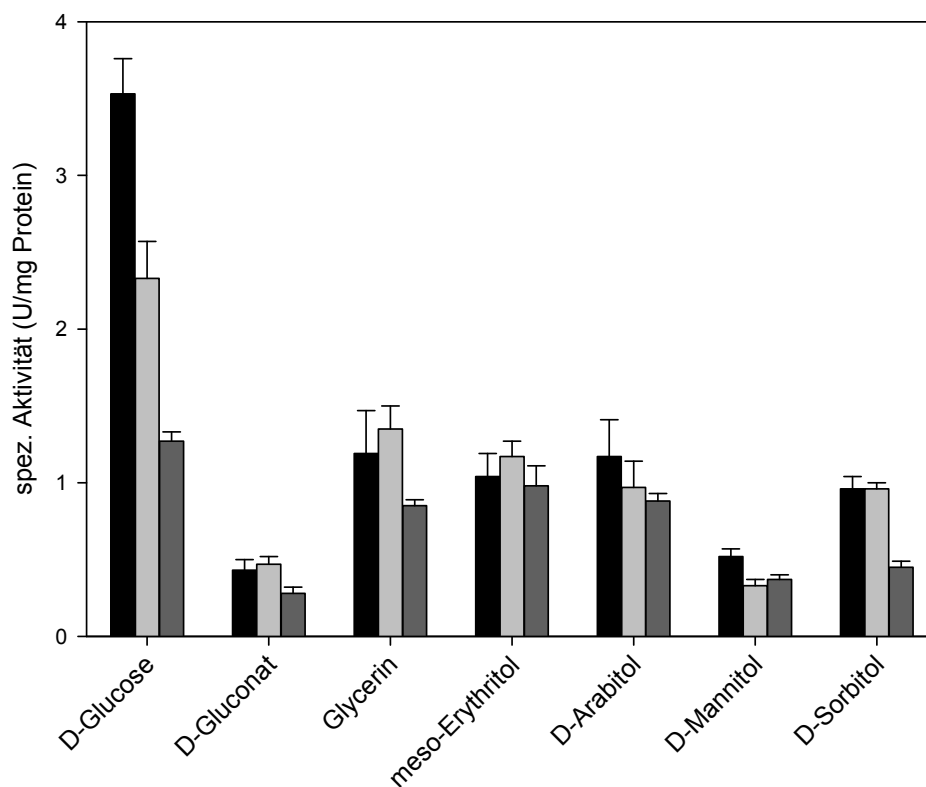


Abbildung 44: Spezifische Aktivitäten der von der Glycerin- und Glucose-Dehydrogenase vermittelten membranständigen Oxidation in *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Schwarze Balken: Anzucht auf VM + 50 mM D-Glucose; hellgraue Balken: Anzucht auf 25 mM D-Glucose/25 mM D-Mannitol; dunkelgraue Balken: Anzucht auf VM + 50 mM D-Mannitol.

Die Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen verdeutlichte, wie nochmals in Abbildung 44 gezeigt, dass

die Glycerin-Dehydrogenase anscheinend unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle konstitutiv exprimiert wird. Bereits DeLey & Stouthamer (1959) und DeLey & Dochy (1960) schlossen aus der Untersuchung der Glucose-Oxidation an *Acetobacter* sp., dass die beteiligten membranständigen Dehydrogenasen konstitutiv exprimiert werden. Die hier vorgelegten Daten bestätigen nicht nur die Beobachtungen der eben genannten Autoren, sondern auch die anhand von Transkriptionsanalysen an *G. oxydans* ATCC 621H gewonnene Erkenntnis, dass die meisten membranständigen Dehydrogenasen unabhängig von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle konstitutiv exprimiert werden (Hoffmeister, 2006). Auf dem Gesamtgenom Microarray von *G. oxydans* ATCC 621H ist von den *sldAB* Genen der Glycerin-Dehydrogenase lediglich das *sldB* repräsentiert. Ein Transkriptionsvergleich von auf D-Glucose mit auf D-Mannitol angezogenen Zellen ergab ein *ratio of means* von 0,63, was bei einem angenommenen Signifikanzkriterium von einer dreifachen Transkriptionsänderung für eine gleich starke Expression der Glycerin-Dehydrogenase unter beiden untersuchten Bedingungen spricht.

4.2 Aktivitätsunterschiede der membranständigen Glucose-Dehydrogenase

Die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* zeigte Unterschiede in der membranständigen Glucose-Oxidation auf (s. Abbildung 14). So war in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* eine höhere Glucose-Dehydrogenase Aktivität als im Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 messbar. Dabei schien das zur Anzucht verwendete Substrat die Aktivität zu beeinflussen, da der Anstieg bei Anzucht auf D-Glucose/D-Mannitol (Faktor 2,2) deutlicher als bei Anzucht auf D-Glucose war (Faktor 1,2).

Im Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 war mit abnehmender Glucose-Konzentration im Medium auch ein Absinken der Glucose-Oxidation zu beobachten. Diese war bei Anzucht auf D-Glucose mit einer spezifischen Aktivität von 3,5 U/mg Protein am höchsten und nahm über 2,5 U/mg Protein bei Anzucht auf D-Glucose/D-Mannitol auf 1,2 U/mg Protein bei Anzucht auf D-Mannitol ab (vgl. Abb. 45).

Diese biochemischen Daten widersprechen zunächst den Transkriptionsanalysen von Hoffmeister (2006) und Hädicke (2006), die mittels *real time* PCR eine konstitutive Expression der Glucose-Dehydrogenase in verschiedenen *Gluconobacter* Arten nachweisen konnten. Zugleich warfen die Daten die Frage auf, ob in *G. oxydans* möglicherweise eine transkriptionsunabhängige Regulation erfolgt. Untermauert wird diese Überlegung dadurch, dass in der Literatur Veränderungen der spezifischen Aktivität gegenüber bestimmten

Substraten nach Deletion membranständiger Dehydrogenasen vielfach belegt sind. Soemphol *et al.* (2008) beobachteten in *G. frateurii* CHM 43 *sldA::Km* bei Anzucht auf 1 % D-Sorbitol eine etwa um den Faktor 1,4 erhöhte Glucose-Oxidation, eine Steigerung, die nach Deletion der großen Untereinheit der Flavoprotein-Dehydrogenase (*sldL*) noch etwas höher ausfiel (Faktor 1,7). Auch Gupta *et al.* (1997) wiesen nach Inaktivierung der membranständigen Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* ATCC 9937, eine 2-3 fache Erhöhung der Oxidation von D-Gluconat und 2-Keto-D-Gluconat nach.

Schließlich berichteten Hölscher und Görisch (2006), dass nach Inaktivierung der PQQ-Synthesegene in *G. oxydans* ATCC 621H in der Membranfraktion der Mutante eine dem Wildtyp vergleichbare D-Gluconat Oxidation nachweisbar war. Sie erklärten dies damit, dass die von der PQQ-abhängigen Glycerin-Dehydrogenase katalysierte Gluconat-Oxidation einen weitaus geringeren Anteil an der Gesamtoxidation von Gluconat als die Flavoprotein Gluconat-Dehydrogenase hat und der Wegfall der Glycerin-Dehydrogenase somit nicht so stark ins Gewicht fällt. Eine Tatsache, die sich an der spezifischen Aktivität der Glycerin-Dehydrogenase gegenüber D-Arabitol (34,8 U/mg Protein) und D-Gluconat (6,1 U/mg Protein) ablesen lässt (Adachi *et al.*, 2001).

Ähnlich wie Gupta *et al.* (1997) führen jedoch auch Hölscher und Görisch (2006) die leicht erhöhte Gluconat-Oxidation auf eine Aktivierung bzw. Hochregulation der Gluconat-Dehydrogenase zurück. Gupta *et al.* (1997) gehen gar von einem polaren Effekt der Mutation aus, der zur Erhöhung der Gluconat-Oxidation nach Inaktivierung der Glucose-Dehydrogenase führt. Ein solcher polarer Effekt von Mutationen auf die Expression von Genen distal zu der Insertionsstelle ist zwar beschrieben, Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die betroffenen Gene in einem Operon organisiert sind (Kleckner *et al.*, 1977). Die vorliegenden genomischen Daten von *G. oxydans* ATCC 621H und auch von *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA-1 verdeutlichen, dass weder die Glucose- (*gox0265*) und die Glycerin-Dehydrogenase (*gox0854*) noch die Glucose- und die Gluconat-Dehydrogenase (*gox1230-1232*) in einem Operon organisiert sind und damit ein polarer Effekt als Grund für die erhöhten Glucose-Dehydrogenase Aktivitäten unwahrscheinlich ist.

Eine Hochregulation der Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* konnte in dieser Arbeit mittels relativer quantitativer *real time* RT PCR nicht nachgewiesen werden. Zwar war in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* eine deutlich verminderte Transkription des *sldA* Gens zu erkennen ($1,5 \cdot 10^6$ fach bei Anzucht auf D - Glucose), die für das *mgdh* Gen erhaltenen Daten zeigten jedoch eine nicht veränderte Transkription auf. Gleiches gilt für die Expression der Glucose- Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 bei

Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, wo ebenfalls Werte erhalten wurden, die für eine konstitutive Transkription des *mgdh* Gens sprechen (s. Abbildungen 15 & 16).

Somit stellt sich die Frage, ob der auf der Oxidation von DCPIP beruhende Enzymtest eine Erklärung für die veränderten Aktivitäten liefern könnte. Bei diesem nicht eindeutig geklärt ist, wo die Elektronen von der Dehydrogenase auf den Redoxmediator PMS übergehen. Denkbar wäre, dass es durch die Deletion zu einer Veränderung in der Membran kommt, die die Weitergabe der Elektronen an den Redoxmediator beeinflusst.

Der PMS-DCPIP Enzymtest wurde auch in den Arbeiten von Gupta *et al.* (1997) und Hölscher und Görisch (2006) verwendet, da Soemphol *et al.* (2008) jedoch einen auf Kaliumferricyanid basierenden Enzymtest verwendeten und dennoch eine erhöhte Glucose-Oxidation in den Mutanten nachwies, ist dies ein Indiz dafür, dass den mit zwei verschiedenen Enzymtests beobachteten Aktivitätsunterschieden ein generelles Phänomen zugrunde liegt und der Wegfall einer membranständigen Dehydrogenase mit der Aktivitätssteigerung einer anderen Dehydrogenase einhergeht. Auf physiologischer Ebene ist dies möglicherweise damit zu erklären, dass die verschiedenen Dehydrogenasen um die Weitergabe von Elektronen an die Atmungskette konkurrieren. (Levering *et al.*, 1988). Sobald eine Dehydrogenase in der Membran wegfällt, kann ein anderes Enzym mehr Elektronen an die Atmungskette weitergeben, was zu einer erhöhten Aktivität führt. Um diese Hypothese, dass der Wegfall einer Dehydrogenase generell mit einer gesteigerten Aktivität anderer Dehydrogenasen einhergeht, weiter zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die membranständige Glucose-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 deletiert.

4.3 Eigenschaften der membranständigen Glucose-Dehydrogenase

Die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* zeigte, dass auch in diesem Stamm eine membranständige Glucose-Dehydrogenase vorliegt. Mit Oligonukleotiden, die anhand der Sequenz von *G. oxydans* ATCC 621H abgeleitet wurden, konnte das *mgdh* Gen von *G. oxydans* DSM 7145 amplifiziert werden. Da die Nukleotidsequenz noch nicht vorlag, wurde das Strukturgen zunächst vollständig sequenziert und die genetische Organisation untersucht.

4.3.1 Sequenz der membranständigen Glucose-Dehydrogenase

Auf Ebene der Aminosäuresequenz war eine 99 % ige Identität der Mgdh Proteine aus *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H zu erkennen (s. Abbildung 17). Ein Datenbankabgleich zeigte darüber hinaus eine 54 % ige Identität zu der Quinoprotein-

Glucose-Dehydrogenase aus *E. coli*, deren Kristallstruktur vorliegt (Cozier & Anthony, 1995) und deren Sequenz aus diesem Grund in das in Abbildung 17 gezeigte Alignment mit aufgenommen wurde. Für die Quinoprotein-Glucose-Dehydrogenase aus *E. coli* konnten in der N-terminalen Region fünf membranspannende Segmente identifiziert werden, die offenbar auch im Mgdh Protein konserviert sind und der Verankerung der Proteine in der Cytoplasmamembran dienen. (Yamada *et al.*, 1993).

Neben den Transmembranhelices scheinen auch eine Reihe funktionell wichtiger Aminosäuren im Mgdh Protein konserviert zu sein. So ist in der Aminosäuresequenz an Position 470 ein Aspartatrest konserviert, der dem Asp-466 der *E. coli* Glucose-Dehydrogenase entspricht und von dem angenommen wird, dass es dabei um die katalytische Aminosäure handelt, die die Oxidation des Substrates durch Abstraktion eines Protons initiiert (Cozier & Anthony, 1995). Die Röntgenkristallstruktur der *E. coli* Quinoprotein-Glucose-Dehydrogenase zeigte weiterhin, dass ein Tryptophan- und ein Histidinrest an der horizontalen Positionierung des PQQ-Moleküls beteiligt sind. Auch diese Aminosäurereste, namentlich das His-264 und Trp-404, sind im Mgdh Protein konserviert. Das His-262 der Quinoprotein-Glucose-Dehydrogenase von *E. coli*, das dem His-264 des Mgdh Proteins entspricht, ist auch für die hohe Affinität dieses Enzyms gegenüber D-Glucose verantwortlich (Cozier & Anthony, 1995). Schließlich sind auch die an der Komplexierung des Ca^{2+} Ions im aktiven Zentrum beteiligten Aminosäurereste Asp-354, Asn-355 und Thr-424 im Mgdh Protein von *G. oxydans* DSM 7145 nachweisbar.

4.3.2 Genetische Organisation des *mgdh* Gens in *G. oxydans* DSM 7145

Eine *Northern Blot* Analyse mit einer Sonde, die die ersten 549 Basen vom 5'-Ende des *mgdh* Gens umfasste, ergab ein Signal mit einer Größe von ca. 2,3 kb (Abbildung 18). Die Sequenzierung des *mgdh* Gens hatte zuvor gezeigt, dass dieses eine Größe von 2427 bp hat. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die für das *mgdh* Gen kodierende mRNA lediglich ein Gen enthält. Dafür spricht auch, dass durch eine *in silico* Analyse das 75 bp stromaufwärts von Startcodon gelegene Thymin als Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden konnte.

4.3.3 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*

Die Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum auf den untersuchten Polyolen, was darauf hindeutet, dass die

Deletion die Expression der distal zum Integrationsort liegenden Gene nicht beeinflusste und damit kein polarer Effekt der Deletion erkennbar ist (s. Tabelle 7).

Wie Abbildung 21 zu entnehmen, war ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + Glucose nachweisbar. In der exponentiellen Wachstumsphase war die Verdopplungszeit zwar verglichen mit dem Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 um die Hälfte vermindert, die Mutante erreichte jedoch nach 24 h eine dreifach höhere Optische Dichte als der Wildtyp. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass nach Inaktivierung der PQQ-Synthesegene in *G. oxydans* ATCC 621H kein Wachstum der Mutante auf VM + D-Glucose nachweisbar war (Hölscher & Görisch, 2006).

4.3.4 Substratspektrum der membranständigen Glucose-Dehydrogenase

Auf biochemischer Ebene war eine deutliche Reduktion der Glucose-Dehydrogenase Aktivität in der Membranfraktion nachweisbar. Diese war bei Anzucht auf D-Mannitol geringer (Faktor 8), als bei einer Anzucht auf einem D-Glucose/D-Mannitol Gemisch (Faktor 33). Die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ zeigte demnach, dass die Glucose-Dehydrogenase lediglich die Oxidation von D-Glucose katalysiert. Auch Ameyama *et al.* (1981) zeigten durch Reinigung der Glucose- Dehydrogenase aus *G. suboxydans*, dass diese lediglich D-Glucose oxidiert.

