Untersuchungen zur Physiologie des Essigsäurebakteriums
***Gluconobacter oxydans* 621H**

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

vorgelegt von
Marc Hoffmeister
aus Göttingen

Göttingen, 2006

D7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Korreferent: Prof. Dr. R. Schmitz-Streit

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2006

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VII

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Organismen	6
2.2.	Verwendete Plasmide	6
2.3.	Nährmedien, Puffer und Standardlösungen	7
2.3.1.	Nährmedium für <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	7
2.3.2.	Vollmedium mit Glucose, Mannitol, Sorbitol oder Gluconat	7
2.3.3.	Definiertes Minimalmedium	7
2.3.4.	Spurenelementlösung SL9 (TSCHECH und PFENNIG, 1984; 1000fach)	9
2.3.5.	Vitaminlösung nach BALCH <i>et al.</i> , 1979 (5fach)	9
2.3.6.	Aminosäuremix	10
2.3.7.	Kaliumphosphatpuffer	11
2.3.8.	NB – Medium (Nutrient broth)	12
2.3.9.	LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)	12
2.3.10.	Phosphat gepufferte Saline (PBS)	12
2.3.11.	Medienzusätze	13
2.4.	Zellanzucht	13
2.4.1.	Anzucht von <i>Gluconobacter oxydans</i> aus der Stammkultur	13
2.4.2.	Bestimmung der optischen Dichte	13
2.4.3.	Reinheitskontrollen	14
2.4.4.	Stammhaltung	14
2.4.5.	Zellanzucht zur Bestimmung von Wachstumsparametern	14
2.4.6.	Ermittlung der maximalen Wachstumsrate $\mu_{\max}$	15
2.4.7.	Zellanzucht im Chemostat für die Transkriptionsanalyse, protein- biochemische Untersuchungen und für die Elektronenmikroskopie	16
2.5.	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	19
2.5.1.	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	19

2.5.2.	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	19
2.5.2.1.	Phenol/Chloroform-Extraktion	19
2.5.2.2.	Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol	19
2.5.2.3.	Fällung von DNA mit Isopropanol	20
2.5.2.4.	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA	20
2.5.3.	Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	21
2.5.3.1.	Agarosegelelektrophorese	21
2.5.3.2.	Tris-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	23
2.5.3.3.	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	23
2.6.	Herstellung eines Gesamtgenom DNA-Microarrays von	
	<i>G. oxydans</i> 621H	23
2.6.1.	Ableiten der Primer zur Microarray-Chip-Herstellung	24
2.6.2.	Vorbereitung der genspezifischen Primer	24
2.6.3.	Verdünnung der Primer für nachfolgende PCR-Reaktionen	25
2.6.4.	Universal-Primer für <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	25
2.6.5.	Zusammenstellung und Verdünnung der Plasmide aus der <i>shotgun-library</i> des Genomsequenzierungsprojektes zur Chip-Herstellung	25
2.6.6.	Reaktionspuffer S (10x)	26
2.6.7.	PCR zur DNA-Amplifikation für die Microarray-Chip-Generierung	26
2.6.8.	Aufreinigung der PCR-Produkte	28
2.6.9.	DNA-Amplifikation mit zwei ORF-spezifischen Primern	28
2.6.9.1.	Präparation genomischer DNA	29
2.6.10.	<i>In silico</i> -Kontrolle der <i>probe</i> -Spezifität	30
2.6.11.	Spotten der Chips und UV-Immobilisierung der DNA	30
2.6.12.	Analyse von DNA-Sequenzdaten	31
2.7.	Techniken für das Arbeiten mit RNA	31
2.7.1.	Vorbereiten von Geräten und Lösungen	31
2.7.2.	Zellaufschluss von <i>G. oxydans</i> mit dem Dismembrator	32
2.7.3.	Isolierung der RNA	33
2.7.4.	DNase-Verdau und Qualitätskontrolle der präparierten RNA	33
2.7.5.	PCR zur Kontrolle des DNase-Verdaus bei der RNA-Präparation	33
2.7.6.	PCR mittels reverser Transkription von RNA (RT-PCR)	34
2.7.7.	Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung von RNA	35
2.7.8.	Bestimmung der RNA-Konzentration	36

2.8.	Markieren der mRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen,	
	Hybridisieren und Chip-Auswertung	36
2.8.1.	Markierung der RNA mit Cy3- oder Cy5-Fluoreszenzfarbstoff	37
2.8.2.	„Wavelength scan“ zum Überprüfen der Markierungsreaktion	39
2.8.3.	Hybridisierung der DNA-Microarrays mit markierter <i>target</i> -cDNA	40
2.8.4.	Quantifizierung der Arraydaten mittels „GenePix Pro“-Software	41
2.8.5.	Analyse der Transkriptionsdaten	44
2.9.	Quantitative <i>real-time</i> RT PCR	45
2.10.	Proteinpräparation aus <i>G. oxydans</i> und Proteinfractionierung	47
2.10.1.	Zellanzucht und Ernte für die Proteinaufreinigung oder biochemische Untersuchungen	47
2.10.2.	Zellaufschluss zur Proteinanreicherung oder für protein- biochemische Untersuchungen an <i>G. oxydans</i> 621H	48
2.10.3.	Trennung von Cytoplasma und Membranen	48
2.10.4.	Solubilisieren der Membranproteine	49
2.11.	Säulenchromatographische Reinigung einer membrane- bundenen Dehydrogenase mit oxidativer Aktivität gegenüber Piperidin-Derivaten	50
2.11.1.	Proteinreinigung mittels Flüssigchromatographie	51
2.11.1.1.	Detergenzhaltige Säulenpuffer (Kaliumphosphatpuffer oder MOPS) ...	51
2.11.1.2.	Reinigung von Membranproteinen an einer Q-Sepharose HP-Matrix ...	52
2.11.1.3.	Ionenaustauschchromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)	53
2.11.1.4.	Proteinfractionierung am starken Kationenaustauscher SP-Sepharose ..	53
2.11.1.5.	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose HP	54
2.11.1.6.	Affinitätschromatographie an blauer Sepharose, Reactive Red und Reactive Green	54
2.11.1.7.	Kombinierte Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie am Toyopearl AF-Blue HC 650 M-Säulenmaterial	56
2.12.	Standardtechniken zum Arbeiten mit Proteinen	56
2.12.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.12.2.	Einengen und Entsalzen von Proteinlösungen mittels Zentrifugen-Konzentrationsröhrchen	57
2.12.3.	Bestimmung der molekularen Masse und der Reinheit von Proteinen ..	58
2.12.3.1.	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58

2.12.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
2.12.4.	Silberfärbung der Polyacrylamidgele (BLUM <i>et al.</i> , 1987; modif.)	63
2.13.	Massenspektrometrische Proteinidentifikation	65
2.14.	Enzymatische Aktivitätsbestimmungen	65
2.14.1.	Enzymtest für membrangebundene Dehydrogenasen nach SHINAGAWA <i>et al.</i> (1976, mod.)	65
2.14.2.	Aldolase Assay	66
2.15.	Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen	67
2.15.1.	Lichtmikroskopie und Vorbereitung der Zellen für die Elektronen- mikroskopie durch Agareinbettung	67
2.15.2.	Entwässerung und Kunstharzeinbettung in Agar eingeschlossener Zellen	68
2.15.3.	Anfertigung von Mikrotomschnitten für die Elektronenmikroskopie ...	70
2.15.3.1.	Trimmen der Kunstharzkapsel für die Ultramikrotomie	70
2.15.3.2.	Herstellung von Messern und Trögen für die Ultramikrotomie	70
2.15.3.3.	Aufnahme der Schnitte auf beschichtete Objektträger-Netze (Grids) ...	71
2.15.3.4.	Kontrastieren der Zellschnitte mit PWS (3 %)	71
2.16.	Chemikalien, Biochemikalien und Gase	72
3.	Experimente und Ergebnisse	75
3.1.	Rückblick auf vorangegangene Arbeiten zur Genomsequenzierung	77
3.2.	Konstruktion des Gesamt-Genom DNA-Microarrays von <i>G. oxydans</i> 621H für die Transkriptionsanalyse	79
3.2.1.	Amplifikation der einzelnen ORFs des <i>G. oxydans</i> -Genoms, <i>in silico</i> -Kontrolle der PCR-Produkte und Erstellen des Genomchips ..	79
3.3.	Wachstum von <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H in kontinuierlicher Kultur	81
3.3.1.	Ermittlung der maximalen Wachstumsraten	82
3.3.2.	Limitierung des Wachstums durch C- und N-Quelle im Chemostat	84
3.4.	Transkriptionsanalyse von <i>G. oxydans</i> 621H	85
3.4.1.	Genexpression bei Wachstum mit Glucose im Vergleich zum Wachstum mit Mannitol	88
3.4.1.1.	Expression der Gene von Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen	89
3.4.1.2.	Expression der Gene des zentralen C-Stoffwechsels	98