Die Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase hatte weiterhin keinen signifikanten Einfluss auf die von der Glycerin-Dehydrogenase katalysierten Aktivitäten. Wie Abbildung 22 zu entnehmen ist, waren die spezifischen Aktivitäten gegenüber Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol und D-Sorbitol bei Anzucht auf VM + D-Mannitol durchschnittlich um den Faktor 1,5 erhöht. Eine Anzucht auf VM + D-Glucose/D-Mannitol konnte jedoch die Aktivitätssteigerungen für die oben genannten Substrate nicht durchgängig bestätigen. So war lediglich die Oxidation von Glycerin, *meso*-Erythritol und D-Mannitol bei *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ erhöht. Während die D-Arabitol Oxidation bei Wildtyp und Mutante nicht verändert war, war die D-Sorbitol Oxidation in der Mutante niedriger als bei dem Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145. Interessanterweise war die D-Gluconat Oxidation bei *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ sowohl bei Anzucht auf VM + D-Mannitol als auch bei Anzucht auf VM + D-Glucose/D-Mannitol niedriger als im Wildtyp. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Gupta *et al.* (1997) und Hölscher & Görisch (2006), die nach Inaktivierung der Glucose-Dehydrogenase höhere oder mit dem Wildtyp vergleichbare Oxidationen von D-Gluconat ermittelten.

Eine Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + *meso*-Erythritol und die nachfolgende Quantifizierung des *meso*-Erythritol Verbrauchs und der Akkumulation von L-Erythrose bestätigte, dass keine Unterscheide zwischen Wildtyp und Mutante bestehen. Somit zeigte sich, dass die *in vitro* gemessene leicht erhöhte *meso*-Erythritol Oxidation *in vivo* nicht nachweisbar war. Die Hypothese, dass die Deletion einer membranständigen Dehydrogenase mit der Steigerung der Aktivität anderer Dehydrogenasen einhergeht, muss damit zunächst verworfen werden. Des weiteren sollte der verwendete, auf der Reduktion von DCPIP beruhende Enzymtest, zukünftig nur noch für qualitative Analysen eingesetzt werden, da die beobachteten quantitativen Aktivitätsveränderungen weder auf transkriptioneller Ebene noch *in vivo* bestätigt werden konnten.

4.4 Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + Glucose

Die Wachstumsversuche mit *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ zeigten, dass die Mutante weiterhin auf einem Vollmedium mit D-Glucose wuchs und eine höhere Optische Dichte als der Wildtyp erreichte. Die biochemische Charakterisierung von auf VM + 50 mM D-Glucose angezogenen Zellen bestätigte, dass unter den untersuchten Bedingungen keine membranständige Glucose-Oxidation in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ nachweisbar war (Abbildung 27). Somit erfolgt die Verstoffwechslung von D-Glucose, wie auch von Krajewski (2008) für *G. oxydans* N44-1 $\Delta mgdh$ *sgdh::Kan* gezeigt, vermutlich cytoplasmatisch.

Vorraussetzung für eine intrazelluläre Glucose Verstoffwechslung ist zunächst die Aufnahme von D-Glucose in die Zelle. Im Genom von *G. oxydans* ATCC 621H konnten jedoch keine spezifischen Aufnahmesysteme für Glucose identifiziert werden. Zwar wurden Homologe zu den universellen Komponenten des Phosphotransferase- Systems (HPr, EI, EII^A) nicht jedoch für die Komponente EII^B und das membranständige zuckerspezifische Enzym IIC^C gefunden (Prust, 2005). Diese Beobachtung, wurde auch durch die kürzlich veröffentlichte Genomsequenz von *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1-1 bestätigt (Lucas *et al.*, 2008). Vermutlich erfolgt die Glucose-Aufnahme in *G. oxydans* ATCC 621H ähnlich wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Azotobacter vinelandii* (Romano *et al.*, 1970) durch einen Symporter. So konnten im Genom von *G. oxydans* ATCC 621H drei Gene (*gox0649*, *gox0925* und *gox1047*) identifiziert werden, die für einen Glucose/Protonen Symporter kodieren könnten (Prust, 2005).

Nach Eintritt in die Zelle muss D-Glucose zu weiteren Verstoffwechslung phosphoryliert werden, wozu eine Glucokinase (GOX2419) im Genom von *G. oxydans* ATCC 621H

vorliegt. Die Sequenzierung von *G. oxydans* ATCC 621H und frühere biochemische Messungen hatten gezeigt, dass die Glykolyse in *Gluconobacter* sp. nicht funktionell ist (Attwood *et al.*, 1991), jedoch der Entner-Doudoroff (Kerstens & De Ley, 1968) und Pentosephosphat-Weg (Sievers & Swings, 2005) vollständig vorliegen. Diese stellen demnach vermutlich den nächsten Schritt des cytoplasmatischen Glucose-Abbaus dar. Aus diesem Grund wurden in der cytoplasmatischen Fraktion von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ die Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat- und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase gemessen. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert die erste Reaktion sowohl des Entner-Doudoroff- als auch des Pentosephosphat-Weges, nämlich die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat. 6-Phosphogluconat wird vom zweiten Enzym des Pentosephosphat-Weges der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu Ribulose-5-Phosphat und CO₂ decarboxyliert.

Im Gegensatz zu der von der Tonouchi *et al.* (2003) postulierten doppelten Cofaktor Spezifität der Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, wurde in den vorgelegten biochemischen Untersuchungen die NADP⁺-abhängige Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität und die NAD⁺-abhängige 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität gemessen. Biochemische Untersuchungen an aufgereinigter Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase hatten gezeigt, dass NADP⁺ der physiologische Elektronenakzeptor der Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase bzw. NAD⁺ der physiologische Elektronenakzeptor der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ist (Adachi *et al.*, 1979; Deppenmeier, unveröffentlicht).

Die in Abbildung 27 gezeigten Aktivitätsmessungen deuteten auf eine Aktivierung des cytoplasmatischen Stoffwechsels hin, da die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Aktivitäten in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ um den Faktor 3,5 bzw. 4,5 erhöht waren. Keine signifikanten Unterschiede waren in der Aktivität der cytoplasmatischen Glucose-Dehydrogenase erkennbar. Diese betrug bei *G. oxydans* DSM 7145 0,21 und bei *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ 0,13 U/mg Protein. Die direkte cytoplasmatische Glucose-Oxidation stellt neben dem Pentosephosphat- und dem Entner-Doudoroff-Weg die dritte mögliche Route des cytoplasmatischen Glucose-Abbaus dar. Dieser scheint jedoch bei dem Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die in diesen Untersuchungen gewonnenen biochemischen Daten ermöglichten keine Aussage darüber, ob D-Glucose hauptsächlich über den Entner-Doudoroff- oder den Pentosephosphat-Weg metabolisiert wird. Allerdings folgerte Krajewski (2008) aus der

erhöhten CO₂ Produktion von *G. oxydans* N44-1 Δ *mgdh sgdh::Kan* bei Anzucht auf VM + 50 g/L D-Glucose, dass D-Glucose hauptsächlich über den Pentosephosphat-Weg metabolisiert wird. Das dabei gebildete Glycerinaldehyd-3-Phosphat kann in fünf weiteren Reaktionsschritten über Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt werden, wobei die Reaktionen denen entsprechen, die im unteren Teil der Glykolyse ablaufen. Um Aufschluss über die weitere Verstoffwechslung des Pyruvats zu gewinnen, wurden die im Kulturüberstand von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* enthaltenen Metaboliten analysiert. Eine HPLC Analyse wies auf die Akkumulation von Acetat im Kulturüberstand hin, was durch eine GC MS-Analyse bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte im Wildtyp keine Anhäufung von Acetat nachgewiesen werden und es ist zu vermuten, dass dieser ähnlich wie der nah verwandte Stamm *G. oxydans* DSM 3503 D-Gluconat und 2- bzw. 5-D-Keto-Gluconat ausscheidet (Elfari *et al.* 2005).

Diese Vermutung wird durch die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* unterstützt, die zeigte, dass *G. oxydans* DSM 7145 über die Enzyme zur Produktion von D-Gluconat und 2- bzw. 5-Keto-D-Gluconat verfügt. Anhand der Genomsequenz von *G. oxydans* ATCC 621H lässt sich ein möglicher Weg zur Produktion von Acetat aus Pyruvat ableiten: dabei würde Pyruvat zunächst durch eine Pyruvat Decarboxylase (GOX1081) zu Acetaldehyd und CO₂ decarboxyliert. Das gebildete Acetaldehyd würde demnach durch eine Acetaldehyd- Dehydrogenase weiter zu Acetat oxidiert. Schweiger *et al.* (2007) identifizierten eine NADP⁺-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase (GOX1122), die Acetaldehyd sehr spezifisch (K_m-Wert = 0,073 μ M) zu Acetat oxidierte.

Es gelang nicht mehr Bildung von Acetat aus Pyruvat in *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* biochemisch zu untersuchen, jedoch zeigte wiederum Krajewski (2008) in *G. oxydans* N44-1 Δ *mgdh sgdh::Kan*, dass die Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase verglichen mit dem Wildtyp um den Faktor 3,4 erhöht war. Deshalb ist anzunehmen, dass Pyruvat zunächst zu CO₂ und Acetaldehyd decarboxyliert und letzteres weiter zu Acetat oxidiert wird.

Die Produktion von Acetat ist jedoch möglicherweise nur ein Nebenprodukt des Stoffwechsels von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf VM + D-Glucose, da bei einem D-Glucose-Verbrauch von 25 mM nur 15 mM Essigsäure im Kulturüberstand nachweisbar war (Abbildung 30). Zudem zeigte die von Krajewski (2008) an *G. oxydans* N44-1 Δ *mgdh sgdh::Kan* durchgeführte Kohlenstoffbilanzierung, dass ein Großteil des D-Glucose Kohlenstoffs im CO₂ zu finden war. Möglicherweise handelt es sich bei der Acetatproduktion um eine Art *overflow* Metabolismus bei dem Acetat aus Glycerinaldehyd 3-Phosphat entsteht,

wenn dieses nicht schnell genug in den zyklisch ablaufenden Pentosephosphat-Weg eingeschleust werden kann (Krajewski, 2008). Diese Situation gliche dem *overflow* Metabolismus von *E. coli*, bei dem es zu einer Acetatproduktion kommt, wenn die Substrataufnahme in die Zelle größer als der Umsatz von Substraten zu Biomasse und CO₂ ist (Krelman & Strohl, 1994; Holms 1986).

Im Zusammenhang mit der cytoplasmatischen Verstoffwechslung von D-Glucose scheinen zwei Punkte für zukünftige Untersuchungen besonders interessant: Zum einen sind an dem cytoplasmatischen Glucose-Stoffwechsel eine Reihe NADP⁺-abhängiger Enzyme, wie die Glucose-6-Phosphat- und die Acetaldehyd-Dehydrogenase, beteiligt, so dass der Cofaktor in erheblichen Maße regeneriert werden muss. Es wichtige Rolle könnte dabei die in *G. oxydans* ATCC 621H identifizierte NAD(P)⁺-abhängige, membrangebundene Transhydrogenase spielen, von der Prust (2004) bereits vermutete, dass diese nicht der Bereitstellung von NADPH + H⁺ unter Verwendung des Membranpotentials (Jackson, 2003), sondern der Regeneration des NADP⁺ unter Aufbau eines Membranpotentials dient. In diesem Fall müsste eine Doppelmutante, in der sowohl die membranständige Glucose-Dehydrogenase als auch die Transhydrogenase deletiert ist, nur noch schwach oder gar nicht mehr auf D-Glucose wachsen. Zum anderen wäre es auch interessant zu untersuchen, ob *G. oxydans* DSM 7145 über ein System zur Anpassung an die erhöhte cytoplasmatische Acetatkonzentration verfügt, da diese ein Absinken des intrazellulären pH-Werts und damit vermutlich auch eine Verringerung des Membranpotentials zur Folge. Bei einer extrazellulären Acetat Konzentration von 10g/L werden in *G. suboxydans* acht spezifische Acetat Stressproteine (Asps) induziert (Lasko *et al.*, 1997). Auch in *A. aceti* konnten 19 Proteine identifiziert werden, die spezifisch durch Acetatstress induziert wurden. Die diesen Proteinen anhand von Datenbankabgleichen zugewiesenen Funktionen deuten an, dass membrangebundene Transportprozesse eine wichtige Rolle bei der Acetatresistenz spielen (Steiner & Sauer, 2001). Interessanterweise konnte bei Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ auf VM + D-Glucose ein Absinken des pH-Werts im Kulturüberstand nachgewiesen werden, was möglicherweise darauf hindeutet, dass das im Cytoplasma gebildete Acetat aus der Zelle transportiert wird.

Die eben diskutierten Wege des Stoffwechsels von D-Glucose in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ sind in Abbildung 45 nochmals zusammengefasst.

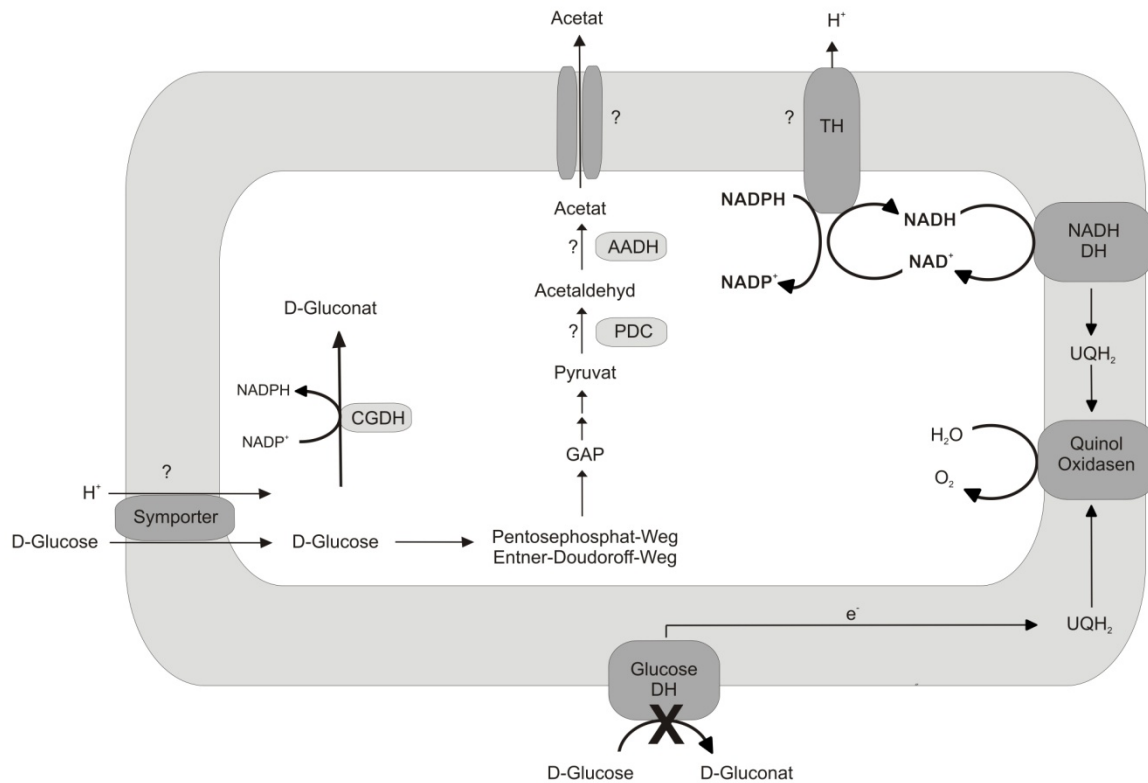


Abbildung 45: Schema des möglichen Stoffwechsels von D-Glucose in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$; AADH: Acetaldehyd-Dehydrogenase; CGDH: cytoplasmatische Glucose-Dehydrogenase; e⁻: Elektron; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PDC: Pyruvat Decarboxylase; TH: Transhydrogenase; UQH₂: Ubichinon

4.5 Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$

Die Mutanten *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* und *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ wurden in den vorgelegten Untersuchungen komplementiert, indem die Strukturgene samt der putativen Promotorregion in das Plasmid pBBR-1 MCS2 (Kovach *et al.*, 1995) kloniert wurden.

So konnte mit dem Plasmid pJV8 das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf VM + D-Mannitol, *meso*-Erythritol und Glycerin wiederhergestellt werden. Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen, zeigten sich jedoch in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat Unterschiede in der maximalen Wachstumsrate und der erreichten Optischen Dichte nach 49 h. *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* pJV8 wuchs auf VM + D-Mannitol mit einer der Vektorkontrolle vergleichbaren Wachstumsrate, erreichte nach 49 h jedoch die Hälfte der Optischen Dichte von *G. oxydans* DSM 7145 pBBR-1 MCS2. Hingegen wuchs die mit dem Plasmid pJV8 komplementierte Mutante auf VM + Glycerin bzw. *meso*-Erythritol schneller als die Vektorkontrolle und erreichte eine Optische Dichte, die zu 80 % mit der Kontrolle übereinstimmte. Auch bei der Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ mit dem

Plasmid pJV12 zeigte sich, das *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ pJV12 nicht die Wachstumsrate des Wildtyps *G. oxydans* DSM 7145 erreichte, jedoch schneller als die Vektorkontrolle *G. oxydans* DSM 7145 pBBR-1 MCS2 wuchs (Abbildung 25). Im Idealfall war zu erwarten, dass der Stamm mit dem Kontrollplasmid und die komplementierte Mutante eine vergleichbare Wachstumsrate und Optische Dichte erreichen. Verglichen mit dem Wildtyp ist jedoch ein verlangsamtes Wachstum zu erwarten, da die Replikation der Plasmide zelluläre Ressourcen bindet (Cranenburgh *et al.*, 2001). Da die Vektorkontrolle auf verschiedenen Kohlenstoffquellen langsamer als die komplementierten Mutanten wuchs, verlangsamt möglicherweise die Expression des *lacZ* Gens oder das LacZ α -Peptid selbst das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 pBBR-1 MCS2.

Auf biochemischer Ebene konnte durch Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* mit dem Plasmid pJV8 wieder eine deutliche Oxidation von C3- bis C6- Polyolen in der Membranfraktion nachgewiesen werden, die Aktivitätswerte entsprachen jedoch nicht denen der Vektorkontrolle pBBR-1 MCS2. Gegenüber Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol und D-Sorbitol wurden Aktivitätswerte erreicht, die zu 80 % mit der Vektorkontrolle korrelierten (Abbildung 13). Die höhere Korrelation gegenüber D-Gluconat ist vermutlich, damit zu erklären, dass D-Gluconat wie bereits in Abschnitt IV.1.4 diskutiert auch von der D-Gluconat-Dehydrogenase oxidiert wird. Der Vektorkontrolle vergleichbare Aktivitätswerte konnten auch nicht erreicht werden, indem ein Komplementationsplasmid in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* eingebracht wurde, das die *sldAB* Gene und nicht nur den Promotor des *sldB* Gens und das *sldA* Strukturgen enthielt. Dies steht im Gegensatz zu den Angaben von Soemphol *et al.* (2008), die *G. frateurii* CHM 43 *sldA::Km* mit dem Plasmid pBBRTNB komplementierten, das die *sldAB* Gene trug, und dadurch mit Wildtyp vergleichbare Wachstumsraten und höhere spezifische Aktivitäten gegenüber D-Sorbitol und D-Arabitol als im Wildtyp erreichten.

Allerdings wurde bei der Komplementation von *G. oxydans* ATCC 621H DW-1 mit dem Plasmid pTB9058 auch nur eine *myo*-Inositol-Dehydrogenase Aktivität erreicht, die derjenigen des Wildtyps zu 80 % entsprach (Hölscher *et al.*, 2007). Die nach der Komplementation von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ mit dem Plasmid pJV12 erreichte Aktivität war jedoch noch geringer und entsprach der der Vektorkontrolle lediglich zu 50 %.

Die biochemischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das SldA (Mgdh) Protein nicht effizient produziert wird. Die Komplementationsplasmide pJV8 und pJV12 wurden so konstruiert, dass das *mgdh* bzw. das *sldA* Gen entgegengesetzt zum im pBBR-1 MCS2 Plasmid vorliegenden *lacZ* Gen inseriert waren. Damit sollte verhindert werden, dass eine

konkurrierende mRNA zusammen mit der *sldA* (*mgdh*) mRNA synthetisiert wird, da dies die Produktion des Mgdh (SldA) Proteins erheblich beeinträchtigen kann (Studier *et al.*, 1990). Anhand des Aufbaus des Plasmids und den bei der Konstruktion eines transkriptionellen Fusionsvektors gemachten Erfahrungen, kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Ko-Transkription der *rep* mRNA und der *sldA* (*mgdh*) mRNA kommt (s. Abbildung 13), die die Produktion des Zielproteins behindert. Eine Klonierung der Inserts in der entgegengesetzten Richtung hätte vermutlich einen ähnlichen Effekt zur Folge gehabt, da die Inserts in diesem Fall kolinear zum Kanamycin Resistenzgen vorgelegen hätten.

Ein weiterer Grund für die nicht-effiziente Produktion des SldA (Mgdh) Proteins könnte in der Produktion des auf dem Plasmid kodierten Resistenzmarkers liegen. So führt in *E. coli* eine deutlich verminderte Produktion der Kanamycin Phosphotransferase zu einer verdoppelten Produktion des rekombinanten Proteins (Panayotatos, 1988). Bei der Komplementation sollte jedoch schon eine Kopie des betreffenden Gens ausreichen um den Phänotyp des Wildtyps wiederherzustellen. Somit könnte im Umkehrschluss die höhere Kopienzahl des *mgdh* bzw. des *sldA* Gens eine Konkurrenz um die zur Transkription/Translation notwendigen Faktoren bewirken, was wiederum zu einer verminderten Effizienz bei der Produktion der Proteine führt. Auch die unter IV.7 diskutierte Überlastung der Translokationsmaschinerie könnte eine Begründung für die nicht der Vektorkontrolle entsprechende Dehydrogenase Aktivität der komplementierten Mutanten liefern.

4.6 Oxidation von *meso*-Erythritol durch *G. oxydans* DSM 7145

Die Glycerin-Dehydrogenase konnte in *G. oxydans* DSM 7145 als das *meso*-Erythritol oxidierenden Enzym identifiziert werden. Dies zeigte sich an dem ausbleibenden Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf VM + *meso*-Erythritol und der deutlichen Reduktion der membrangebundenen Oxidation von *meso*-Erythritol bei *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* (III.1.4).

Eine Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM + 50 mM *meso*-Erythritol und die Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose zeigte, dass das Wachstum mit einer raschen Abnahme von *meso*-Erythritol im Kulturüberstand einherging. Ausgehend von einer Optische Dichte von 0,062 und einer *meso*-Erythritol Konzentration von 48 mM zu Beginn des Experiments, wurde nach acht Stunden eine Optische Dichte von 0,86 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt trat die Kultur in die stationäre Wachstumsphase ein und es war kein *meso*-Erythritol im Kulturüberstand mehr nachweisbar. Die L-Erythrulose Konzentration betrug

dabei 49 mM (Abbildung 32). Demnach wurde das im Medium enthaltene *meso*-Erythritol äquimolar zu L-Erythrose oxidiert. Die fast äquimolare membranständige Oxidation von Substraten ist auch für *G. oxydans* DSM 3504 bei Wachstum auf D-Glucose beschrieben (Bremus, 2006). Interessanterweise zeigte sich in der zweiten Wachstumsphase eine Abnahme der L-Erythrose Konzentration, was mit einem leichten Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 korrelierte. Vom Zeitpunkt $t = 8$ h, wo die höchste Konzentration an L-Erythrose von 49 mM erreicht wurde, nahm die L-Erythrose Konzentration bis zum Zeitpunkt $t = 24$ h um 30 mM ab, gleichzeitig nahm die Optische Dichte von 0,86 auf 1,82 zu. Auch Moonmangnee *et al.* (2002) beobachteten bei Anzucht von *G. frateurii* CHM43 auf einem Vollmedium mit *meso*-Erythritol, das *meso*-Erythritol zunächst zu 90% zu L-Erythrose umgesetzt wurde. Im weiteren Verlauf war jedoch im Kulturüberstand eine Abnahme der L-Erythrose Konzentration nachweisbar. Die Autoren schlossen daraus, dass sowohl *meso*-Erythritol als auch L-Erythrose das Wachstum von *G. frateurii* CHM53 ermöglichen. Auch in *G. oxydans* DSM 7145 scheint die Abnahme von L-Erythrose im Zusammenhang mit dem Wachstum zu stehen, da in *resting cell* Experimenten mit *G. oxydans* DSM 7145 der Umsatz von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose gelang und die L-Erythrose Konzentration über die Dauer des Experimentes konstant blieb.

Eine HPLC Analyse von Kulturüberständen, die *G. oxydans* DSM 7145 bei Anzucht auf *meso*-Erythritol zu den Zeitpunkten $t = 0$, 6 und $t = 24$ h entnommen wurden, deuteten auf die Akkumulation von Acetat in der zweiten Wachstumsphase hin. Dies konnte wiederum durch eine GC-MS Analyse der Überstände bestätigt werden. Die Produktion von Acetat weist möglicherweise darauf hin, dass L-Erythrose ähnlich wie D-Glucose in *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ cytoplasmatisch verstoffwechselt wurde.

Somit ist ein biphasisches Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf *meso*-Erythritol zu beobachten: *meso*-Erythritol wird zunächst durch die membranständige Glycerin Dehydrogenase nahezu äquimolar zu L-Erythrose oxidiert und dieses in der zweiten Wachstumsphase im Cytoplasma verstoffwechselt. Durch die schnelle Oxidation von *meso*-Erythritol unterbindet *G. oxydans* DSM 7145 vermutlich das Wachstum von anderen Organismen auf *meso*-Erythritol. Auch Shinjoh *et al.* (2002) und Soemphol *et al.* (2007) und spekulierten, dass die Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose durch *G. suboxydans* IFO3291 bzw. *G. frateurii* THD32 und die gleichzeitige Ansäuerung des Mediums das Wachstum anderer Mikroorganismen verhindern.

Zwar ist ein Stoffwechsel von L-Erythrose Stoffwechsel von *G. oxydans* noch nicht beschrieben, die bekannten Wege zum Abbau von *meso*-Erythritol liefern jedoch erste

Hinweise auf die beteiligten Stoffwechselwege. So wird *meso*-Erythritol in *Brucella abortus* zunächst zu D-Erythritol-1-Phosphat phosphoryliert, das nachfolgend in drei Oxidationsreaktionen über D-Erythrulose-1-Phosphat und 3-Keto-L-Erythrose-4-Phosphat zu 3-Keto-L-Erythronat-4-Phosphat umgewandelt wird. 3-Keto-L-Erythronat-4-Phosphat wird schließlich zu CO₂ und Dihydroxyaceton decarboxyliert und das Dihydroxyaceton durch die letzten Schritte der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt (Sperry & Robertson, 1975). Die ersten vier am *meso*-Erythritol Abbau beteiligten Gene sind in *B. abortus* in einem Operon organisiert (Sangari *et al.*, 2000), das auch in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* zu finden ist (Yost *et al.*, 2006). Ein Blast-Abgleich (s. Tabelle 10) der *eryABCD* Gene von *R. leguminosarum* bv. *viciae* mit dem Genom von *G. oxydans* ATCC 621H ergab, dass Homologe zu den *eryAB* Genen, nicht jedoch zu den *eryCD* Genen vorliegen.

Tabelle 10: Identitäten zwischen den Ery Genprodukten von *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 und *G. oxydans* ATCC 621H (aa: Aminosäuren). Die Identitäten wurden aus einem BlastP-Alignment abgeleitet, das die gesamte Proteinsequenz umfasste. Die *Accession numbers* der *EryABCD* von *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 lauten: CAK11916-CAK11919.

ORF/Funktion <i>R. leguminosarum</i>	ORF/ Funktion <i>G. oxydans</i> ATCC 621H	Identität (aa)
EryA, Erythritol-Kinase	GOX2214/putative Carbohydratkinase	25%
EryB, Erythritol-Phosphate-DH	GOX2088/Glycerin-3-Phosphat DH	54%
EryC, D-Erythrulose-1-Phosphate-DH	-	-
EryD, transkriptioneller Repressor	-	-

Dies ist bemerkenswert, da in *G. oxydans* ATCC 621H bei Anzucht mit *meso*-Erythritol nach der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose keine ausgeprägte Abnahme der L-Erythrulose Konzentration im Kulturüberstand und auch kein Wachstum auf VM + L-Erythrulose nachgewiesen werden konnte. Das ausbleibende Wachstum könnte demnach unter anderem durch die fehlende D-Erythrulose-1-Phosphat-Dehydrogenase (EryC) zu erklären sein. Folgeexperimente müssen zeigen, ob Homologe zu den *eryCD* Genen in *G. oxydans* DSM 7145 vorliegen und somit *meso*-Erythritol auf dem oben beschriebenen Weg abgebaut werden könnte. Voraussetzung dafür ist jedoch das Vorhandensein einer Epimerase, die L-Erythrulose zu D-Erythrulose umwandelt und einer Kinase, die D-Erythrulose zu D-Erythrulose-1-Phosphat phosphoryliert oder, dass die *EryAB* Proteine auch L-Erythrulose als Substrat akzeptieren. Des Weiteren müssten die Folgeexperimente zeigen, ob das Ausscheiden von Acetat, wie bei *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh*, auf eine Art *overflow* Metabolismus zurückzuführen ist und ob noch weitere Stoffwechselwege am L-Erythrulose Metabolismus beteiligt sind.

4.7 Überexpression der Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Glycerin-Dehydrogenase die Oxidation von *meso*-Erythritol in *G. oxydans* DSM 7145 vermittelt, wurden Versuche unternommen die membrangebundene Oxidation von *meso*-Erythritol zu steigern. Dazu wurden die *sldAB* Gene in den Vektor pEXGOX(K) kloniert. In diesem Vektor stehen die inserierten Gene unter der Kontrolle des *tufB* Promotors aus *G. oxydans*, der eine Expression unabhängig von der Wachstumsphase und der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle ermöglicht (Schleyer *et al.*, 2007). Abbildungen 37 und 38 zeigen jedoch, dass weder im Wachstumsverlauf noch im *meso*-Erythritol Verbrauch und der Akkumulation von L-Erythrulose Unterschiede zwischen der Vektorkontrolle und dem Überexpressionsstamm *G. oxydans* DSM 7145 pJV17 nachgewiesen werden konnten. So war sowohl bei *G. oxydans* DSM 7145 pBBR-1 MCS2 als auch bei *G. oxydans* DSM 7145 pJV17 nach 10,5 h kein *meso*-Erythritol mehr im Kulturüberstand nachweisbar und in beiden Stämmen erreichte die L-Erythrulose Konzentration zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum. Wie schon bei *G. oxydans* DSM 7145 konnte im weiteren Verlauf des Wachstums eine Abnahme der L-Erythrulose Konzentration im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Die plasmid-basierte Überexpression von Genen in *G. oxydans* ist beispielsweise für die Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase beschrieben. Merfort (2006) erreichte damit eine 35 fache Steigerung der cytoplasmatischen Gluconat-Oxidation in *G. oxydans* ATCC 621H, wobei die Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase in dem verwendeten Konstrukt unter Kontrolle des nativen Promotors stand. Auch die Überexpression des *pqqABCDE* Operons mit dem Plasmid pTB9028 in *G. oxydans* ATCC 621H war erfolgreich. Dabei standen die PQQ-Synthesegene wiederum unter der Kontrolle des nativen Promotors. Verglichen mit dem Wildtyp konnte eine 30 fache Steigerung der PQQ Konzentration im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Hölscher & Görisch, 2006). Keine konsistenten Ergebnisse wurden bei der Überexpression von Membranproteinen in *G. oxydans* erzielt. So wiesen Merfort *et. al* (2006) zwar eine verstärkte Expression des *mgdh* Gens durch Überexpression auf dem Plasmid pBBR-1 MCS5:*gdh* nach und auch auf biochemischer Ebene war eine verstärkte Glucose-Oxidation messbar. Jedoch schien die Überexpression den Glucose-Verbrauch des rekombinanten Stammes nicht zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu wurde die Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure durch die plasmid-basierte Expression der L-Sorbose- und der L-Sorbosone-Dehydrogenase in *G. oxydans* G624 um den Faktor 2-3 gesteigert (Saito *et al.*, 1997).