3.4.1.3.	Expression der Gene der Atmungsketten-Komponenten	102
3.4.1.4.	Zusammenstellung sonstiger auffällig regulierter Gene	106
3.4.2.	Genexpression bei Wachstum mit Glucose im Vergleich zum Wachstum mit Sorbitol	107
3.4.2.1.	Expression der Gene von Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen	107
3.4.2.2.	Expression der Gene des cytoplasmatischen C-Stoffwechsels	112
3.4.2.3.	Expression der Gene der Atmungsketten-Komponenten	113
3.4.2.4.	Zusammenstellung sonstiger auffällig regulierter Gene	115
3.4.3.	Vergleich der Transkriptionsregulation zwischen Batch- und Chemostat-gewachsenen Kulturen	116
3.4.4.	Vergleichende Transkriptionsanalyse nach Wachstum bei pH- Werten von 3,5 und 5,5	122
3.4.5.	Transkriptionsanalyse nach Wachstum bei verschiedenen Wachstumsraten ($\mu = 0,26, 0,16, 0,05 \cdot \text{h}^{-1}$)	130
3.4.6.	Dokumentation einer veränderten Zellmorphologie bei einer Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$	138
3.4.7.	Vergleichende Transkriptionsanalyse nach Wachstum bei zwei verschiedenen pO_2 -Werten	142
3.4.8.	Untersuchung von Fructose-Bisphosphat-Aldolase-Isoenzymen	148
3.4.9.	Zusammenfassung der Microarray-basierten Transkriptionsanalysen ..	151
3.5.	Quantitative <i>real-time</i> RT PCR-Experimente zum Verifizieren der mittels Transkriptionsanalysen gefundenen Ergebnisse	153
3.5.1.	Untersuchung der Genexpression nach Wachstum auf Vollmedium in Batch-Kultur mit der quantitativen <i>real-time</i> RT PCR	154
3.5.2.	Vergleich der Genexpression zwischen Batch- und Chemostat- gewachsenen Kulturen	158
3.5.3.	Untersuchung der Genexpression bei Wachstum auf Minimalmedium	160
3.5.3.1.	Wachstum von <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H auf Minimalmedium	160
3.5.3.2.	Quantitative <i>real-time</i> RT PCR von Minimalmedium-Kulturen	161
3.5.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>real-time</i> RT PCR-Experimente	163
3.6.	Untersuchung ausgewählter Enzymaktivitäten von <i>Gluconobacter</i> <i>oxydans</i> 621H	163
3.7.	Untersuchung einer 1-Carbobenzoxo-2,6-bis-(hydroxymethyl)- piperidin oxidierenden Aktivität aus <i>G. oxydans</i>	167

3.7.1.	Lokalisierung der Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-oxidierenden Aktivität in <i>G. oxydans</i>	168
3.7.2.	pH-Optimum der Bis-(hydroxymethyl)-piperidin Dehydrogenase	169
3.7.3.	Aufreinigung einer Piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität	171
3.7.3.1.	Anionen-Austauschchromatographie mittels Q-Sepharose HP (QSHP)	171
3.7.4.	Silberfärbung des QSHP-Eluats mit Piperidin-Derivat oxidierender Aktivität	173
3.7.5.	Aufklärung der Proteinidentität durch nano-ESI-MS/MS	176
3.7.6.	Messung einer Ethanol-oxidierenden Aktivität	179
3.7.7.	Zusammenfassung der Untersuchung einer Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität	180
4.	Diskussion	183
4.1.	Allgemeine Eigenschaften von <i>G. oxydans</i> 621H	183
4.2.	Regulation des Zentralstoffwechsels	184
4.3.	Einfluss der Wachstumsrate auf die Ausbildung Intracytoplasmatischer Membranen	191
4.4.	Betrachtung der Transkriptionsregulation von Komponenten des Energiestoffwechsels und der Kofaktor-Biogenese	193
4.5.	Analyse der Transkriptionsregulation von Dehydrogenasen	197
4.6.	Verwendung von <i>G. oxydans</i> in der Biotechnologie	202
4.6.1.	Herstellung von Vitamin C	203
4.6.2.	Produktion von Dihydroxyaceton	204
4.6.3.	Herstellung des Antidiabetikums Miglitol	204
4.7.	Analyse des Oxidationspotentials von <i>G. oxydans</i> 621H	205
4.8.	Ausblick	210
5.	Zusammenfassung	212
6.	Literaturverzeichnis	214

Anhang Liste der Gene auf dem konstruierten Microarray und deren Annotation

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Acetobacter</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA
ATP	Adenosintriphosphat
AU	absorption units (relative Absorptionseinheiten)
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cef	Cefoxitin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylamino]1-Propansulfonsäure
cm	Zentimeter
CV	Column volume (Säulenvolumen bei der FPLC)
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
Δ	Delta
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DSM	= DSMZ; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ε	Extinktionskoeffizient
Ed.	Editor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop(ie)
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
F	Farad
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
<i>G.</i>	<i>Gluconobacter</i>
ggf.	gegebenenfalls
x g	x-fache Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAP	Hydroxylapatit
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
HMW	High Molecular Weight (Größenstandard für Nativ-PAGE)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hrsg.	Herausgeber
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
IFO	Institute For Fermentation, Osaka, Japan

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Joule
k-	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
konz.	konzentriert
KPP	Kaliumphosphatpuffer
λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LMW	Low Molecular Weight (Größenstandard für SDS-PAGE)
log	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
m-	milli
M	molar
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid
min	Minute
mm	Millimeter (10^{-3} m)
mod.	modifiziert
Mpa	Megapascal
Mr	relative molare Masse
μ -	mikro (10^{-6})
n-	nano (10^{-9})
nA	Nanoampere
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NB	Nutrient broth
NCIMB	= NCIB; National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, Aberdeen, Scotland, United Kingdom
neg.	negativ
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
Ω	Ohm (Widerstand)
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
ox.	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Probenauftragspuffer für die SDS-PAGE
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PPM	Prestained Protein Marker
PQQ	Pyrroloquinoline quinone
psig	Pounds-force per square inch gauge = 6894,76 Pa; relativer Druck
QAE	quartäres Aminoethyl
QRT-PCR	quantitative <i>real time</i> Reverse Transkription PCR
QSHP	Q-Sepharose HP
red.	reduziert
resp.	respektive
R _f	elektrophoretische Mobilität

rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq.	Sequenz
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
ssu-	small subunit (kleine Untereinheit)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T _m	DNA-Schmelztemperatur
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität (1 U = 1 µmol Substratumsatz/min)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	Vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Einbuchstabencode für Aminosäuren