Die Überexpression der Glycerin-Dehydrogenase auf dem Plasmid pBBR-1 MCS5 unter Kontrolle des *G. oxydans* *tufB* Promotors schien ebenfalls die Expression des *sldAB* Gene zu erhöhen. Bei Anzucht auf einem Vollmedium mit 25 g/L Glycerin zeigten sich jedoch keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Überexpressionsstamm. Erst bei einer Glycerin Konzentration von 50 g/L erreichte der Überexpressionsstamm eine höhere Optische Dichte als der Wildtyp und es war ein beschleunigter Glycerin Verbrauch zu erkennen (Gätgens *et al.*, 2007). Dieses Ergebnis erscheint ungewöhnlich, da von dem ausgeschiedenen Dihydroxyaceton eine ausgeprägte Produktinhibition ausgeht (Claret *et al.*, 1994), die möglicherweise eher dazu führen sollte, dass der Überexpressionsstamm eine geringere Optische Dichte erreicht.

Die eben beschriebenen Ergebnisse deuten an, dass die plasmid-basierte Überproduktion von cytoplasmatischen Proteinen in *G. oxydans* möglich ist, jedoch Schwierigkeiten bei der Überproduktion von Membranproteinen auftreten. Dies könnte zu einem damit zu erklären sein, dass in der cytoplasmatischen Membran nur begrenzt Raum zur Verfügung steht und deshalb die Verankerung von Proteinen streng kontrolliert ist. Zum anderen ist von *E. coli* bekannt, dass die Überexpression von Membranproteinen häufig toxisch für die Zellen ist (Wagner *et al.*, 2006), da die Translokationsmaschinerie durch die Überexpression überlastet wird und somit essentielle Komponenten der Atmungskette nicht mehr in die Membran eingelagert werden können (Wagner *et al.*, 2007). Es kann auch nicht außer Acht gelassen werden, dass selbst eine erhöhte Kopienzahl der Dehydrogenase nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Oxidation des Substrates einhergehen muss, da die membranständigen Dehydrogenasen die bei der Oxidation gewonnenen Elektronen an Atmungskettenkomponenten weitergeben. Eine zu geringe Menge der Konzentration an Atmungskettenkomponenten und deren Überlastung könnte demnach die beschleunigte Oxidation des Substrates verhindern. Levering *et al.* (1988) führen den hemmenden Einfluss hoher Glucose-Konzentrationen auf die 5-Keto-D-Gluconatbildung beispielsweise auf eine Überlastung der Atmungskette zurück.

Sämtliche der oben genannten Autoren zogen bei der plasmid-basierten Überexpression von Genen in *G. oxydans* nicht in Betracht, dass die verwendeten Stämme nicht *recA*⁻ sind und eine Rekombination der Plasmide in das Chromosom nicht ausgeschlossen ist. Dies könnte besonders bei der Überexpression der Glucose- bzw. der Glycerin- Dehydrogenase von Bedeutung sein, da das *sldAB* bzw. *mgdh* Gen Größen von 2,6 (2,4) kb haben, die als Homologieregionen zur Rekombination dienen könnten.

4.8 Chromosomaler Austausch des *mgdh*-Gens gegen die *sldAB*-Gene in *G. oxydans* DSM 7145

Da die plasmid-basierte Überexpression der Glycerin-Dehydrogenase keinen Einfluss auf die membranständige *meso*-Erythritol Oxidation hatte, wurde das Gen für die membranständige Glucose-Dehydrogenase (*mgdh*) durch die *sldAB* Gene der Glycerin-Dehydrogenase ersetzt. Der chromosomale Austausch bietet den Vorteil, dass lediglich zwei Kopien der *sldAB* Gene im Chromosom von *G. oxydans* DSM 7145 vorliegen und damit die oben diskutierten, mit der plasmid-basierten Überexpression verbundenen, Schwierigkeiten umgangen würden. Des Weiteren ist keine konstante Selektion mit einem Antibiotikum notwendig. Dies ist für biotechnologische Prozesse von besonderem Interesse, da der Einsatz von Antibiotika unter anderem die Weiterverarbeitung der Konversionsprodukte erschwert (Sletta *et al.*, 2004) (Svensson *et al.*, 2005).

Der Austausch des *mgdh* gegen die *sldAB* Gene hatte bei den untersuchten Polyolen in der exponentiellen Wachstumsphase keinen gravierenden Einfluss auf das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$. Einzig bei Anzucht auf *meso*-Erythritol konnte ein früheres Eintreten von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ in die stationäre Wachstumsphase beobachtet werden. Die Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose ergab, dass 53 mM *meso*-Erythritol im Verlauf von 8 h zu 49 mM L-Erythrulose oxidiert wurden, was einem Wachstum von einer $OD_{600} \sim 0,062$ auf eine $OD_{600} \sim 0,38$ verbunden war. Der Wildtyp *G. oxydans* DSM 7145 oxidierte 50 mM *meso*-Erythritol in einem vergleichbaren Zeitraum, erreichte jedoch eine OD_{600} von 0,86. Somit oxidierte eine geringere Zellmasse von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ eine vergleichbare *meso*-Erythritol Konzentration, was ein Hinweis auf die Überproduktion der Glycerin-Dehydrogenase war (vgl. Abbildungen 32 & 42). Die biochemische Charakterisierung von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh::sldAB$ zeigte jedoch nur eine deutliche Reduktion der Oxidation von D-Glucose, nicht jedoch eine Steigerung der von der Glycerin-Dehydrogenase vermittelten Enzymaktivitäten. Somit konnte auch durch eine zweite chromosomale Kopie der *sldAB* Gene keine eindeutige Steigerung der Oxidation von *meso*-Erythritol erreicht werden. Da durch PCR Nachweise wiederholt verifiziert wurde, dass zwei Kopien der *sldAB* Gene im Chromosom vorliegen, kann eine Rekombination zwischen beiden Kopien ausgeschlossen werden. Um eine Begründung für die fehlende Steigerung der *meso*-Erythritol Oxidation zu finden, sind weitere Experimente nötig. Ein interessanter Ansatz wäre dabei der chromosomale Austausch des *mgdh* gegen das *lacZ* oder *gfp* Gen, da hierdurch festgestellt werden könnte, ob die Expression eines heterologen Gens vom *mgdh* Locus möglich ist oder

ein anderer neutraler Locus im Chromosom gefunden werden muss (Koch *et al.*, 2001). Prinzipiell ist die stabile Integration von Expressionskassetten in bakterielle Genome möglich, wie die Arbeit von Choi *et. al* (2006) zeigte, die bis zu fünf Kopien des *gfp* Gens in das Chromosom von *M. extorquens* ATCC 55366 einbrachten und damit 18fach verstärkte Produktion des Gfp Proteins nachwiesen.

4.9 Unterschiede zwischen *G. oxydans* ATCC 621H und *G. oxydans* DSM 7145

Ein Vergleich der sequenzierten Gene von *G. oxydans* DSM 7145 mit der vorliegenden Sequenz von *G. oxydans* ATCC 621H zeigte, dass beide Stämme auf Ebene der DNA sehr ähnlich sind. So betragen beispielsweise die Identitäten der *sldAB* bzw. *mgdh* Gene 98 bzw. 99%. Nicht nur die Strukturgene, sondern auch die die Gene flankierenden Regionen scheinen in *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 7145 ähnlich zu sein. Dies zeigte sich daran, dass die im *Southern Blot* zu erwartenden und anhand der Sequenz von *G. oxydans* ATCC 621H berechneten Fragmentgrößen mit aus genomischer DNA von *G. oxydans* DSM 7145 erhaltenen Fragmentgrößen übereinstimmten. Trotz der Sequenzähnlichkeiten scheint es jedoch physiologische Unterschiede zwischen beiden Stämmen zu geben, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

Bei der Deletion von Genen in *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 7145 mit dem Plasmid pK19mobsacB ist die Identifikation von *double crossover* Mutanten mit dem auf dem plasmid-kodierten *sacB* Genprodukt nur in *G. oxydans* DSM 7145 nicht jedoch in *G. oxydans* ATCC 621H möglich. Die Beobachtung von Hölscher und Görisch (2006), dass *single-crossover* Mutanten, die das Plasmid in das Chromosom integriert hatten, auf einem saccharosehaltigen Medium wuchsen, konnte in dieser Arbeit bei der Inaktivierung der NAD(P)⁺ Transhydrogenase bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurden bei Austausch des *mgdh* gegen die *sldAB* Gene auf einem saccharosehaltigen Medium nur Kolonien erhalten, die einen Kan^S/Suc^R Phänotyp hatten. Die *Southern Blot* Analyse bestätigte den Austausch der Gene und damit die erfolgreiche Selektion mit dem *sacB* System. Die Saccharoseresistenz von *G. oxydans* ATCC 621H ist möglicherweise damit zu erklären, dass dieser Stamm eine Levansucrase (GOX0873) im Genom enthält und somit über einen Mechanismus zur Detoxifizierung des Levans verfügt.

Weitere Unterschiede von *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 7145 zeigten sich im Wachstum nach Deletion der Glycerin- und der Glucose-Dehydrogenase. Während Hölscher und Görisch (2006) nach Inaktivierung der PQQ-Synthesegene in *G. oxydans* ATCC 621H kein Wachstum der Mutante auf VM + Glycerin und VM + D-Glucose nachweisen konnten,

war ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* bzw. *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf denselbigen Medien zu beobachten. Möglicherweise nimmt der Stamm *G. oxydans* ATCC 621H eine physiologische Sonderstellung ein, auch da *G. suboxydans* IFO 3257 *sldA::Km* auf einem Glycerin/D-Arabitol Gemisch wuchs (Matsuhita *et al.*, 2003) und Krajewski (2008) auch ein Wachstum von *G. oxydans* N44-1 Δ *mgdh sgdh::Km* auf VM + Glucose nachweisen konnte.

Eine weitere Verstoffwechslung von L-Erythrose scheint in *G. oxydans* ATCC 621H im Gegensatz zu *G. oxydans* DSM 7145 auch nicht möglich zu sein, da bei Anzucht von *G. oxydans* ATCC 621H auf VM + *meso*-Erythritol nach Oxidation des *meso*-Erythritols zu L-Erythrose keine deutliche Abnahme der L-Erythrose Konzentration im Kulturüberstand nachweisbar war. Das in dieser Untersuchung beobachtete Wachstum auf L-Erythrose, dem Oxidationsprodukt der ersten Wachstumsphase, wurde auch für *G. frateurii* beschrieben (Moonmangnee *et al.*, 2002). Auch Soemphol *et al.* (2008) zeigten, dass *G. frateurii* CHM 43 auf L-Sorbose, dem Produkt der membranständigen Oxidation von D-Sorbitol, wuchs. Das weitere Wachstum auf bereits oxidierten Substraten scheint somit ein physiologischer Unterschied zwischen Arten oder Stämmen der Gattung *Gluconobacter* zu sein.

Aufgrund der hier beschriebenen physiologischen Unterschiede bei hoher Sequenzähnlichkeit scheint die Sequenzierung des Genoms von *G. oxydans* DSM 7145 und weiterer *Gluconobacter* Arten interessant. Diese könnte zeigen, ob die beobachteten physiologischen Unterschiede durch fehlende Gene oder andere, möglicherweise regulatorische Mechanismen, zu erklären sind.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte die membranständige Glycerin Dehydrogenase als das *meso-Erythritol* oxidierende Enzym in *G. oxydans* DSM 7145 identifiziert werden. Die Sequenzierung der für die Glycerin Dehydrogenase kodierenden *sldAB* Gene ergab, dass diese hohe Sequenzähnlichkeiten zu den Homologen aus *G. oxydans* ATCC 621H aufwiesen und dass diese in einem Operon organisiert sind. Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels 5' RLM-RACE identifizierte das 24 bp stromaufwärts vom Startcodon des *sldB* Gens gelegene Thymin als Transkriptionsstartpunkt und durch eine RT PCR mit Primern, die beide Gene überspannten, konnte eine Kotranskription der *sldAB* Gene nachgewiesen werden.

Die Inaktivierung der Glycerin Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 zeigte, dass diese nicht nur *meso*-Erythritol, sondern auch die C3-C6 Polyole Glycerin, D-Arabitol, D-Mannitol, D-Sorbitol und die Zuckersäure D-Gluconat oxidierte. Durch eine plasmid- basierte Komplementation konnte das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* auf VM + D-Mannitol, *meso*-Erythritol und Glycerin wiederhergestellt werden und in der Membranfraktion war wieder eine deutliche Oxidation der oben genannten Substrate nachweisbar, wobei die gemessenen Aktivitätswerte nicht vollständig mit denen der Vektorkontrolle korrelierten.

Die Glycerin Dehydrogenase schien unabhängig von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle konstitutiv exprimiert zu werden. Im Gegensatz dazu waren in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle Unterschiede in der membranständigen Glucose Oxidation nachweisbar. Diese war bei Anzucht auf VM + D-Glucose am höchsten und verringerte sich mit abnehmender Glucose Konzentration im Medium. Gleichzeitig waren in *G. oxydans* DSM 7145 *sldA::Genta* erhöhte Glucose Dehydrogenase Aktivitäten messbar, die ebenfalls von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle beeinflusst zu sein schienen. Aus diesem Grund wurde in einem Versuch, die von der Glycerin Dehydrogenase vermittelten Oxidationsaktivitäten zu steigern, die membranständige Glucose Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 7145 deletiert. Eine Sequenzierung des Strukturgens hatte zuvor gezeigt, dass auch dieses hohe Sequenzähnlichkeiten zu dem Homolog aus *G. oxydans* ATCC 621H aufwies und das Gen monocistronisch transkribiert wurde. Die Deletion hatte jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* einen signifikanten Einfluss auf die von der Glycerin Dehydrogenase vermittelten Oxidationen. Interessanterweise konnte ein Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 Δ *mgdh* auf VM + D-Glucose nachgewiesen werden, was auf eine Aktivierung des Pentose-

Phosphat- und möglicherweise auch des Entner-Doudoroff-Weges, nicht jedoch auf eine erhöhte cytoplasmatische Glucose Oxidation zurückzuführen war. Als Ausscheidungsprodukt von *G. oxydans* DSM 7145 $\Delta mgdh$ bei Anzucht auf VM + D-Glucose konnte Acetat identifiziert werden, das unter Umständen das Produkt eines *overflow* Metabolismus ist.

Die membranständige *meso*-Erythritol Oxidation konnte in *G. oxydans* DSM 7145 auch nicht durch eine plasmid-basierte Überexpression der Glycerin Dehydrogenase gesteigert werden. Im Gegensatz dazu war nach einem chromosomalen Austausch des *mgdh* Gens gegen die *sldAB* Gene *in vivo* eine erhöhte *meso*-Erythritol Oxidation bei geringerer Biomasseproduktion erkennbar. *In vitro* war hingegen kein Einfluss der erhöhten Kopienzahl auf die membranständige *meso*-Erythritol Oxidation nachweisbar.

Schließlich zeigte die Anzucht von *G. oxydans* DSM 7145 auf VM + *meso*-Erythritol, dass *meso*-Erythritol zunächst nahezu quantitativ zu L-Erythrose oxidiert wird, in einer zweiten Wachstumsphase jedoch eine Abnahme der L-Erythrose-Konzentration im Kulturüberstand zu beobachten war, die mit Akkumulation von Acetat einherging. Durch einen Umsatz mit *resting cells* von *G. oxydans* DSM 7145 konnten 50 mM *meso*-Erythritol in 4 h und einer Ausbeute von 94 % zu L-Erythrose oxidiert werden. Die im Kulturüberstand angehäuften L-Erythrose -Konzentration war über 24 h stabil, so dass die zuvor beobachtete Abnahme der L-Erythrose-Konzentration im Zusammenhang mit dem Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 auf L-Erythrose stand. Interessanterweise konnte bei Anzucht von *G. oxydans* ATCC621H auf *meso*-Erythritol keine Abnahme der L-Erythrose-Konzentration im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Einer von mehreren physiologischen Unterschieden, die in dieser Arbeit zwischen beiden Stämmen beobachtet wurden.

6 Literaturverzeichnis

Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E. & Ameyama, M. (1979). Occurrence of old yellow enzyme in *Gluconobacter suboxydans*, and the cyclic regeneration of NADP⁺. *Journal of Biochemistry* **86**, 699-709.

Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E. & Ameyama, M. (1980). Crystallization and characterization of NADP-dependent D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**, 301-308.

Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (1999). Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**, 402-407.

Adachi, O., Fujii, Y., Ano, Y., Moonmangmee, D., Toyama, H., Shinagawa, E., Theeragool, G., Lotong, N. & Matsushita, K. (2001a). Membrane-bound sugar alcohol dehydrogenase in acetic acid bacteria catalyzes L-ribulose formation and NAD-dependent ribitol dehydrogenase is independent of the oxidative fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**, 115-125.

Adachi, O., Fujii, Y., Ghaly, M. F., Toyama, H., Shinagawa, E. & Matsushita, K. (2001b). Membrane-bound Quinoprotein D-Arabitol Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: A Versatile Enzyme for the Oxidative Fermentation of Various Ketoses. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**, 2755-2762.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.

Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**, 5350-5353.

Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Adachi, O. (1981). D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* - Solubilization purification and characterization. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 851-861.

- Anthony, C. & Ghosh, M. (1998).** The structure and function of the PQQ containing quinoprotein dehydrogenases. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **69**, 1-21.
- Attwood, M. M., van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. (1991).** Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **72**, 101-105.
- Bachmann, B. J. (1987).** Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology*, pp. 1192-1219. Edited by F. C. Neidhardt, J. I. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Battey, A. S. & Schaffner, D. W. (2001).** Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 237-247.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**, 783-795.
- Bergmeyer, H. U. & Möllering, H. (1974).** Methoden der Enzymatischen Analyse. pp. 1566-1574. Edited by H. U. Bergmeyer. Weinheim: Verlag Chemie.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Bonfield, J. K., Smith, K. & Staden, R. (1995).** A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research* **23**, 4992-4999.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Bremus, C. (2006).** Untersuchungen zur Bildung der Vitamin C-Vorstufe 2-Keto-L-Gulonsäure mit *Gluconobacter oxydans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität. Düsseldorf
- Buchert, J. & Viikari, L. (1988).** Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 375-379.

- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987)** XL1-Blue: a high efficiency plasmid DNA transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379
- Choi, E. S., Lee, E. H. & Rhee, S. K. (1995).** Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *FEMS Microbiological Letters* **125**, 45-50.
- Choi, Y. J., Bourque, D., Morel, L., Groleau, D. & Miguez, C. B. (2006).** Multicopy Integration and Expression of Heterologous Genes in *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 753-759.
- Chomczynski, P. & Mackey, K. (1994).** One-hour capillary blotting of RNA at neutral pH. *Analytical Biochemistry* **221**, 303-305.
- Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C. & Bories, A. (1994).** Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 359-365.
- Cozier, G. E. & Anthony, C. (1995).** Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* *Biochemistry Journal* **312**, 679-685.
- Cozier, G. E., Giles, I. G. & Anthony, C. (1995).** The structure of the quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter aceti* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochemistry Journal* **308**, 375-379.
- Cranenburgh, R. M., Hanak, J. A. J., Williams, S. G. & Sherratt, D. J. (2001).** *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Research* **29**, E26.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. & Prust, C. (2002).** Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 233-242.
- Elfari, M., Ha, S.-W., Bremus, C., Merfort, M., Khodaverdi, V., Herrmann, U., Sahn, H. & Görisch, H. (2005).** A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-d-gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 668-674.

- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical biochemistry* **132**, 6-13.
- Gätgens, C., Degner, U., Bringer-Meyer, S. & Herrmann, U. (2007).** Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**, 553-559.
- Ghosh, M., Anthony, C., Harlos, K., Goodwin, M. G. & Blake, C.C.F., (1995).** The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. *Structure* **3**, 177-187.
- Gillis, M., de Ley, J., (1980).** Intra- and intergenic similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 7-27
- Greenfield, S. & Claus, G. W. (1972).** Non-functional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans* *Journal of Bacteriology* **112**, 1295-1301.
- Gupta, A., Verma, V. & Qazi, G. N. (1997).** Transposon induced mutation in *Gluconobacter oxydans* with special reference to its direct-glucose oxidation metabolism. *FEMS Microbiological Letters* **147**, 181-188.
- Gupta, A., Felder, M., A., V., Cullum, J. & Qazi, G. N. (1999).** A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase. *FEMS Microbiological Letters* **179**, 501-506.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N. & Kumar, A. (2001).** *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **3**, 445-456.
- Hädicke, J. (2005).** Das Vorkommen, die Expression und die Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen bei Essigsäurebakterien der Gattung *Gluconobacter*. Diplomarbeit. Georg-August Universität. Göttingen
- Hoffmeister, M. (2005).** Untersuchungen zur Physiologie des Essigsäurebakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H. Dissertation. Georg-August Universität. Göttingen

- Holms, W. H. (1986).** The central metabolic pathways of *Escherichia coli* : relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation* **28**, 69-105.
- Hölscher, T. & Görisch, H. (2006).** Knockout and Overexpression of Pyrroloquinoline Quinone Biosynthetic Genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Bacteriology* **188**, 7668-7676.
- Hölscher, T., Weinert-Sepalage, D. & Görisch, H. (2007).** Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* **153**, 499-506.
- Hoshino, T., Sugisawa, T., Shinjoh, M., Tomiyama, N. & Miyazaki, T. (2003).** Membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255-enzymatic and genetic characterization. *Biochimica and Biophysica Acta* **1647**, 278-288.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K. & other authors (2009).** InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research* **37**, D211-215
- Jackson, B. J. (2003).** Proton translocation by transhydrogenase. *FEBS Letters* **545**, 18-24.
- Kerstens, K. & De Ley, J. (1968).** The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **34**, 393-408.
- Kleckner, N., Roth, J. & Botstein, D. (1977).** Genetic engineering in vivo using translocatable drug resistance elements: New methods in bacterial genetics. *Journal of Molecular Biology* **116**, 125-159.
- Kleman, G. L. & Strohl, W. R. (1994).** Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3952-3958.
- Koch, B., Jensen, L. E. & Nybroe, O. (2001).** A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods* **45**, 187-195.

- Kondo, K. & Horinouchi, S. (1997a).** Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1131-1138.
- Kondo, K. & Horinouchi, S. (1997b).** Characterization of an insertion sequence, IS12528, from *Gluconobacter suboxydans*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1139-1142.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. I. & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Krajewski, V. (2008).** Modifikation des Glucosestoffwechsels in *Gluconobacter oxydans*. Dissertation. Heinrich-Heine Universität. Düsseldorf.
- Kulhanek, M. (1989).** Microbial dehydrogenations of monosaccharides. *Advances in applied microbiology* **34**, 141-181.
- Laemmlı, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamed, R. & Zeikus, J. G. (1980).** Glucose Fermentation Pathway of *Thermoanaerobium brockii*. *Journal of Bacteriology* **141**, 1251-1257.
- Lasko, D. R., Schwerdel, C., Bailey, J. E. & Sauer, U. (1997).** Acetate specific stress response in acetate resistant bacteria: an analysis of protein patterns. *Biotechnology Progress* **13**, 519-523.
- Lasko, D. R., Zamboni, N. & Sauer, U. (2000).** Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 243-247.
- Levering, P. R., Weenk, G., Olijve, W., Dijkhuizen, L. & Harder, W. (1988).** Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621-H. *Archives of Microbiology* **149**, 534-539.
- Ley De, J. & Dochy, R. (1960).** On the localization of oxidase systems in *Acetobacter cells*. *Biochimica and Biophysica Acta* **40**, 277-289.

- Ley De, J., Gillis, M. & Swings, J. (1984).** The genus *Gluconobacter*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 267-278. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Ley De, J. & Stouthamer, A. H. (1959).** The mechanism and localization of hexonate metabolism in *Acetobacter suboxydans* and *Acetobacter melanogenum*. *Biochimica and Biophysica Acta* **34**, 171-183.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A. & other authors (2008).** Complete sequence of chromosome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5: US DOE Joint Genome Institute.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1987).** Purification and characterization of cytochrome o-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biochimica and Biophysica Acta* **894**, 304-312.
- Matsushita, K., Toyama, H. & Adachi, O. (1994).** Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **36**, 247-301.
- Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y. & other authors (2003).** 5-Keto-D-Gluconate Production Is Catalyzed by a Quinoprotein Glycerol Dehydrogenase, Major Polyol Dehydrogenase, in *Gluconobacter* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1959-1966.
- Marmur, J. (1961).** Determination of DNA by formamide. *Biochimica and Biophysica Acta* **51**, 32-36.
- Maruyama, K. & Sugano, S. (1994).** Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**, 171-174.
- Merfort, M., Herrmann, U., Seung-Wook, H., Elfari, M., Bringer-Meyer, S., Görisch, H. & Sahn, H. (2006).** Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnology Journal* **1**, 556-563.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988).** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**, 1215

- Miyazaki, T., Tomiyama, N., Shinjoh, M. & Hoshino, T. (2002).** Molecular cloning and functional expression of D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO3255, which requires pyrroloquinoline quinone and hydrophobic protein SldB for activity development in *E. coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 262-270.
- Mizanur, R. M., Takeshita, K. E. I., Moshino, H., Takada, G. & Izumori, K. E. N. (2001).** Production of L-Erythrose via L-Erythrulose from Erythritol Using Microbial and Enzymatic Reactions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 237-241.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. & Matsushita, K. (2002).** L-Erythrulose Production by Oxidative Fermentation is Catalyzed by PQQ-Containing Membrane-bound Dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 307-318.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, pp. 335-350. Edited by R. Wu. San Diego: Academic Press.
- Muynck De, C., Pereira, C. S. S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. (2007).** The Genus *Gluconobacter oxydans*: Comprehensive Overview of Biochemistry and Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **27**, 147 - 171.
- Panayotatos, N. (1988).** Recombinant protein production with minimal-antibiotic resistance vectors. *Gene* **74**, 357-363.
- Pestov, N. B. & Rydström, J. (2007).** Purification of recombinant membrane proteins tagged with calmodulin-binding domains by affinity chromatography on calmodulin-agarose: example of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Nature Protocols* **2**, 198-202.
- Pronk, J., Levering, P., Olijve, W. & van Dijken, J. (1989).** Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme and Microbial Technology* **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., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. & Deppenmeier, U. (2005). Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology* **23**, 195-200.

Reese, M. G. (2001). Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 51-56.

Reichstein, T. & Grussner, A. (1934). Eine ergiebige Synthese der 1-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helvetica Chimica Acta* **17**, 311-315.

Romano, A. H., Eberhard, S. J., Dingle, S. L. & McDowell, T. D. (1970). Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. *Journal of Bacteriology* **104**, 808-813.

Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp. 365-386. Edited by S. Krawetz & S. Misener. Totowa: Humana Press.

Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H. & other authors (1997). Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 454-460.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning-A Laboratory Journal*, 2 edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sangari, F. J., Aguero, J. & Garcia-Lobo, J. M. (2000). The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology* **146**, 487-495.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.

Shaefer, B. (1995). Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Analytical Biochemistry* **227**, 255-273.

Schleyer, U., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (2007). An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. *International Journal of Food Microbiology* **125**, 91-95.

Schedel, M. (2000). Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, a key reaction in the industrial synthesis of 1-deoxynojirimycin. In *Biotechnology*, pp. 296-308. Edited by D. Kelly. Weinheim: Wiley-VCH.

Schroder, T. & Stubbe, M. (1989). Patent UP 4806650.

Shaw, D. R. D. & Bygrave, F. L. (1966). NAD⁺-linked D-mannitol dehydrogenase in *Acetobacter suboxydans*. *Biochimica and Biophysica Acta* **113**, 608-610.

Shinagawa, E., Chiyonobu, T., Adachi, O. & Ameyama, M. (1976). Distribution and solubilisation of particulate gluconate dehydrogenase and particulate 2-ketogluconate dehydrogenase in acetic acid bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* **40**, 475-483.

Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. & Ameyama, M. (1982a). Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var.a. *Agricultural and Biological Chemistry* **46**, 135-141.

Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. & Ameyama, M. (1982b). D-Gluconate Dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconobacter dioxyaceticus*: purification and characterization. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**, 1517-1522.

Shinjo, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T. & Hoshino, T. (2002). Main Polyol Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255, Membrane-bound D-Sorbitol Dehydrogenase, That Needs Product of Upstream Gene, *sldB*, for Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 2314-2322.

Shinjo, M., Tazoe, M., and Hoshino, T. 2002. NADPH-dependent L-sorbose reductase is responsible for L-sorbose assimilation in *Gluconobacter suboxydans* IFO 3291. *Journal of Bacteriology* **184**, 861-883

Schweiger, P., Volland, S. & Deppenmeier, U. (2007). Overproduction and characterization of two distinct aldehyde oxidizing enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**, 147-155.

- Sievers, M. & Swings, J. (2005).** The Proteobacteria, PartC $\alpha,\beta,\delta,\epsilon$ -Proteobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 41-95. Edited by G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg & J. T. Staley. New York: Springer Science + Business.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *BioTechnology* **1**, 784-791.
- Sletta, H., Nedal, A., Aune, T. E. V., Hellebust, H., Hakvag, S., Aune, R., Ellingsen, T. E., Valla, S. & Brautaset, T. (2004).** Broad-Host-Range Plasmid pJB658 Can Be Used for Industrial-Level Production of a Secreted Host-Toxic Single-Chain Antibody Fragment in *Escherichia coli*. **70**, 7033-7039.
- Soemphol, W., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2007).** L-Sorbose reductase and its transcriptional regulator involved in L-sorbose utilization of *Gluconobacter frateurii*. *Journal of Bacteriology* **189**, 4800-4808.
- Soemphol, W., Adachi, O., Matsushita, M. & Toyama, H. (2008).** Distinct physiological roles of two membrane bound dehydrogenases responsible for D-sorbitol oxidation in *Gluconobacter frateurii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**, 842-850
- Sonoyama, T., Tani, H., Matsuda, K., Kageyama, B., Tanimoto, M., Kobayashi, K., Yagi, S., Kyotani, H. & Mitsushima, K. (1982).** Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by 2-stage fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1064-1069.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.
- Sperry, J. F. & Robertson, D. C. (1975).** Erythritol Catabolism by *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology* **121**, 619-630.
- Steiner, P. & Sauer, U. (2001).** Proteins Induced during Adaptation of *Acetobacter aceti* to High Acetate Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5474-5481.
- Stouthamer, A. H. (1959).** Oxidative possibilities in the catalase-positive *Acetobacter* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **25**, 241-264.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA Polymerase to direct gene expression of cloned genes. In *Methods in Enzymology*, pp. 60-89. Edited by D. V. Goeddel. San Diego: Academic Press.

Sugisawa, T. & Hoshino, T. (2002). Purification and Properties of Membrane-bound D-Sorbitol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 57-64.

Svensson, M., Svensson, I. & Enfors, S.-O. (2005). Osmotic stability of the cell membrane of *Escherichia coli* from a temperature-limited fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 345-350.

Talaat, A. M., Howard, S. T., Hale Iv, W., Lyons, R., Garner, H. & Johnston, S. A. (2002). Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research* **30**, e104-.

Tonouchi, N., Sugiyama, M. & Yokozeki, K. (2003). Coenzyme Specificity of Enzymes in the Oxidative Pentose Phosphate Pathway of *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**, 2648-2651.

Toyama, H., Furuya, N., Saichana, I., Ano, Y., Adachi, O. & Matsushita, K. (2007). Membrane-Bound, 2-Keto-D-Gluconate-Yielding D-Gluconate Dehydrogenase from *Gluconobacter dioxyacetonicus* IFO 3271: Molecular Properties and Gene Disruption. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6551-6556.

Tschamber, T., Craig, C. J., Muller, M. & Streith, J. (1996). Stereoselective synthesis of D,L-erythrose-, and of D,L-1,4-dideoxy-4-aminoerythrose derivatives bearing B lactam at C-4. *Tetrahedron* **52**, 6201-6214.

Wach, A. (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**, 259-265.

Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P.-A., van Wijk, K. J. & de Gier, J.-W. (2007). Consequences of Membrane Protein Overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**, 1527-1550.

- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S. & other authors (2008).** Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 14371-14376.
- Wendland, J. (2003).** PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. *Current Genetics* **44**, 115-123.
- Williams, P. J. & Rainbow, C. (1964).** Enzymes of the tricarboxylic acid cycle in acetic acid bacteria *Journal of General Microbiology* **35**, 237-247.
- Yamada, M., Sumi, K., Matsushita, K., Adachi, O. & Yamada, Y. (1993).** Topological analysis of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12812-12817.
- Yamada, Y., Hoshino, K. & Ishikawa, T. (1997).** The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**, 1244-1251.
- Yost, C. K., Rath, A. M., Noel, T. C. & Hynes, M. F. (2006).** Characterization of genes involved in erythritol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology* **152**, 2061-2074.

Anhang

Übersicht über die in verwendeten Oligonukleotide (Unterstrichene Sequenzabschnitte kennzeichnen eingefügte Restriktionsschnittstellen)

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
M13_uni	CATTTTGCTGCCGGTCA	Sequenzierungsprimer Vektor pSC-A
M13_rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierungsprimer Vektor pSC-A
pJET1.2_for	C ⁺ GA ⁺ CTCA ⁺ CTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierungsprimer Vektor pJET 1.2
pJET1.2_rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Sequenzierungsprimer Vektor pJET 1.2
pK19_Seq_for	GCTTTACACTTTATGCTTCCG	Sequenzierungsprimer Vektor pK19mobsacB
pK19_Seq_rev	GCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	Sequenzierungsprimer Vektor pK19mobsacB
5' RACE_outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	Primer nested PCR 5' RLM RACE
5' RACE_inner	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGC TTTGATG	Primer nested PCR 5' RLM RACE
<i>sldB</i> _for	GACTTACCGTCCGGACTTTCAGTTCTG	Amplifikation <i>sldB</i> Gen
<i>sldB</i> _rev	CGTGGCACAGGCAACGGTGGCGAGAAG	Amplifikation <i>sldB</i> Gen
<i>sldA</i> _for	GTCTGATGCGCAGATCCCATCTTCTCG	Amplifikation <i>sldA</i> Gen
<i>sldA</i> _rev	CGCTTTCTCAGCCCTTGTGATCAGGCA GTG	Amplifikation <i>sldA</i> Gen
<i>sldA</i> _w1	GCTTTCGTCTATCACACCGGTAGC	Sequenzierungsprimer <i>sldA</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>sldA</i> _w2	GTAGAGGCCGTCACCCACCTTGATC	Sequenzierungsprimer <i>sldA</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>sldA</i> _w3	GATACCGTAAGGCGTGCCGTC	Sequenzierungsprimer <i>sldA</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>sldA</i> _w4	ACGTAGACGAGGCCAGCGCATT	Sequenzierungsprimer <i>sldA</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>sldA</i> _w5	GACAATGCGCTGGGCCTCGTC	Sequenzierungsprimer <i>sldA</i>

		Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
sldA_w6	GACCAGCTCGTAACCCGCAAG	Sequenzierungsprimer <i>sldA</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
sldB_v_for	ATGCCGCGGTCAGTTACAACAACAC	Verifikationsprimer Inaktivierung Glycerin Dehydrogenase
sldA_v_rev	GCCGGAAGAACCTGAAGGATGACGG GAG	Verifikationsprimer Inaktivierung Glycerin Dehydrogenase
sldA_p_for	GCGTCCATGGACGGCAGCCTTA	Amplifikation <i>sldA</i> Sonde
sldB_prom_for	CATTTGAATTTGTTGAAGTGCAACC	Amplifikation <i>sldB</i> Promotor Komplementationsvektor pJV9
sldB_prom_rev	ATCTGCGCATTGGTGAAAGCCTCCAGA ACTGAAAG	Amplifikation <i>sldB</i> Promotor Komplementationsvektor pJV9
sldA_compl_for	GCTTTCACCAATGCGCAGATCCCATCT TCTCGCCA	Amplifikation <i>sldA</i> Gen für Komplementationsvektor pJV9
sldA_compl_rev	GCTTTCTCAGCCCTTGTGATCAGG	Amplifikation <i>sldA</i> Gen für Komplementationsvektor pJV9
pEXGOX_v_for	GCATCGTTTACGGTGCTCTCGAAGTC	Verifikationsprimer Vektor pEXGOX(K)
pEXGOX_v_rev	GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT	Verifikationsprimer Vektor pEXGOX(K)
mgdh_up_for	<u>TCTAGAGATCTCGATGCCAGCCTTGTCC</u>	Amplifikation up Homologieregion <i>mgdh</i>
up_sldB_rev	ATAAGTATTCGGCATGATGTTCTGGAT CTGTTGTTCTG	Amplifikation up Homologieregion <i>mgdh</i>
sldB_up_for	CAGATCCAGGAACATCATGCCGAATAC TTATGGCAGCAGA	Amplifikation <i>sldAB</i> für Fusion <i>mgdh_up</i> Homologieregion
down_sldA_rev	CGAGGGTCCTGTCAGATCAGCCCTTGT GATCAGGCAG	Amplifikation <i>sldAB</i> für Fusion <i>mgdh_down</i> Homologieregion
down_sldA_for	TGCCTGATCACAAGGGCTGATCTGAC ACGACCCTCGGGGC	Amplifikation down Homologieregion <i>mgdh</i>
mgdh_sldAB_v_for	GCCAGCGTGTCATTCCTGAGTATATC	Verifikationsprimer Austausch Glycerin gegen Glucose DH
sldB_RC_out	GCTCGAAGGAATTGCCGCTGCCAT	Primer für nested PCR 5'RLM RACE <i>sldAB</i>
sldB_RC_in	GAAGATGGGATCTGCGCATCAGAC	Primer für nested PCR 5'RLM RACE <i>sldAB</i>

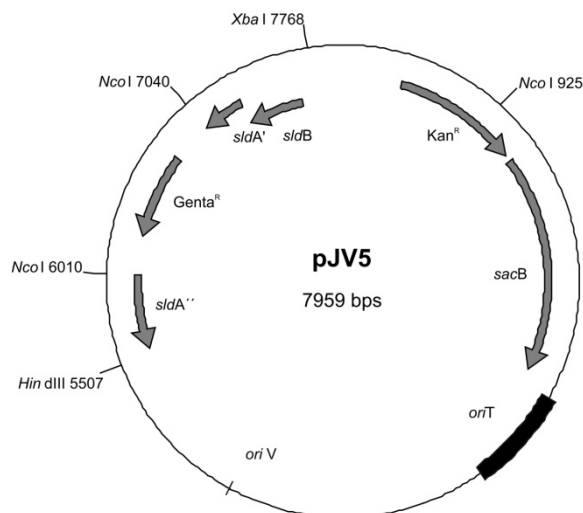
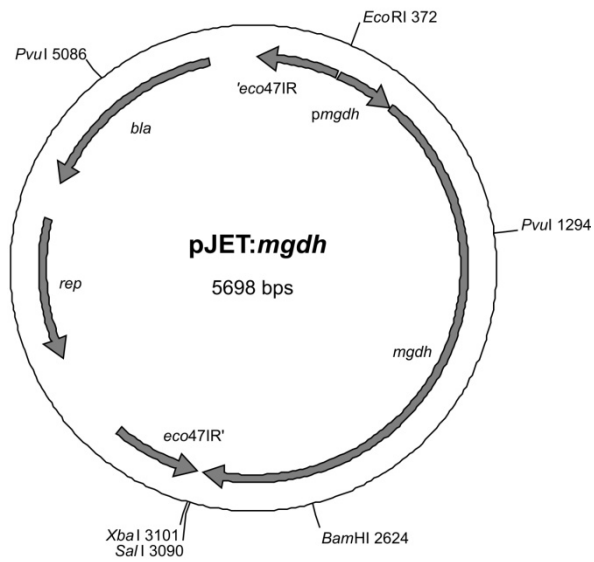
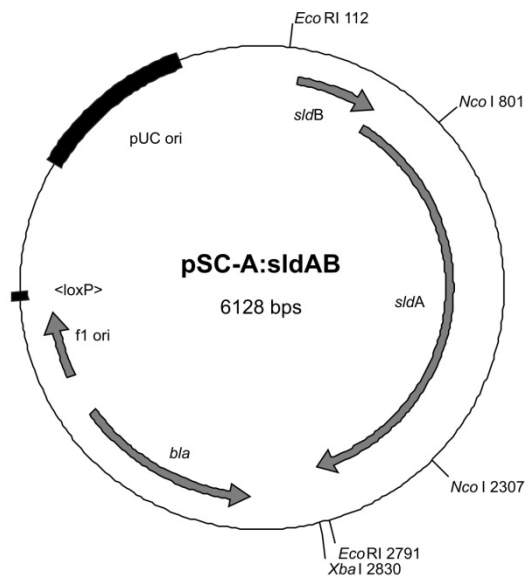
<i>sldA_north_for</i>	CTTCGTGATCGCCGGGGCCGACCTC	Amplifikation <i>sldAB</i> Sonde <i>Northern Blot</i>
<i>sldA_north_rev</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCACTCTG CTGCGGGGCCATCTGC	Amplifikation <i>sldAB</i> Sonde <i>Northern Blot</i>
<i>sldA_north_rev2</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTCGATCT TCATGATGTCGTTCTGTG	Amplifikation <i>sldA</i> Sonde <i>Northern Blot</i>
<i>mgdh_w1</i>	GCACGCCTATGGTCGTACGC	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w2</i>	GCGTTGATCTGGTTCAGCGG	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w3</i>	GCCAGTACGAGCCGACGTCC	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w4</i>	GTGATGGCGCTGTTGGCGATG	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w5</i>	GACATCTTCGTCCTCGACCG	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w6</i>	GTCAGCTGCGACATCGGCTG	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w7</i>	GCCGTTCCGGCATCAAGATGC	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_w8</i>	CAGCACCGGATCCAGGAACG	Sequenzierungsprimer <i>mgdh</i> Gen <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>mgdh_up_for</i>	<u>GGATCC</u> ACAGGGCGCGAAATCACGC TTC	Amplifikation up Homologieregion <i>mgdh</i> (<i>Bam</i> HI)
<i>mgdh_up_rev</i>	GGGTCCTGTCAGAGATGTTCTGGATCT GTTGTTCC	Amplifikation up Homologieregion <i>mgdh</i>
<i>mgdh_down_for</i>	GATCCAGGAACATCTCTGACAGGACCC TCGGGGCC	Amplifikation down Homologieregion <i>mgdh</i>
<i>mgdh_down_rev</i>	GTCTTGTAGCGGGAGACTAGCGGAAACC	Amplifikation down Homologieregion <i>mgdh</i>
<i>mgdh_v_for</i>	GATCTCGATGCCAGCCTTGCCAGACC	Verifikationsprimer Glucose Dehydrogenase
<i>mgdh_v_rev</i>	GTATGATCTCCAGAGCGGTGCCGGGT TAC	Verifikationsprimer Glucose Dehydrogenase
<i>mgdh_p_for</i>	GACACGTGCCATTTACCTTATCTCCTTAC	Amplifikation <i>mgdh</i> Sonde <i>Southern Blot</i>

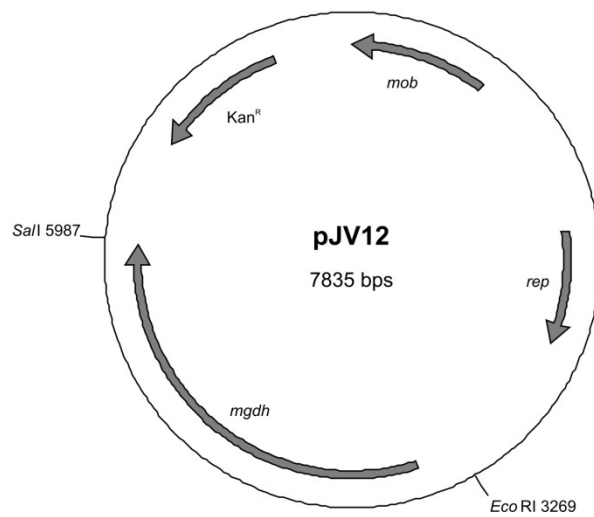
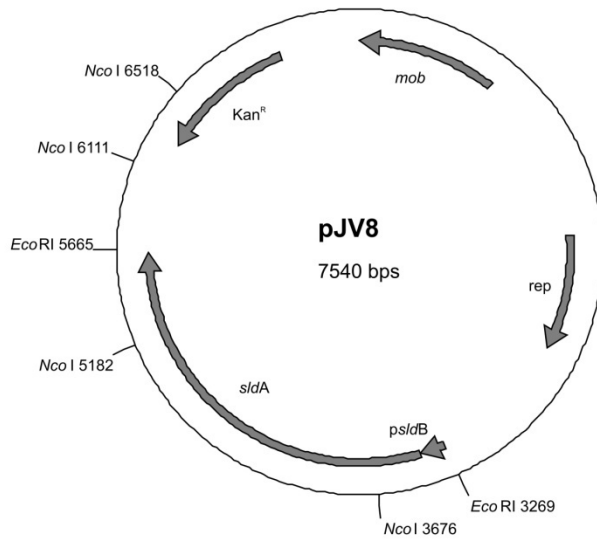
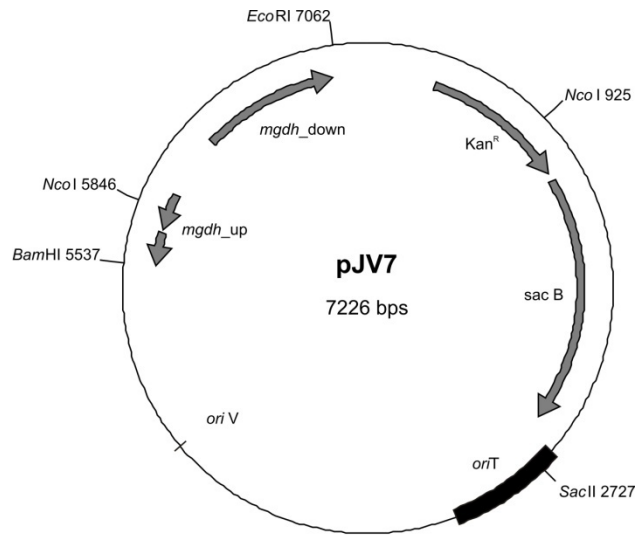
<i>mgdh_compl_for</i>	<u>GAATTCTGCACGGCCGGGCATGCCAC</u> TCG	Amplifikation <i>mgdh</i> mit putativem Promotor (<i>EcoRI</i>)
<i>mgdh_compl_rev</i>	<u>GTCGACCATGGCCCCGAGGGTCCTGTC</u> AGAT	Amplifikation <i>mgdh</i> mit putativem Promotor (<i>Sall</i>)
<i>mgdh_RC_out</i>	CGTTGGAGTTCATCATATCCTTGG	Primer für Nested PCR 5' RLM RACE <i>mgdh</i>
<i>mgdh_RC_in</i>	GTTTGGCGATCTGCGTCGGCAGGTC	Primer für Nested PCR 5' RLM RACE <i>mgdh</i>
<i>mgdh_north_for</i>	GGAACATCATGAGCACAAACATCCCGGC	Amplifikation <i>mgdh</i> Sonde <i>Northern Blot</i>
<i>mgdh_north_rev</i>	TAATACGACTCACTATAGGGACCGGC CTGCGTACGACCATAGGCG	Amplifikation <i>mgdh</i> Sonde <i>Northern Blot</i>
<i>gyr_for</i>	GGGCTATACTGATCCATCAGTTATTCAG	Amplifikation/Sequenzierung DNA Gyrase Untereinheit β <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>gyr_rev</i>	GTCAAGATTGGCGACTTTCAGGGC	Amplifikation/Sequenzierung DNA Gyrase Untereinheit β <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>g6pdh_for</i>	GACAGGGAAGACTAGACGGTGCCTGAA	Amplifikation/Sequenzierung Glucose 6-Phosphat DH <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>g6pdh_rev</i>	GTTACTCCGACGCTTCATGCCAGG	Amplifikation/Sequenzierung Glucose 6-Phosphat DH <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>6pgdh_for</i>	GCGTTCATATCGATGGACCGCTGG	Amplifikation/Sequenzierung 6-Phosphogluconat DH <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>6pgdh_rev</i>	GCTGGTCATTGATGGCAAACCATAC	Amplifikation/Sequenzierung 6-Phosphogluconat DH <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>cgdh_for</i>	CGTGATGCGTTTTTCAGTCACGGTTTC	Amplifikation/Sequenzierung cytoplasmatische Glucose DH <i>G. oxydans</i> DSM 7145
<i>cgdh_rev</i>	GATGAGGAAATCATCCTCGATCAGC	Amplifikation/Sequenzierung cytoplasmatische Glucose DH <i>G. oxydans</i> DSM 7145