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

1. Einleitung

Bereits seit Jahrtausenden stehen Mikroorganismen bei der Herstellung und Veredelung von Lebens- und Genussmitteln im Dienste des Menschen. So schrieb Arthur Harden 1911 in der Veröffentlichung „Alcoholic Fermentation“: „*History finds man in the possession of alcoholic liquors*“. GREENSHIELDS (1978) schreibt dazu, der Alkohol sei bekanntlich eines der wichtigsten Substrate für die Essigsäurebakterien, so dass die Herstellung von Essig ebenfalls zu den ältesten von der Menschheit durchgeführten Fermentationen gehört. Nach einem Vorschlag von YAMADA *et al.* (1996) sollen aufgrund von 16S-rRNA-Analysen unter anderem die Gattungen *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconoacetobacter* und *Gluconobacter* die Familie der *Acetobacteriaceae* bilden. Zu dieser Organismengruppe zählt auch das Bakterium *Gluconobacter oxydans* 621H, welches zuvor als *Acetobacter suboxydans* klassifiziert wurde (BUCHANAN and GIBBONS, 1974). Dieses Essigsäurebakterium ist Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Taxonomisch gehört es zu den α -Proteobakterien (DE LEY *et al.*, 1984; SIEVERS *et al.*, 1994), ist Gram-negativ, ellipsoidal bis stäbchenförmig und zeichnet sich durch einen obligat aeroben Metabolismus aus. Optimales Wachstum erfolgt im Temperaturbereich von 25 bis 30 °C und im pH-Bereich von 5,5 bis 6,0 in zuckerreichen Habitaten. So ist *G. oxydans* z.B. in Blütennektar, auf Früchten, aber auch in Fruchtsäften oder schwach alkoholischen Getränken zu finden. Dadurch kann es z.B. bei der Weinherstellung in den ersten Tagen der Traubenmostvergärung, in denen die Hefen ihre maximale Aktivität noch nicht entwickelt haben, zur Produktion unerwünschter und qualitätsmindernder Säuren kommen (DRYSDALE und FLEET, 1988; GONZÁLES *et al.*, 2004). Das gerade heute ein großes Interesse an diesem Mikroorganismus besteht, beruht auf einer Reihe von Eigenschaften, die für biotechnologische Produktionsprozesse relevant sind. So werden z.B. angebotene Substrate nur unvollständig oxidiert. Daran beteiligt ist ein periplasmatisches Oxidationssystem, über das Gram-negative Bakterien verfügen können (YAMADA *et al.*, 2003). *G. oxydans* besitzt eine Vielzahl membrangebundener Enzyme, die mit ihrem aktiven Zentrum in den periplasmatischen Raum hineinragen, und die an die Atmungskette gekoppelt vorliegen. Ein zweiter Grund für die unvollständige Oxidation der Substrate ist im Zentralstoffwechsel zu finden. Diesem fehlen an verschiedenen Stellen Schlüsselenzyme, wie beispielsweise die 6-Phosphofructokinase der Glykolyse

(STOUTHAMER, 1959; PRUST 2004) oder die Succinat-Dehydrogenase des Zitronensäurezyklus (KITOS *et al.*, 1958; PRUST, 2004). Eine vollständige Oxidation der Substrate zu CO₂ und Wasser findet deshalb nicht statt. Die Zelle muss jedoch in der Lage sein, ihrem Anabolismus Intermediärmetabolite zur Verfügung zu stellen. *G. oxydans* besitzt dazu die Möglichkeit, an der Membran entstandene Oxidationsprodukte oder die Substrate selbst aufzunehmen, und intrazellulär mit einem Set löslicher Dehydrogenasen umzusetzen. Hierbei werden vermutlich Vorläufer für den Zentralmetabolismus gebildet. Daneben kann phosphoryliertes Substrat aber auch in den Zentralstoffwechsel eingeschleust werden. Als wichtigste Quelle für zentrale Metabolite und NADPH gilt der Pentosephosphatweg. Biochemische Messungen von KOVACHEVICH und WOOD (1955) zeigten, dass auch die Gene für Enzyme des KDPG-Wegs in *G. oxydans* 621H vorhanden sind, was durch die Genomsequenzierung durch PRUST (2004) bestätigt wurde. Wie diese Stoffwechselwege bei veränderten Wachstumsbedingungen reguliert werden, war zu diesem Zeitpunkt hingegen nicht bekannt.

Aufgrund der Vielzahl von Dehydrogenasen ist *Gluconobacter* befähigt ein breites Spektrum organischer Substrate umzusetzen, wozu verschiedene Zucker, Zuckeralkohole (Polyole) oder Zuckersäuren gehören (MATSUSHITA *et al.*; 2003). Für biotechnologische Anwendungen sind insbesondere die vielen membrangebundenen Enzyme von Interesse. Deren aktives Zentrum liegt im periplasmatischen Raum und ermöglicht so die direkte Oxidation selbst ungewöhnlicher Substrate ohne vorhergehenden Transport. Diese besondere Enzymtopologie ist auch Grund dafür, dass das Bakterium ein Membranpotential aufbauen kann ohne dafür Substrate ins Cytoplasma transportieren zu müssen. Zudem befähigt der Wegfall langsamer Transportprozesse unvollständige Oxidierer wie *G. oxydans* dazu, häufig verfügbare und deshalb auch von vielen anderen Mikroorganismen genutzte C-Quellen sehr schnell umzusetzen. Ein Beispiel hierfür ist die Oxidation von Glucose zur Zuckersäure Gluconat. Dabei wird zwar relativ wenig Energie gewonnen, doch kann nachfolgend das Gluconat weiter zu Ketogluconaten umgesetzt werden, wobei wiederum Energie für Lebensprozesse erhalten wird. Die bei der Oxidation freigesetzten Elektronen werden über eine protonentranslozierende terminale Oxidase vom bo₃-Typ auf Sauerstoff übertragen. Vermutlich wegen einer geringen Kopplungseffizienz kommt es hierbei nur zu einer geringen Biomasseproduktion (DEPPENMEIER *et al.*, 2002). Zudem existiert eine terminale Oxidase vom bd-Typ, die aber noch nicht biochemisch charakterisiert

worden ist. Durch den schnellen Substratumsatz zu Zucker- und Ketosäuren wird konkurrierenden Mikroorganismen Nährstoff entzogen. Zugleich sinkt der pH-Wert im Medium, was die Lebensbedingungen weniger pH-resistenter Mikroorganismen verschlechtert. Für *G. oxydans* hingegen ist ein signifikantes Wachstum auch bei tiefen pH-Werten beschrieben (DEPPENMEIER *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2001; MACAULEY *et al.*, 2001). Neben den sich daraus in der Natur ergebenden Vorteilen für dieses Bakterium, lassen sich aus der unvollständigen Oxidation im Periplasma auch Vorteile für industrielle Anwendungen ableiten. Einige organische Moleküle, für die z.B. aufgrund ihrer Komplexität oder ungewöhnlichen Struktur kein Aufnahmesystem existiert, die aber über dehydrogenierbare Seitengruppen verfügen, können von periplasmatisch-aktiven Enzymen stereo- und regiospezifisch zu industriell interessanten Produkten umgesetzt werden. Bei der chemischen Synthese hingegen wären dazu oft aufwendige und teure Schutzgruppenoperationen notwendig. Die nach Biokonversion mit *Gluconobacter oxydans* anfallenden Produkte können direkt aus dem Kulturmedium extrahiert werden, wobei aufwendige und somit teure Zellaufschluss- und Produktreinigungsschritte weitgehend entfallen. Sauerstoff als der terminale Elektronenakzeptor dieser Reaktionen ist leicht verfügbar und kostengünstig. Beispiele für den derzeitigen biotechnologischen Einsatz von *G. oxydans* sind die Herstellung von L-Sorbose für die Vitamin C-Produktion, Dihydroxyaceton als Bestandteil in Selbstbräunern, Gluconat als Metallionen-Chelator oder von 1-Desoxynojirimycin als Ausgangssubstanz für das Antidiabetikum Miglitol. Die auf einer Biokonversion beruhenden Produktionsvorteile gegenüber konventionellen physiko-chemischen Herstellungsverfahren erklären das Interesse, das heute am vielseitig einsetzbaren Bakterium *G. oxydans* besteht. Von entscheidender Bedeutung war die Entschlüsselung der Genomsequenz, mit der unter anderem das zu erwartende Potential dieses Bakteriums für die industrielle Verwendung abgeschätzt werden sollte. Dieses Sequenzier-Projekt wurde am Institut für Mikrobiologie und Genetik in Göttingen realisiert. Wie die 2004 entschlüsselte Genomsequenz von *G. oxydans* 621H zeigt, werden in 2,9 Mbp 2664 ORFs kodiert (PRUST, 2004, PRUST *et al.*, 2005). Etwa ein Sechstel der Gene scheinen für *G. oxydans* spezifisch zu sein, wobei eine Vielzahl noch nicht charakterisierter Dehydrogenasen bzw. Oxidoreduktasen vorliegt (McNEIL und HARVEY, 2005). Das lässt vermuten, dass *G. oxydans* ein großes Potential bislang unbekannter Fähigkeiten zur Substratoxidation aufweist. Anhand der Genomsequenz ist eine theoretische Rekonstruktion der Enzymausstattung des Bakteriums möglich. Ob

und unter welchen Bedingungen diese Gene jedoch exprimiert werden, ist der Sequenz nicht zu entnehmen und war auch nur in Einzelfällen bekannt. Um die Wirtschaftlichkeit von Biokonversionen im industriellen Maßstab steigern zu können, ist es essentiell, Aussagen über die Anwesenheit und Aktivität der für die Produktion benötigten Dehydrogenasen unter definierten Wachstumsbedingungen treffen zu können. Ebenso vorteilhaft wäre es, die Regulation der Enzyme auf genetischer Ebene zu verstehen um gegebenenfalls gezielt Einfluss auf den Metabolismus nehmen zu können. Somit ließen sich Produktionsprozesse dahingehend optimieren, dass eine weitere Verstoffwechselung eines gewünschten Produktes oder die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte vermieden werden können. Zum Zweck des besseren Verständnisses der Regulation des Stoffwechsels von *G. oxydans* wurde in dieser Arbeit, basierend auf der Genomsequenz, ein DNA-Microarray konstruiert. Microarrays sind geeignet, in einem einzigen Experiment Genexpressionsmuster zehntausender Gene zu untersuchen (DUGGAN *et al.*, 1999). In der Literatur finden sich Angaben, wonach bis zu 50000 DNA-Fragmente auf einen Glasobjektträger aufgebracht werden können (DeRISI *et al.*, 1996; SHALON *et al.*, 1996). Diese als *probes* bezeichneten immobilisierten DNA-Fragmente werden mit sogenannter *target* cDNA hybridisiert. Beim Vergleich von Wachstumsbedingungen auf Ebene der Transkription wurden zwei *target* RNA-Populationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (SHENA *et al.*, 1995). Für solche Formen der Untersuchung großer Mengen genetischer Information wurde der Begriff *functional genomics* geprägt (VELCULESCU *et al.*, 1997). Die Transkriptionsanalyse mit Hilfe eines Gesamtgenom-Microarrays ermöglicht Momentaufnahmen der gesamten genetischen Aktivität des Bakteriums unter gegebenen Bedingungen zum Zeitpunkt der Zellernte. Somit ist es im Gegensatz zur Sequenzanalyse möglich, das Transkriptom der Zelle beim Wachstum unter veränderten Bedingungen wie verschiedene C-Quellen, pH-Werte, pO₂-Werte oder Wachstumsraten mit Standardbedingungen zu vergleichen. In der Literatur gibt es z.B. Hinweise auf eine Verschiebung des Glucoseumsatzes vom Pentosephosphatweg hin zur direkten Oxidation durch membranständige Dehydrogenasen nach Erhöhung der Durchflussrate von Medium im Chemostat (OLIJVE und KOK, 1979b). Diese Untersuchungen wurden von den Autoren biochemisch durchgeführt. Eine Beleuchtung der zugrundeliegenden Genexpression war bislang nicht beschrieben und fand Eingang in die Experimente dieser Arbeit. Die Transkriptionsanalyse mittels Microarray eignet sich insbesondere für die Untersuchung einer großen Anzahl von Genen. Zur Verifizierung einiger DNA-

Microarray basierter Ergebnisse wurde als zweite Methode die *real-time*-RT-PCR eingesetzt. Da es sich hierbei um eine amplifizierende Methode handelt, ist deren Sensitivität höher als die der DNA-Microarray-Technologie. Da nur auf dem Transkriptom basierende Untersuchungen keine definitive Aussage zur Synthese und Aktivität korrespondierender Enzyme zulassen, wurden exemplarisch Enzymassays mit membrangebundenen und cytoplasmatischen Enzymen durchgeführt. Hierdurch sollte verdeutlicht werden, inwieweit die auf den Genomdaten basierenden Transkriptionsanalysen, gefolgt von biochemischen Untersuchungen, zur Erweiterung des Einsatzspektrums von *G. oxydans* beitragen können. Als Beispiel für den Umsatz eines ungewöhnlichen Substrats diente ein von KYRIELEIS (1999) synthetisierter Stickstoff-Heterozyklus. Dieses Hydroxypiperidin-Derivat könnte einen Ausgangspunkt für eine Wirkstoffpartialsynthese in der Pharmaindustrie bilden, worauf im Verlaufe dieser Arbeit detaillierter eingegangen wird. Die enzymatische Oxidation dieser Substanz durch *G. oxydans* birgt, wie bereits erwähnt, den immensen Vorteil einer stereo- und regiospezifischen Reaktion. Für den Einsatz einer Substanz als Therapeutikum kann diese Stereoisomeren-Reinheit von lebenswichtiger Bedeutung sein. Als ein Negativbeispiel für nicht stereoisomerenreine Therapeutika gilt der Fall des ‚Contergans‘. Nur eines der Stereoisomere erfüllte die medizinisch gewünschte Funktion. Das korrespondierende Stereoisomer wies jedoch eine teratogene Wirkung auf, die zu starken Missbildungen bei Neugeborenen führte.

Im wesentlichen machen also zwei Aspekte das hier untersuchte Bakterium zu einem äußerst interessanten Gegenstand von Forschung und industrieller Anwendung. Einerseits ist es die Fähigkeit zur unvollständigen Oxidation der Substrate, die aufgrund der geringen Energieausbeute für Lebensprozesse des Bakteriums mit einer geringen Biomasseproduktion einhergeht (McNEIL und HARVEY, 2005). Andererseits ist es die Vielzahl von Substanzen die stereo- und regioselektiv oxidiert werden können. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Konstruktion eines Gesamtgenom-Microarrays, auf dessen Basis, zusammen mit Experimenten zur Regulation der Transkription ausgewählter Gene, Aussagen zu einem effizienten Einsatz von *G. oxydans* in biotechnologischen Prozessen getroffen werden können. Zudem sollten biochemische Messungen zeigen, ob *G. oxydans* 621H auch stickstoffhaltige Heterozyklen umsetzen kann.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurde der vollständig sequenzierte *Gluconobacter oxydans* Stamm 621H verwendet (vgl. Tab 1).

Tab. 1: Verwendeter Organismus

Stamm / Herkunft	Relevanter Geno- bzw. Phänotyp	Referenz
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H DSM-Nr. 2343	Wildtyp	GILLIS & DE LEY, 1980

2.2. Verwendete Plasmide

In dieser Arbeit wurde auf die Plasmid-Genbank des Genomsequenzierungsprojektes (PRUST, 2004) zurückgegriffen, um PCR-Produkte für die Erstellung eines Gesamtgenom-Microarray-Chips zu generieren. Diese Plasmid-Genbank wurde für das o.g. Sequenzierungsprojekt von der Firma Integrated Genomics (Chicago, USA) hergestellt.

Tab. 2: Verwendete Vektoren

Plasmid	Relevanter Geno ^a - bzw. Phänotyp ^b	Größe	Referenz
pGEM [®] -3Z	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i>	3,0 kb	Promega Serva GmbH, Heidelberg

^a) Genotypbezeichnung nach BACHMANN, 1990: *lacPOZ'* = Promotor, Operator und α -Peptid der β -Galaktosidase aus *E. coli*.

^b) Phänotypbezeichnung : Amp^r = Ampicillinresistenz.

2.3. Nährmedien, Puffer und Standardlösungen

2.3.1. Nährmedium für *Gluconobacter oxydans* 621H

Soweit nicht anders angegeben, wurde *Gluconobacter oxydans* 621H für proteinbiochemische Untersuchungen standardmäßig auf folgendem Vollmedium angezogen:

Mannitol-Medium [BUCHERT und VIKARI, 1988]

Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	3,0 g
Mannitol	10,0 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit 6 N HCl auf 6,0 eingestellt.

Da Mannitol während des Autoklavierens nicht karamellisiert, konnten alle Medienbestandteile zusammen eingewogen werden.

2.3.2. Vollmedium mit Glucose, Mannitol, Sorbitol oder Gluconat

Neben dem standardmäßig zur Anzucht von *G. oxydans* für proteinbiochemische Zwecke verwendeten Vollmedium mit Mannitol als C-Quelle fanden Medien Verwendung, die neben Hefeextrakt (5,0 g/l) und Trypton (3,0 g/l), als C-Quelle Glucose, Mannitol oder Sorbitol enthielten. Soweit nicht anders angegeben, wurden die C-Quellen abweichend vom Rezept nach BUCHERT und VIKARI 50 mM eingesetzt. Diese Medien dienten der Zellanzucht für die Transkriptionsanalyse.

2.3.3. Definiertes Minimalmedium

Für Transkriptionsanalysen ist es äußerst wünschenswert, ein definiertes Medium zur Zellanzucht zur Verfügung zu haben. Deshalb wurden in dieser Arbeit Versuche

unternommen, ein definiertes Medium für *Gluconobacter oxydans* zu finden. Das hier verwendete Medium enthielt auch organische Bestandteile, weshalb es als Minimalmedium bezeichnet wurde. Es basiert auf dem basalen Salzmedium nach BELLY und CLAUS (1972) und wurde in Anlehnung an OLIJVE und KOK (1979a) mit Vitaminen und L-Glutamin versetzt. Zudem wurden Spurenelementelösung SL9 und Guanosin-5-Phosphatlösung hinzugegeben, um das *G. oxydans*-Wachstum zu unterstützen.

Anorganica

Ammoniumsulfat	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,15 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
H ₂ O _{dest.}	ad 860 ml

Die Anorganica wurden 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die folgenden Medienkomponenten hinzugefügt:

Guanosin-5-Phosphat-Lösung

Guanosin-5-Phosphat	0,015 g
H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml

Die Guanosin-5-Phosphat-Lösung wurde sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm, Sartorius, Göttingen), und bei 4 °C bis zur Verwendung im Minimalmedium gelagert.

Glutamin-Lösung

Die Aminosäure Glutamin wurde 50fach in H₂O_{dest.} angesetzt, sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) und in einer Endkonzentration von 10 mM im Minimalmedium verwendet. Glutamin ist als Pulver stabil, in Lösung hingegen nicht. Daher erfolgte die Zugabe der Glutamin-Stammlösung zum Minimalmedium direkt vor Gebrauch. Die Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

Pro Liter Minimalmedium kamen außerdem 1,0 ml der in 2.3.4. beschriebenen Spurenelementlösung SL9 und 1,0 ml der in 2.3.5. beschriebenen Vitaminlösung hinzu.

2.3.4. Spurenelementlösung SL9 (TSCHECH und PFENNIG, 1984; 1000fach)

Nitrilotriacetat (TitriplexI; MERCK)	12,8 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,07 g
H ₃ BO ₃	0,006 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002 g
Na ₂ MoO ₄	0,036 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit 6 N HCl auf 6,0 eingestellt. Die Aufbewahrung der SL9-Lösung erfolgte bei 4 °C. Zum Endvolumen von 1,0 l Minimalmedium wurde 1,0 ml der Spurenelementlösung pipettiert.

2.3.5. Vitaminlösung nach BALCH *et al.*, 1979 (5fach)

Biotin	10 mg
Nikotinsäure	25 mg
Thiamin-HCL	25 mg
p-Aminobenzoessäure	25 mg
Ca-D (+)-Pantothenat	25 mg
Pyridoxin-HCl	50 mg
Cyanocobalamin (Vit.B12)	5 mg
Folsäure	10 mg
Riboflavin	25 mg

Thioctinsäure (α -Liponsäure)	25 mg
H ₂ O _{dest.} (sterilfiltriert)	ad 1000 ml

Die Vitamin-Stammlösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Zum Endvolumen von 1,0 l Minimalmedium wurden 1,0 ml der Vitamin-Stammlösung pipettiert.

2.3.6. Aminosäuremix

Das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* in einem definierten Medium sollte in manchen Experimenten u.a. durch die Zugabe eines Aminosäuremixes unterstützt werden. Die Endkonzentration der einzelnen Aminosäuren richtete sich nach ihrer prozentualen Häufigkeit, mit der sie in Proteinen gefunden werden (s. Tab. 3).

Tab. 3: Häufigkeiten und Endkonzentrationen der dem definierten Medium zugesetzten Aminosäuren.

Aminosäure	Häufigkeit (%)	Endkonzentration (mM)
L-Alanin	7,8	5
L-Arginin HCl	5,1	10
L-Asparagin	4,3	10
L-Asparaginsäure	5,3	10
L-Cystein	1,9	10
L-Glutaminsäure	6,3	5
L-Glutamin	4,3	10
Glycin	7,2	5
L-Histidin HCl	2,3	10
L-Isoleucin	5,3	10
L-Leucin	9,1	5
L-Lysin HCl	5,9	10
L-Methionin	2,2	10
L-Phenylalanin	3,9	10
L-Prolin	2,2	10
L-Serin	6,8	5
L-Threonin	5,9	10
L-Tryptophan	1,4	10
L-Tyrosin	3,2	10
L-Valin	6,6	5

Alle Aminosäuren mit einer Häufigkeit von mehr als 6 % wurden mit einer Endkonzentration von 10 mM, jene mit einer Häufigkeit von weniger als 6 % mit der Endkonzentration 5 mM zum Minimalmedium pipettiert. Der Quelle <http://www.swisseduc.ch/chemie/molmod/anwendungen/aminoacids/> wurden diese prozentualen Häufigkeiten entnommen. Die Aminosäurestammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.3.7. Kaliumphosphatpuffer

Als Standardpuffer wurde in dieser Arbeit ein 0,01 M oder 0,1 M Kaliumphosphat-Puffersystem verwendet, das einen pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 abdeckte (KÜSTER *et al.*, 1985). Die eingestellten pH-Werte ergaben sich aus der Zusammenführung entsprechend konzentrierter Kaliumphosphat-Stammlösungen. ‚Lösung A‘ bezeichnet die monobasische Kalium-Dihydrogenphosphat-Stammlösung, ‚Lösung B‘ die dibasische Di-Kaliumhydrogenphosphat-Stammlösung. In Relation zum pH-Wert wurden beide Stammlösungen nach der Formel ‚x ml Lösung A + (100 – x ml Lösung B)‘ gemischt. Daraus ergab sich die folgende Tabelle:

Tab. 4: Mischungsverhältnisse der Kaliumphosphat-Stammlösungen zum Einstellen des Puffer-pH-Wertes.

pH	Anteil Lösung A (ml)	Anteil Lösung B (ml)	pH	Anteil Lösung A (ml)	Anteil Lösung B (ml)
5,7	93,5	6,5	6,9	45,0	55,0
5,8	92,0	8,0	7,0	39,0	61,0
5,9	90,0	10,0	7,1	33,0	67,0
6,0	87,7	12,3	7,2	28,0	72,0
6,1	85,0	15,0	7,3	23,0	77,0
6,2	81,5	18,5	7,4	19,0	81,0
6,3	77,5	22,5	7,5	16,0	84,0
6,4	73,5	26,5	7,6	13,0	87,0
6,5	68,5	31,5	7,7	10,5	90,5
6,6	62,5	37,5	7,8	8,5	91,5
6,7	56,5	43,5	7,9	7,0	93,0
6,8	51,0	49,0	8,0	5,3	94,7

2.3.8. NB – Medium (Nutrient broth)

NB-Fertigpulver	8,0 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

NB-Medium wurde vorwiegend zur Sterilitätskontrolle verwendet und zu diesem Zweck mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt in Petrischalen gegossen. Um auch *Gluconobacter oxydans* 621H ein Wachstum auf NB zu ermöglichen wurden Mannitol oder Glucose dem Agar 50 mM beigemischt. Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

2.3.9. LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Bacto-Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Wie das NB-Medium, diente auch LB der Sterilitätskontrolle. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Die Aufbewahrung der Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

2.3.10. Phosphat gepufferte Saline (PBS)

Die Phosphat gepufferte Saline wurde zum Waschen von Zellpellets benötigt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert und setzte sich folgendermaßen zusammen:

KH ₂ PO ₄ (0,1 M)	13,61 g
K ₂ HPO ₄ (0,1 M)	17,42 g
NaCl 0,9 % (w/v)	9,0 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Der pH-Wert des PBS-Puffers war auf 7,0 eingestellt.

2.3.11. Medienzusätze

Soweit notwendig, wurden weitere Zusätze in die Medien pipettiert. Diese Zugabe erfolgte nach Abkühlen der autoklavierten Nährlösungen auf mindestens 50 °C.

Tab. 5: Nach Bedarf verwendete Antibiotika-Lösungen

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
Cefoxitin	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	50 µg/ml

2.4. Zellanzucht

2.4.1. Anzucht von *Gluconobacter oxydans* aus der Stammkultur

Gluconobacter oxydans 621H wurde nach dem Auftauen aus der Stammkultur in Mannitol-Medium (vgl. 2.2.1.) angeimpft und aerob auf dem Rundschüttler bei 30 °C inkubiert. Zunächst wurden hierfür Reagenzgläser mit Aluminiumkappen verwendet. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen einmal passagiert. Dazu wurde frisches Medium in Reagenzgläsern oder in Erlenmeyerkolben mit Schikanen 2 – 5 %ig inokuliert. Erfolgte die Anzucht in Erlenmeyerkolben, so wurden diese mit Zellwattestopfen verschlossen. Den Kulturen wurden regelmäßig Aliquots zur Überprüfung von Reinheit und optischer Dichte entnommen.

2.4.2. Bestimmung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf der Kulturen wurde über die optische Dichte mit einem UV/Vis Spectrophotometer, Typ Jasco V-530 (Fa. Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gotha, Deutschland) verfolgt. Die OD-Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 600 nm. Als Nullwert diente unbeimpftes Medium. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden wurden die Proben mit unbeimpftem Medium entsprechend verdünnt, sobald eine Extinktion von 0,3 überschritten wurde.

2.4.3. Reinheitskontrollen

Zellsuspensionen wurden regelmäßig im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) anhand der Zellmorphologie auf Reinheit überprüft. Auch die Koloniemorphologie wurde zum Nachweis einer Reinkultur kontrolliert. Dazu wurden von Zellsuspensionen Vereinzelungsausstriche auf LB, NB und/oder Mannitol-Agarplatten angelegt.

2.4.4. Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung über wenige Tage wurde *Gluconobacter oxydans* in Mannitol-Flüssigmedium bei 4 °C gelagert. Zur Stammhaltung über einen Zeitraum von ca. 3 – 4 Wochen wurde *Gluconobacter oxydans* auf Mannitol-Agarplatten bei 4 °C gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden 850 µl Zellsuspension einer Übernachtskultur mit 150 µl 87 %igem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –70 °C.

2.4.5. Zellanzucht zur Bestimmung von Wachstumsparametern

Die Zellanzucht in Erlenmeyer-Schikanekolben wurde durchgeführt, um z.B. Wachstumsparameter wie die maximale Wachstumsrate (s. 2.4.6.) zu ermitteln. Dabei sollte die Gefäßgröße dem 5 bis 10fachen Kulturvolumen entsprechen, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung durch Schwenken auf dem Rotationsschüttler (120 U/min) zu gewährleisten. Dieses Verhältnis von Kulturgefäßgröße und Umdrehungszahl des Schüttlers stellte auch sicher, dass die Zellwattestopfen, mit denen die Schikanekolben verschlossen wurden, nicht durchfeuchteten. Nur im trockenen Zustand sind diese Stopfen ausreichend luftdurchlässig und steril. Den Kulturen wurden regelmäßig Aliquots zur Überprüfung von Reinheit und optischer Dichte entnommen. Zur Anzucht von Zellmaterial für die Transkriptionsanalyse eignen sich solche Batch-Kulturen nur eingeschränkt, da sich fortlaufend Zelldichte und Milieubedingungen ändern. Die Substratkonzentration nimmt ab, der pH-Wert kann sich ändern und Metabolite häufen sich an. Eine genaue Reproduktion dieser Bedingungen ist schwierig.

Für eine hohe Reproduzierbarkeit der Wachstumsbedingungen wurde deshalb der in 2.4.7. beschriebene Chemostat verwendet.

2.4.6. Ermittlung der maximalen Wachstumsrate $\mu_{\max}$

Die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ ist abhängig von den Wachstumsbedingungen. Dazu gehören z.B. die Art des Substrates (C-Quelle), der N- oder der P-Quelle. Auch Parameter wie Belüftung, Temperatur oder pH-Wert der Nährlösung haben einen Einfluss. Die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ wurde bestimmt, indem zunächst der Verlauf des Zellwachstums im geschlossenen System (Batch-Kultur) durch regelmäßige Probenentnahme photometrisch verfolgt wurde. Die gesammelten Daten dienen der Erstellung einer Wachstumskurve. Üblicherweise wird eine solche Kurve in folgende Phasen unterteilt: In der lag-Phase adaptieren die Zellen an die Wachstumsbedingungen durch die Umstellung des Stoffwechsels. Eine Zunahme der Kulturdichte findet in dieser Phase kaum statt. Erst in der logarithmischen Wachstumsphase (log-Phase) erfolgt ein Wachstum mit schnellstmöglicher Teilungsrate. In dieser Phase wurde die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ bestimmt. Im geschlossenen System gibt es keine Zufuhr von Nährstoffen. Ist durch das Wachstum der Bakterien eine essentielle Ressource verbraucht, limitiert diese die weitere Bakterienvermehrung. Diese stationäre Phase ist anhand eines Plateaus der Kurve zu erkennen. Sind alle Energiequellen verbraucht, beginnen die Bakterien abzusterben und zu lysieren. Damit verbunden ist eine Abnahme der Zelldichte in der Suspension. Die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ in der log-Phase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\mu_{\max} = (\log x_t - \log x_0) / (t - t_0)$$

$\mu_{\max}$ besitzt die Einheit 1/h

x_0 = OD₆₀₀ zu Versuchsbeginn

x_t = OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t

t_0 = Zeitpunkt des Messbeginns [h]

t = Zeitpunkt x im Messverlauf [h]

2.4.7. Zellanzucht im Chemostat für die Transkriptionsanalyse, protein-biochemische Untersuchungen und für die Elektronenmikroskopie

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

Die Fermentationseinheit, bestehend aus dem Chemostatkessel mit Zulauf- und Ernterohr, Belüftungsfritte, Be- und Entlüftungswaschflasche, pH-Elektrode, pO_2 -Elektrode, Temperaturfühler, Level- und Antischaumelektrode, sowie den Vorratsflaschen für Säure, Base und Antischaum, wurde bei 121 °C für 30 Minuten autoklaviert. Der Chemostatkessel wurde dazu mit 500 ml $H_2O_{dest.}$ befüllt, damit die Elektroden beim Autoklavieren in Flüssigkeit eintauchten. Zudem wurden 8 l Medium in einer 20 l Steilbrustflasche mit G45 Schraubgewinde, und eine leere, ebensolche Flasche für den Suspensionsabfluss während des kontinuierlichen Laufs autoklaviert.

Abb. 1: Aufbau des Chemostat Biostat B_{plus}, Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen (schematische Darstellung nach SCHMIDT, 2005; mod.)

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

Alle Schlauchverbindungen wurden mit Silikonschlauch (Fa. Masterflex AG, Gelsenkirchen, Deutschland) hergestellt, der vor jedem Autoklavieren auf Schäden kontrolliert und ggf. ausgetauscht wurde. Zur einfacheren Handhabung wurden die Schläuche mit Metall-Luer-Lock-Oliven miteinander verbunden. Nach dem Autoklavieren wurden die leeren Schraubdeckelflaschen für Säure, Base und Antischaum gegen befüllte Flaschen steril ausgetauscht, das Wasser vollständig aus dem Kessel gepumpt und durch 500 ml Medium ersetzt. Über den Doppel-Glasmantel des Chemostatkessels und den Thermostat der Steuerungseinheit wurde eine konstante Kesseltemperatur von 30 °C eingestellt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde die Sauerstoffelektrode kalibriert. Zur Nullpunkteichung durchströmten ca. 1,5 l/min Stickstoff (Reinheitsgrad 4.0, Messer-Group GmbH, Sulzbach, Deutschland) den Kesselinhalt. Zur besseren Verteilung des Gases wurde der Rührer dabei auf 850 Upm geschaltet. Der sich einstellende konstante Elektrodenstrom im nA- (nanoAmpere) Bereich wurde als Nullpunkt festgesetzt. Zur Eichung des 100%-Wertes für Sauerstoff im Medium durchströmten 1,5 l/min Pressluft die Nährlösung, wiederum bis zum konstanten Elektrodenstrom. Auch Zellsuspensionen wurden mit 850 Upm gerührt, wobei in der Regel ein Sauerstoffpartialdruck von 80 % eingestellt wurde. Für das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* 621H wurde, soweit nicht anders angegeben, ein pH-Wert von 6,0 eingestellt. Das Kesselvolumen von 500 ml wurde 5%ig angeimpft. Nachdem die Zellen zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 gewachsen waren, wurde die Substratpumpe (SubttA) (Watson Marlow 101 U/R; Falmouth, Cornwall, UK) zugeschaltet. Diese Pumpe wurde vor dem Chemostatenlauf mit dem verwendeten Schlauch auf ihr gefördertes Pumpvolumen pro Zeiteinheit geeicht. Die zum Abpumpen der im kontinuierlichen Betrieb anfallenden Zellsuspension eingesetzte Pumpe musste hingegen nicht kalibriert werden. Die Levelelektrode sensierte einen Stromfluss zum Temperaturfühler als Referenzelektrode und schaltete bei steigendem Kesselinhalt die Ablauf-Pumpe zu. Nach Einstellung des Fließgleichgewichtes änderte sich die OD₆₀₀ der Zellsuspension nicht mehr. Nach weiteren drei Volumenwechseln wurden die Zellen über das Entnahmesystem in vorgekühlten 50 ml Schraubdeckelröhrchen geerntet. Die Zellsuspension wurde täglich lichtmikroskopisch und durch Ausstrich auf NB-Agarplatten mit 50 mM Glucose auf Reinheit überprüft.

2.5. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden hitzestabile Geräte und Lösungen durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit 70 %igem Ethanol (v/v) desinfiziert oder mit 96 %igem Ethanol (v/v) abgeflammt. Hitzelabile Substanzen (z.B. Antibiotika) wurden als Stammlösung sterilfiltriert verwendet.

2.5.2. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.5.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion

Um bei der Präparation von DNA Proteinkontaminanten oder hydrophobe Substanzen abzutrennen, wurde die wässrige DNA-Suspension mit 1 Vol. Phenol-Lösung versetzt und kräftig gemischt. Das verwendete Phenol war mit 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) gesättigt. Zur Phasentrennung wurde 3 min bei 13000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417 R). Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und mit Ethanol gefällt.

2.5.2.2. Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol

Durch die DNA-Fällung mit Ethanol werden Proteine, Salze und freie Nukleotide entfernt und gleichzeitig die DNA aufkonzentriert. Wenngleich diese Methode kontaminierende Proteine und Salze nicht vollständig entfernt, ist sie dennoch für die meisten Anwendungen ausreichend. Die Fällung beruht einerseits auf der Erhöhung der Konzentration monovalenter Kationen, was die Dielektrizitätskonstanten erhöht. Dadurch ist die Abstoßung negativ geladener Phosphatgruppen der DNA vermindert. Andererseits bewirkt der zugegebene Alkohol eine Störung der Clusterbildung von

Wassermolekülen um die Ladungen des Nukleinsäure-Rückgrades. Beide Effekte führen zum Ausfallen der DNA.

Die DNA-haltige Suspension wurde mit 1/10 Vol. 5 M Ammoniumacetatlösung und 3 Vol. eiskaltem, 96 %igem, unvergälltem Ethanol versetzt. Je nach Größe der zu fällenden DNA Fragmente betrug die Dauer der Fällung zwischen 15 min und 12 h. Gefällt wurde entweder bei 0 °C oder bei –20 °C. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 Upm für 30 min in einer auf 4 °C vorgekühlten Eppendorf-Zentrifuge (Typ 5717 R). Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) unvergälltem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 14.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Ethanol wurde mit einer Pipette abgenommen und die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit der DNA für etwa 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit der restliche Alkohol verdunstet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde je nach gewünschter Konzentration in destilliertem Wasser aufgenommen.

2.5.2.3. Fällung von DNA mit Isopropanol

Anstelle von Ethanol kann zur Fällung von DNA aus wässriger Lösung auch Isopropanol verwendet werden. Dabei wurde analog zur Fällung von DNA mit Ethanol verfahren, jedoch wurden nur 0,7 Vol. bis 1 Vol. Isopropanol eingesetzt. Nach der Fällung wurde das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen.

2.5.2.4. Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten in 1 ml Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm mit Hilfe eines Photometers des Typs UVIKONxs, BIO-TEK Instruments Inc., Bad Friedrichshall, Deutschland. Der Nullabgleich wurde mit Wasser oder TE-Puffer vorgenommen, jeweils danach gerichtet, worin die DNA gelöst war. Für eine OD₂₆₀ von 1,0 wurden folgende Konzentrationen angenommen (nach SAMBROOK *et al.*, 1989):

doppelsträngige DNA	50 µg/ml
einzelsträngige DNA/RNA	40 µg/ml
Oligonukleotide	31 µg/ml

Zusätzlich konnte die Reinheit einer DNA-Lösung durch die Bestimmung der optischen Dichten bei 230 nm und 280 nm überprüft werden. Für reine DNA gilt:

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

$$\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} = 0,45 : 1,0 : 0,515 \quad (\text{MARMUR}, 1961)$$

Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol sind an einer deutlich stärkeren Absorption bei 280 nm erkennbar, Polysaccharide hingegen erhöhen die Absorption bei 230 nm.

2.5.3. Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

2.5.3.1. Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten wurden horizontale Gelelektrophoresen in Kammern der Größe 11,0 cm x 6,5 cm (kleine Gele) und 14 cm x 12 cm (große Gele) durchgeführt. Die zur Generierung des Gesamtgenom-Microarrays hergestellten PCR-Produkte wurden hingegen im 96er-Format elektrophoretisch auf das Vorliegen singulärer Banden der erwarteten Größe überprüft. Die Agarose wurde in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragmentgrößen in der Regel 0,8 %ig (w/v) bzw. 2,0 %ig (w/v) in TAE-Puffer angesetzt (vgl. 2.5.3.2.), der auch als Elektrophoresepuffer diente. Zum Gießen der Gele musste die Agarose zunächst verflüssigt werden. Dies erfolgte durch Erhitzen in einer Mikrowelle. Die heiße Agarose-Lösung wurde auf etwa 50 °C abgekühlt, in die Gelkammer gegossen und zur Ausformung der Geltaschen mit einem Kamm versehen. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 1/5 Vol. Stop-Mix (= farbstoffhaltige Beschwerer-Lösung) versetzt, um während der Elektrophorese die Lauffront verfolgen zu können und den Lauf rechtzeitig vor Erreichen des Gel-Endes zu stoppen. Eventuell noch vorhandene Proteine wurden durch die Stop-Mix-Lösung denaturiert. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung der

DNA im Gel wurden parallel zu den Proben 4 µl (bei einem großen Gel 20 µl) DNA-Längenstandard aufgetragen. Nach der Elektrophorese (40-90 V, 0,5-2 h für Minigele) wurde die doppelsträngige DNA in den Gelen für 15 min im Ethidiumbromidbad angefärbt, anschließend das Gel gewässert und die Nukleinsäurebanden mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

Stop-Mix (SAMBROOK et al., 1989)

EDTA 1,0 mM	19 mg
Harnstoff 7,0 M	21 g
Saccharose 50,0 % (w/v)	25 g
Bromphenolblau 0,1 % (w/v)	50 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Aliquots der autoklavierten Lösung wurden bei -20 °C gelagert.

Wahlweise wurde die käuflich erworbene 6x *loading-dye-solution* der Firma MBI Fermentas als Beschwererlösung verwendet.

Ethidiumbromid-Stammlösung / Anfärben von DNA in Agarosegelen

Die Ethidiumbromid-Stammlösung wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Wasser angesetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. 100 µl dieser Stammlösung wurden in 100 ml Wasser gegeben, um darin die DNA-Banden im Agarosegel anzufärben. Die Färbung beruht auf Interkalieren des unter UV-Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids in den Nukleinsäuredoppelstrang. Die Gele wurden für etwa 15 min in das Färbebad gelegt, anschließend 5 min gewässert und dann in einer GelDoc-Anlage dokumentiert. Diese GelDoc-Anlage setzte sich aus einem UV-Transilluminator (Croma 41, Fa. Vetter, Wiesloch, Deutschland) und einer Videodokumentationseinheit (Fa. Intas, Göttingen, Deutschland) zusammen. Nach UV-Anregung mit einer Wellenlänge von 254 nm wurde ein Bild des Gels aufgenommen und auf Thermopapier gedruckt.

2.5.3.2. Tris-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Für die Verwendung bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden mehrfach konzentrierte Puffer-Stammlösungen bei 4 °C vorgehalten. Zur Einstellung geringerer Konzentrationen (Gebrauchslösungen waren 1fach) wurde mit H₂O_{bidest.} verdünnt:

20 x TAE-Puffer

Tris	96,9 g
Eisessig	22,8 ml
EDTA	3,8 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
pH 8,5	

2.5.3.3. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Größe gelelektrophoretisch aufgetrennter, linearer DNA-Fragmente ermitteln zu können, wurden DNA-Größenstandards der Fa. MBI Fermentas verwendet. Je nach erwarteten DNA-Fragmenten wurde entweder der Standard ‚GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder‘ oder der ‚GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder‘ verwendet. Der Größenstandard wurde parallel zu den zu untersuchenden Proben auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Auswertung wurden die bekannten Fragmentgrößen der Standards (s. Abbildung des Herstellers) herangezogen.

2.6. Herstellung eines Gesamtgenom-DNA-Microarrays von *G.oxydans* 621H

DNA-Microarray-Chips dienten in dieser Arbeit der vergleichenden Analyse der Transkriptionsregulation von *Gluconobacter oxydans* 621H, der dazu unter verschiedenen Bedingungen in Batch- oder Chemostatkulturen angezogen wurde. Für einen detaillierten Einblick in die Lebensprozesse dieses Mikroorganismus sollten auf dem erstellten DNA-Microarray möglichst alle ORFs des Genoms vorhanden sein. Dazu wurden ca. 250 bis 800 bp große PCR-Amplifikate von Sequenzabschnitten der

Gene hergestellt und an der Oberfläche des Chips gebunden. Die dazu notwendigen Prozesse sind nachfolgend beschrieben.

2.6.1. Ableiten der Primer zur Microarray-Chip-Herstellung

Aus Sequenzen der Plasmid-Genbank des Genom-Sequenzierungsprojekts (PRUST, 2004) wurden mit Hilfe eines im Haus entwickelten (Dr. A. Ehrenreich) und bislang unveröffentlichtem Computerprogramms Primer generiert. Zur Kostenersparnis wurde zunächst nur ein genspezifischer Primer pro ORF und ein plasmidspezifischer (*universal*-) Primer abgeleitet. Erst als für einige ORFs mit dieser Strategie kein geeignetes Amplifikat erhalten wurde, mussten dafür zweite genspezifische Primer abgeleitet werden. Zwei spezifische Primer wurden dann zusammen mit genomischer *template* DNA verwendet um PCR-Produkte zu erhalten (s. 2.6.9.). Bei der Primergenerierung wurde von der Software berücksichtigt, dass die PCR-Produkte (*probes*) zwischen ca. 250 – 800 bp lang sein sollten und die Primer nur einmal im gesamten Genom binden. Zur Gewährleistung dieser Spezifität besaßen die Primer Längen von durchschnittlich etwa 21 bp. Die durchschnittliche Schmelztemperatur betrug etwa 64 °C. Die berechneten Primer wurden bei der Firma QIAGEN (Hilden) synthetisiert.

2.6.2. Vorbereitung der genspezifischen Primer

Von der Firma QIAGEN (Hilden) wurden die generierten Primer im 96-Kalotten Mikrotiterplatten-Format geliefert. Für die folgenden Arbeitsschritte sollten die Primer in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorliegen. Vor dem Lösen mit H₂O_{dest.} wurden die Mikrotiterplatten 10 min bei 1750 Upm in einer Plattenzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R) abzentrifugiert um eventuell an der Plattenverschlussfolie anhaftende DNA in die Vertiefungen zurückzuführen. Nach der Zugabe von 100 µl H₂O_{dest.} wurde die Mikrotiterplatte erneut verschlossen und 30 min auf einem Rüttler bei RT inkubiert, um das Lyophilisat zu lösen. Danach wurde für 6 min bei 1750 Upm zentrifugiert.. Die Lagerung der Primerplatten erfolgte bei –20 °C.

2.6.3. Verdünnung der Primer für nachfolgende PCR-Reaktionen

In TPP-Mikrotiterplatten (96 Kalotten) wurden 80 µl steriles H₂O_{dest.} pro Vertiefung vorgelegt und mit einer Mehrkanal-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) 20 µl aus den Original-Primerplatten (s. 2.6.2.) zupipettiert. Nach dieser 1:5-Verdünnung lag die Primerkonzentration bei 20 pmol/µl. Die Platten der Primerverdünnung wurden ebenfalls kurz anzentrifugiert und dann bei -20 °C gelagert. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 5 µl für die PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.6.4. Universal-Primer für *Gluconobacter oxydans* 621H

Soweit möglich, wurden PCR-Reaktionen zur Amplifikation von Genen für die Herstellung des Gesamtgenom-Chips mit einem ORF-spezifischen und einem ‚universellen‘ Primer durchgeführt. Letztgenannter ist spezifisch für das Plasmid pGEM®-3Z der *shotgun-library* des Genomsequenzierungsprojektes von *G. oxydans* 621H (PRUST, 2004). Es wurde ein universeller Primer in vorwärts- (for) und einer in rückwärts-Leserichtung (rev) generiert. Diese Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen und hatten folgende Bezeichnungen und Sequenzen:

uniGOX_for 5'-CGACTCACTATAGGGCGAATTCGA-3'

uniGOX_rev 5'