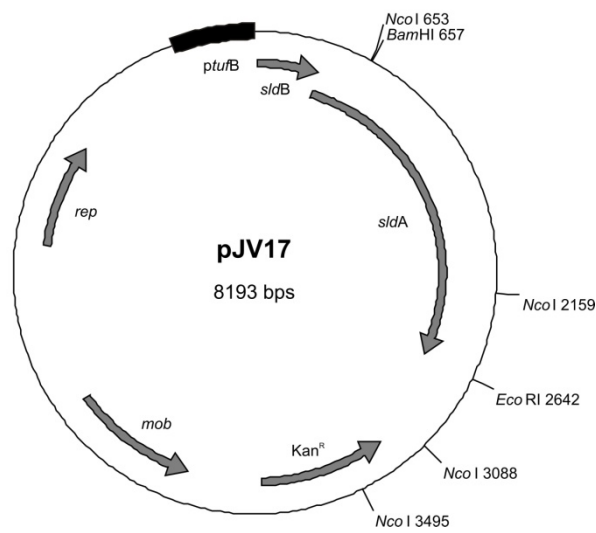
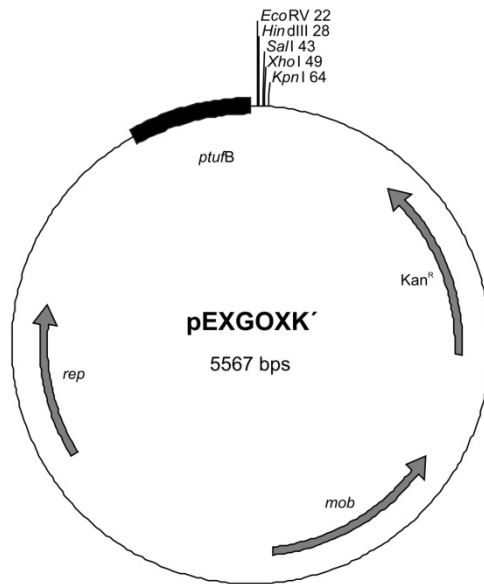
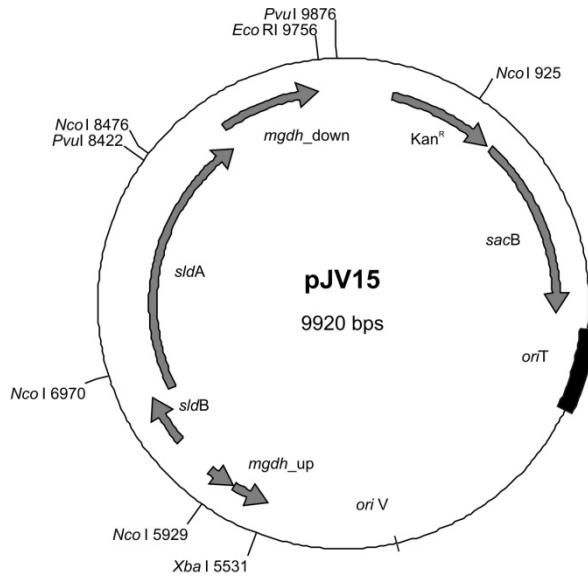
Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die RT *real time* PCR

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
<i>sldA</i> _RT_for	CGTGCCGGATCTGAAAGAGA	Real time RT PCR <i>sldA</i> (Glycerin Dehydrogenase)
<i>sldA</i> _RT_rev	CGCCGTTATAGCCCGGATAC	Real time RT PCR <i>sldA</i> (Glycerin Dehydrogenase)
<i>mgdh</i> _RT_for	GGCCTGCAGCACAACCTATGG	Real time RT PCR <i>mgdh</i> (Glucose Dehydrogenase)
<i>mgdh</i> _RT_rev	TGCCAGACGACCTTGTTGGT	Real time RT PCR <i>mgdh</i> (Glucose Dehydrogenase)
G-6-P-DH_RT_for	TGAGCGGCTTCTTCTGGATG	Real time RT PCR <i>g6pdh</i> (Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase)
G-6-P-DH_RT_rev	CCCATAGGAACCCGCACTGT	Real time RT PCR <i>g6pdh</i> (Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase)
6-PG-DH_RT_for	ACATTGCCGTTTCGTCTGACC	Real time RT PCR <i>6pgdh</i> (6-Phosphogluconat Dehydrogenase)
6-PG-DH_RT_rev	GGTGCTCATCGCCTTCAAGA	Real time RT PCR <i>6pgdh</i> (6-Phosphogluconat Dehydrogenase)
<i>cgdh</i> _RT_for	CATGGGTGGTCTCGACGTTC	Real time RT PCR <i>cgdh</i> (Glucose Dehydrogenase Cytoplasma)
<i>cgdh</i> _RT_rev	TTCCAGCCAGTAACGGATGA	Real time RT PCR <i>cgdh</i> (Glucose Dehydrogenase Cytoplasma)
<i>gyr</i> _RT_for	AGGAAGTCGCGTTCCTTTTCG	Real time RT PCT <i>gyr</i> (DNA Gyrase Untereinheit β)
<i>gyr</i> _RT_rev	TCCAGACGCTGCTGGAAGCTC	Real time RT PCT <i>gyr</i> (DNA Gyrase Untereinheit β)

Plasmidkarten







Nukleotidalignments

Nukleotid (Clustal W) des *6pgdh* (6-Phosphogluconat Dehydrogenase) von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H (*gox1705*).

```

DSM7145      ATGCGGATCGGAATCATCGGACTGGGACGGATGGGCGGCAACATTGCCGTTTCGTCTGACC 60
ATCC621H     ATGCGGATCGGAATCATCGGACTGGGACGGATGGGCGGCAACATTGCCGTTTCGTCTGACC 60
*****

DSM7145      CGGCATGGGCATGATGTCGTCTGTCATGACCGCACGTCGGAAGTGACCACCTCTGTCTGTC 120
ATCC621H     CGGCATGGGCATGATGTCGTCTGTCATGACCGCACGTCGGAAGTGACCACCTCTGTCTGTC 120
*****

DSM7145      GGGCGGTGTGAAGCAGGGCGTGAACGCCTGCCGACACGCTGGCGGACATGGCAAAGCTT 180
ATCC621H     GGGCGGTGTGAAGCAGGGCGTGAACGCCTGCCGACACGCTGGCGGACATGGCAAAGCTT 180
*****

DSM7145      CTTGAAGGCGATGAGCACCGCGTGGTGTGGGTTCATGCTGCCGCGCGGCCCATCACCGAG 240
ATCC621H     CTTGAAGGCGATGAGCACCGCGTGGTGTGGGTTCATGCTGCCGCGCGGCCCATCACCGAG 240
*****

DSM7145      GACTGCGTTCAGCAGCTCGGGGTCTTCTGGGGCGCGGCGACATCATCATTGATGGTGGC 300
ATCC621H     GACTGCGTTCAGCAGCTCGGGGTCTTCTGGGGCGCGGCGACATCATCATTGATGGTGGC 300
*****

DSM7145      AATACCTACTACAAGGACGATGTCCGCCGTTCCGCCGAAGTGGCTGAAAAGGGCATTTC 360
ATCC621H     AATACCTACTACAAGGACGATGTCCGCCGTTCCGCCGAAGTGGCTGAAAAGGGCATTTC 360
*****

DSM7145      TATGTCGATGTCGGGACTTCAGCGCGTGTCTGGGGTCTGGAACCGGGTACTGTCATGATG 420
ATCC621H     TATGTCGATGTCGGGACTTCAGCGCGTGTCTGGGGTCTGGAACCGGGTACTGTCATGATG 420
*****

DSM7145      TTCGGCGGCACGAAAAGAGACCGCGAATACATCGACCCGATCCTCAGCGCGCTGGCGCCG 480
ATCC621H     TTCGGCGGCACGAAAAGAGACCGCGAATACATCGACCCGATCCTCAGCGCGCTGGCGCCG 480
*****

DSM7145      GGCATCGGGGATGTACC CGCACACCGGGTCTGTGACGAGGCGGGTCATGATCCGCGCGCC 540
ATCC621H     GGCATCGGGGATGTACC CGCACACCGGGTCTGTGACGAGGCGGGTCATGATCCGCGCGCC 540
*****

DSM7145      GAACAGGGCTATCTGCACTGTGGTCCC GCCGTTTCGGGCCACTTCGTGAAGATGGTCCAT 600
ATCC621H     GAACAGGGCTATCTGCACTGTGGTCCC GCCGTTTCGGGCCACTTCGTGAAGATGGTCCAT 600
*****

DSM7145      AACGGCATCGAATACGGCATGATGCAGGCCCTTCGCAGAAGGCTTCGACATCATGAAGAGC 660
ATCC621H     AACGGCATCGAATACGGCATGATGCAGGCCCTTCGCAGAAGGCTTCGACATCATGAAGAGC 660
*****

DSM7145      AAGAACTCCCCGATCCTTGC GGGAAAAGGACCGGTTTCGAGCTCAACATGGGTGACATCGCG 720
ATCC621H     AAGAACTCCCCGATCCTTGC GGGAAAAGGACCGGTTTCGAGCTCAACATGGGTGACATCGCG 720
*****

DSM7145      GAAGTCTGGCGTCGCGGCAGTGTGTCGTCTGCTCCTGGCTGCTCGATCTGACGGCCGAGGCC 780
ATCC621H     GAAGTCTGGCGTCGCGGCAGTGTGTCGTCTGCTCCTGGCTGCTCGATCTGACGGCCGAGGCC 780
*****

DSM7145      CTGACGCGTTCGGAGACGCTTAACGAGTTCTCCGGCGAAGTCGCGGATTCGGTGAAGGT 840
ATCC621H     CTGACGCGTTCGGAGACGCTTAACGAGTTCTCCGGCGAAGTCGCGGATTCGGTGAAGGT 840
*****

DSM7145      CGCTGGACGATCGAAGCCGCTATTGAAGAAGACGTCGCCGGCTCCGGTCATGACGGCGGCG 900
ATCC621H     CGCTGGACGATCGAAGCCGCTATTGAAGAAGACGTCGCCGGCTCCGGTCATGACGGCGGCG 900
*****

DSM7145      CTGTTACCCCGTTCCGCTCACGGTCGGGTAATAATTTGCCGAGAAAATTCCTCGGCA 960
ATCC621H     CTGTTACCCCGTTCCGCTCACGGTCGGGTAATAATTTGCCGAGAAAATTCCTCGGCA 960
*****

DSM7145      CAGCGTTTCGGTTTCGGCGGACACGTCGAAAAGAAATAA 999
ATCC621H     CAGCGTTTCGGTTTCGGCGGACACGTCGAAAAGAAATAA 999
*****

```

Nukleotidalignment (Clustal W) des *cgdh* (cytoplasmatische Glucose Dehydrogenase) von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H (*gox2015*).

```
DSM7145      ATGCCTGCCCTTACAAAGACCGTTTCGCCGGCAAGAAAGTCCTCGTCACCGGGGCTCC 60
ATCC621H     ATGCCTGCCCTTACAAAGACCGTTTCGCCGGCAAGAAAGTCCTCGTCACCGGGGCTCC 60
*****

DSM7145      CAGGGAATTGGCGAGGCCACCGCGCTTCGTTTTGCCGAAGAAGGCGCGCAGGTCGCCCTC 120
ATCC621H     CAGGGAATTGGCGAGGCCACCGCGCTTCGTTTTGCCGAAGAAGGCGCGCAGGTCGCCCTC 120
*****

DSM7145      AACGGCCGCAAGGAAGACAAGCTGATCGCCGTCGCGGAGAAGCTGCCCAAGGTTTCCGGC 180
ATCC621H     AACGGCCGCAAGGAAGACAAGCTGATCGCCGTCGCGGAGAAGCTGCCCAAGGTTTCCGGC 180
*****

DSM7145      GGAGAGCACCCGATCGCCACGGGTGACATTTCCAAAGAAGACGACGTCAAACGTCGTGTT 240
ATCC621H     GGAGAGCACCCGATCGCCACGGGTGACATTTCCAAAGAAGACGACGTCAAACGTCGTGTT 240
*****

DSM7145      GCCGAGAGCATCAAGGCCATGGGTGGTCTCGACGTTCTGGTCTGCAATGCGGGCTATCAG 300
ATCC621H     GCCGAGAGCATCAAGGCCATGGGTGGTCTCGACGTTCTGGTCTGCAATGCGGGCTATCAG 300
*****

DSM7145      ATCCCCTCCCCTCAGAAGACATCAAGCTCGAAGATTTTGAAGGCGTGATGGCCGTCAAC 360
ATCC621H     ATCCCCTCCCCTCAGAAGACATCAAGCTCGAAGATTTTGAAGGCGTGATGGCCGTCAAC 360
*****

DSM7145      GTCACGGGGGTGATGCTGCCCTGTCGCGAAGTCATCCGTTACTGGCTGGAAAACGGCATC 420
ATCC621H     GTCACGGGGGTGATGCTGCCCTGTCGCGAAGTCATCCGTTACTGGCTGGAAAACGGCATC 420
*****

DSM7145      AAGGGCACGATCATTGTGAACTCCTCCGTTACCAGATCATCCCGAAACCGCATTATCTG 480
ATCC621H     AAGGGCACGATCATTGTGAACTCCTCCGTTACCAGATCATCCCGAAACCGCATTATCTG 480
*****

DSM7145      GGCTATTCGCCTCCAAGGGTGCCTCGGCAACATTGTCGCGCACGCTGGCACTGGAATAT 540
ATCC621H     GGCTATTCGCCTCCAAGGGTGCCTCGGCAACATTGTCGCGCACGCTGGCACTGGAATAT 540
*****

DSM7145      GCCAGCCGCGGCATCCGGGTGAATGCCGTGGCGCCCGGCGCCATCGTGACGCCGATCAAC 600
ATCC621H     GCCACCCGCGGCATCCGGGTGAATGCCGTGGCGCCCGGCGCCATCGTGACGCCGATCAAC 600
***

DSM7145      ATGTCGTGGATCGACGATCCCGAACAGTACAAGCCGTTTCGAGCCACATCCCGATGAAG 660
ATCC621H     ATGTCGTGGATCGACGATCCCGAACAGTACAAGCCGTTTCGAGCCACATCCCGATGAAG 660
*****

DSM7145      CGCCCGGGCGAAAGCCGCGAAATCGCGGATGCCATCACCTTCCTCGCCGCGGAGGACAGC 720
ATCC621H     CGCCCGGGCGAAAGCCGCGAAATCGCGGATGCCATCACCTTCCTCGCCGCGGAGGACAGC 720
*****

DSM7145      ACCTACATCACGGGTGAGACCCTGTATGTCGATGGTGGTCTGACGCTCTACGGCGATTTT 780
ATCC621H     ACCTACATCACGGGTGAGACCCTGTATGTCGATGGTGGTCTGACGCTCTACGGCGATTTT 780
*****

DSM7145      GAAAACAACCTGGTCCTCGTAA 801
ATCC621H     GAAAACAACCTGGTCCTCGTAA 801
*****
```

Partielles Nukleotidalignment (Clustal W) des *βgyr* (β -Untereinheit DNA Gyrase) von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H (*gox0004*).

```

DSM7145      -----TCTATCGCGCCAAGCGCGGT 20
ATCC621H     CTGATCGAGCAGGGCTATCTCTACATCGCCAGCCGCGCTCTATCGCGCCAAGCGCGGT 1680
              *****

DSM7145      CAGGAAGAGCGCTATCTCAAGGACGATGCCGCTCTTGAGCAGTATCTGCTGGACAAGGCA 80
ATCC621H     CAGGAAGAGCGCTATCTCAAGGACGATGCCGCTCTTGAGCAGTATCTGCTGGACAAGGCC 1740
              *****

DSM7145      CTGGCGAATGCCTCCCTGCGCTTTGCGGATGGCCGGGAAGTACAGGAGAGCCTCTGGCC 140
ATCC621H     CTGGCGAATGCCTCCCTGCGCTTTGCGGATGGCCGGGAAGTACAGGAGAGCCTCTGGCC 1800
              *****

DSM7145      GAGGAAGTCGCGTTCCCTTTGCGGCTGCCGCCGTCGCTTCAGAGCATTGCTTCCAAGGTT 200
ATCC621H     GAGGAAGTCGCGTTCCCTTTGCGGCTGCCGCCGTCGCTTCAGAGCATTGCTTCCAAGGTT 1860
              *****

DSM7145      CCTGTCTGGGTCATGGAGCAGGCCCATCTCGGGCGTCTTGACAGCGATATCGCTGTT 260
ATCC621H     CCCGCTCTGGGTCATGGAGCAGGCCCATCTCGGGTGTGCTAGATAGCGATATCGCTGTT 1920
              ** *****

DSM7145      GCGACATCGCGGATGGCCGAGTTCAGCAGCGTCTGGACGAGGCTTCGCTGCCCAACGAG 320
ATCC621H     GCGACATCGCGGATGGCCGAGTTCAGCAGCGTCTGGACGAGGCTTCGCTGCCCAACGAG 1980
              *****

DSM7145      CGCGGCTGGAAGGTCTCCATTTGCGAAACCGGTCTGGAATGTGCCCGTTCCGTCCGTGGC 380
ATCC621H     CGCGGCTGGAAGGTCTCCATTTGCGAAACCGGTCTGGAATGTGCCCGTTCCGTCCGTGGC 2040
              *****

DSM7145      GTAGGCGAAGTCTACCGGATCGAGCCTTCGCTCCTGCGCTCGGCGGAAGCACGCTGGCTG 440
ATCC621H     GTGGGTGAGGTCTACCGGATCGAGCCTTCGCTCCTGCGCTCGGCGGAAGCCCGCTGGCTG 2100
              ** * *****

DSM7145      GTGTCGGAATGGGAGCGTCTGGCCCGGATTTGCGAAAAGCCAGTACACTCACGCTCGAC 500
ATCC621H     GTATCGGAATGGGAGCGTCTGGCCCGGATTTGCGAAAAGCCAGTACACTCACGCTCGAC 2160
              ** *****

DSM7145      CCCACGGCTTATGAACTGTTCCGGTCCCGCAGCCGTCATGGAGCGCATCTGCTTCAGGGC 560
ATCC621H     CCCACGGCTTATGAACTGTTCCGGTCCCGCAGCCGTCATGGAGCGCATCTGCTTCAGGGC 2220
              *****

DSM7145      CGTCGCGGCTGACCATCAATCGCTTCAAGGGGCTGGGCGAAATGAACGACGAGCAGCTG 620
ATCC621H     CGTCGCGGCTGACCATCAACCGCTTCAAGGGGCTGGGCGAAATGAACGACGAGCAGCTG 2280
              *****

DSM7145      TGGCACACCACGCTCGATCCTTCGACCCGCACTCTGCTGCAGGTCGGGTCGGGGATGTG 680
ATCC621H     TGGCACACCACGCTCGATCCTTCGACCCGCACTCTGCTGCAGGTCGGGTCGGGGATGTG 2340
              *****

DSM7145      GAAGATGC----- 688
ATCC621H     GAAGATGCGGGACAGGTGTTCTCCACGCTGATGGGTGACGTCGTGGAGCCCGCAGGGAC 2400
              *****

DSM7145      -----
ATCC621H     TTCATTGTCGGTAATGCCCTGAAAGTCGCCAATCTTGACGTTAA 2445

```

Nukleotidalignment (Clustal W) des *g6pdh* (Glucose 6-Phosphat Dehydrogenase) von *G. oxydans* DSM 7145 und *G. oxydans* ATCC 621H (*gox0145*).

```

DSM7145      ATGGAACATTTCCAGCAGGTGCGAGCCTTTCGACTATGTCATCTTCGGTGCCACTGGCGAT 60
ATCC621H     ATGGAACATTTCCAGCAGGTGCGAGCCTTTCGACTATGTCATCTTCGGTGCCACTGGCGAT 60
*****

DSM7145      CTCACGATGCGCAAGCTGCTGCCCGCCTTACAACCGCCTTCGGATGGGCCAGATTCCG 120
ATCC621H     CTCACGATGCGCAAGCTGCTGCCCGCCTTACAACCGCCTTCGGATGGGCCAGATTCCG 120
*****

DSM7145      GATGATGCGTGCATCATCGGAGCCGCCCGTACGGAGCTGGACCGGGAGGCCTATGTCGCG 180
ATCC621H     GATGATGCGTGCATCATCGGAGCCGCCCGTACGGAGCTGGACCGGGAGGCCTATGTCGCG 180
*****

DSM7145      CGGGCCGAGACGCCCTTGAGCGGTTTCTTCCCTCAGACATCCTGGGCCCGGGGCTGGTC 240
ATCC621H     CGGGCCGAGACGCCCTTGAGCGGTTTCTTCCCTCAGACATCCTGGGCCCGGGGCTGGTC 240
*****

DSM7145      GAGCGTTTCTCGCCCGTCTCGATTACGTGACGCTGGACAGCAGCCGCGAGGGCCCGCAG 300
ATCC621H     GAGCGTTTCTCGCCCGTCTCGATTACGTGACGCTGGACAGCAGCCGCGAGGGCCCGCAG 300
*****

DSM7145      TGGGACGCCCTGAAGTCCCTGCTGGCCAAGGCACAGCCTGACCGGGTGCAGCGTCTATTAT 360
ATCC621H     TGGGACGCCCTGAAGTCCCTGCTGGCCAAGGCACAGCCTGACCGGGTGCAGCGTCTATTAT 360
*****

DSM7145      TTCGAACCGCACCAGCAGCTTTACGGCAGCATCTGCGAGAACCTGAACCGTACGAGCTG 420
ATCC621H     TTCGAACCGCACCAGCAGCTTTACGGCAGCATCTGCGAGAACCTGAACCGTACGAGCTG 420
*****

DSM7145      ATCACCCACAGTCGCGGGTGTCTCGAAAAGCCGATCGGTACGAACATGGCCACCGCC 480
ATCC621H     ATCACCCACAGTCGCGGGTGTCTCGAAAAGCCGATCGGTACGAACATGGCCACCGCC 480
*****

DSM7145      ACCGCCATCAATGACGGGGTCCGGCAGTATTTCCGAAAAGCAGATCTACCGGATCGAT 540
ATCC621H     ACCGCCATCAATGACGGGGTCCGGCAGTATTTCCGAAAAGCAGATCTACCGGATCGAT 540
*****

DSM7145      CATTATCTCGGAAAGAGACGGTCCAGAAGCTTTCGCGCTGCGTFTTGCAAACCCGCTC 600
ATCC621H     CATTATCTCGGAAAGAGACGGTCCAGAAGCTTTCGCGCTGCGTFTTGCAAACCCGCTC 600
*****

DSM7145      ATGAACGCTGCCTGGTCCGGCAGCATATCGAGAGCGTGCAGATCACGGCGGTTCGAGACC 660
ATCC621H     ATGAACGCTGCCTGGTCCGGCAGCATATCGAGAGCGTGCAGATCACGGCGGTTCGAGACC 660
*****

DSM7145      GTGGCGCTCGAAGTCTGCGGCCCTATTACGACACGTCTGGCGCGCTTCGCGACATGATC 720
ATCC621H     GTGGCGCTCGAAGTCTGCGGCCCTATTACGACACGTCTGGCGCGCTTCGCGACATGATC 720
*****

DSM7145      CAGAACCACCTGCTCCAGTACTGTGTCTGGTTGCGATGGAAGCCCCGATTCCTTTGAG 780
ATCC621H     CAGAACCACCTGCTCCAGTACTGTGTCTGGTTGCGATGGAAGCCCCGATTCCTTTGAG 780
*****

DSM7145      GCCGATGCCGTCCGCAACGCCAACTGGCCGTCCTGAACGCCCTGCGCCCATCACGGAT 840
ATCC621H     GCCGATGCCGTCCGCAACGCCAACTGGCCGTCCTGAACGCCCTGCGCCCATCACGGAT 840
*****

DSM7145      GCCACAGCCGCCACCGAGACGGTGCAGCGCAGTACACGGCAGGCGTGGTTCGATGGCCGAG 900
ATCC621H     GCCACAGCCGCCACCGAGACGGTGCAGCGCAGTACACGGCAGGCGTGGTTCGATGGCCGAG 900
*****

DSM7145      AATGTTCCGGGTTATCTTGAAGAGCTCGGCAAGCCAGCGCAGGAAACCTATGCGCGCA 960
ATCC621H     AATGTTCCGGGTTATCTTGAAGAGCTCGGCAAGCCAGCGCAGGAAACCTATGCGCGCA 960
*****

DSM7145      ATCCGCGCCTGGGTGGACACGCCCGCTGGAAGAAGCTGCGGTTCTACATCCGCACGGCC 1020
ATCC621H     ATCCGCGCCTGGGTGGACACGCCCGCTGGAAGAAGCTGCGGTTCTACATCCGCACGGCC 1020
*****

DSM7145      AAGCGGTCCGGCAAGAAGTCAAGGTCAGCGAGATCGTCGTGACGTTCCGCCCGGCTGCGACCACC 1080
ATCC621H     AAGCGGTCCGGCAAGAAGTCAAGGTCAGCGAGATCGTCGTGACGTTCCGCCCGGCTGCGACCACC 1080
*****

DSM7145      ATGTTCCGGCCACCCCGCCAGCAACAGGCTGGTCTGCGCATCCAGCCCAACGAAGGC 1140
ATCC621H     ATGTTCCGGCCACCCCGCCAGCAACAGGCTGGTCTGCGCATCCAGCCCAACGAAGGC 1140
*****

DSM7145      GTGGACCTGCGTCTGAACGTCAAGAACCCTGCGCTGGATGTTCAACCTGCGGACGGCG 1200
ATCC621H     GTGGACCTGCGTCTGAACGTCAAGAACCCTGCGCTGGATGTTCAACCTGCGGACGGCG 1200
*****

DSM7145      GATCTTGATACCTCCATCCGATGGAAGGCGCCCTGCCCTTCCCGATTCTCATGAGCGG 1260
ATCC621H     GATCTTGATACCTCCATCCGATGGAAGGCGCCCTGCCCTTCCCGATTCTCATGAGCGG 1260
*****

DSM7145      CTTCTTCTGGATGCCGTGCGGGGTGATCCGGTACTGTTTCAACCTGCGGACGGGTCGAG 1320
ATCC621H     CTTCTTCTGGATGCCGTGCGGGGTGATCCGGTACTGTTTCAACCTGCGGACGGGTCGAG 1320
*****

DSM7145      GCCGATGGCGCTGGTTCGAGCCCATCCTTGAGGCTGGAACATGACAAGGCGCCCATG 1380
ATCC621H     GCCGATGGCGCTGGTTCGAGCCCATCCTTGAGGCTGGAACATGACAAGGCGCCCATG 1380
*****

DSM7145      CAGACCTACAGTGCAGGTTCTTATGGCCGGAACAGGCAAC----- 1440
ATCC621H     CAGACCTACAGTGCAGGTTCTTATGGCCGGAACAGGCAACACAACCTGCTCGCCAGCCAT 1440
*****

DSM7145      ----- 1469
ATCC621H     GCGCACCTGGCATGAAGCTCGGAGTA 1469

```

Übersicht über die verwendeten Internetangebote

URL	Anbieter	Verwendung
www.ncbi.nlm.nih.gov/	National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A	Literaturrecherche Sequenzrecherche
highwire.stanford.edu	Stanford University Library Palo Alto, U.S.A	Literaturrecherche
gl3-ergo.migen.bio.uni-goettingen.de	Göttingen Genomics Laboratory Göttingen, Deutschland	Sequenzrecherche
www.ebi.ac.uk/clustalw	European Bioinformatics Institute Cambridge, U.K.	Erstellen von Sequenzalignments
http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html	Berkeley Drosophila Genome Projekt Berkeley, U.S.A	Vorhersage von Promotoren
http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Center for Biological Sequence Analysis Lynbgy, Dänemark	Vorhersage von Transmembranhelices
http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/	European Bioinformatics Institute Cambridge, U.K.	Analyse von Proteinen

Danksagung

Prof. Dr. W. Liebl danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die Promotion in Göttingen beenden konnte.

Dr. Armin Ehrenreich sei für seine Diskussionsbereitschaft bei den freitäglichen Besprechungen und die rasche Durchsicht des Manuskriptes gedankt.

PD. Dr. Rolf Daniel danke ich für Übernahme des Korreferates und dafür, dass er in den letzten Monaten Laborraum für die „Hiergebliebenen“ zur Verfügung gestellt hat.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Feussner, im besonderen Frau Dr. K. Feussner, danke ich für die Zusammenarbeit bei den GC- und LC-MS Analysen.

Ein besonderer Dank gebührt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Liebl, Daniel und Ehrenreich. Dies sind Angel, Andrea, Sonja, Christel, Meike, Silja, Daniela, Katharina, Jessika, Juli, Jennifer, Caro, Bernd, Boris, Dominik, Birgit, Carola, Christiane, Marco, Christina, Melanie, Micheal, Michael (from the Phillipines), Anja, Desirée, Claudia, Markus, Heiko, Julia, Carola, Steffi, Jörg und Milad (ich hoffe, dass ich niemand vergessen habe) für die äußerst nette Arbeitsatmosphäre.

An Angel, Andrea, Silja und Michael geht ein besonderer Gruß für das jahrelange Teilen des gemeinsamen Büros. Markus danke ich für seine tolle Mitarbeit am *Gluconobacter* Projekt als Diplomand.

Christina und Marco danke ich für die geduldige Einweisung in der Kunst der RNA-Präparation und HPLC-Analyse.

Unserer „guten Fee“ Mechthild danke ich für die Organisation des Laboralltags und die vielen Tipps und Tricks rund um das Labor.

Judith und meinem Großvater möchte ich sehr herzlich für das Korrekturlesen des Manuskriptes dieser Arbeit danken.

Meinen langjährigen Freunden Kathrin & Alex, Claudia & Thomas, Claudine & Sebastian und Raphael danke ich für ihre Freundschaft und dass sie immer für Abwechslung außerhalb des Labors gesorgt haben.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung, die das Studium und diese Promotion erst ermöglicht hat. Tausend Dank auch für die ideelle Unterstützung, die die Promotion nun zu einem Ende gebracht hat.

Der wichtigsten Person in meinem Leben, Judith, danke ich für die unendliche Geduld und den Freiraum, den sie mir in letzten Jahren entgegengebracht hat. Es ist geschafft und ich freue auf alles, was mit Dir noch kommen mag.

Lebenslauf

20.04.1980	Geburt in Göttingen
1986 - 1988	Besuch der Grundschule, Bovenden/Lenglern
1988 - 1990	Besuch der Grund- und Hauptschule, Oldenstadt
1990 - 1992	Besuch der Orientierungsstufe Hermann Löns, Uelzen
1992 - 1994	Besuch des Winckelmann-Gymnasiums, Stendal
1994 – 1999	Besuch des Lessing-Gymnasiums, Uelzen
Juli 1999	Abitur
Juli 1999 - April 2000	Wehrdienst
September 2000	Immatrikulation an der University of Guelph, Ontario, Canada, Bachelor of Science, Honours, Major: Microbiology
Mai 2001	Immatrikulation an der Georg-August Universität Göttingen im Fach Biologie
April/Oktober 2002	Vordiplom in den Fächern Anorganische Chemie, Physikalische Chemie, Zoologie und Mikrobiologie
Juli 2004	Diplom in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Organischer Chemie
August 2004 – Juli 2005	Experimentelle Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Liebl mit dem Titel: „Untersuchung von zuckerabbauenden Enzymen des Archaeons <i>Picrophilus torridus</i> durch rekombinante Herstellung in <i>Escherichia coli</i> und biochemische Charakterisierung“
August 2005	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation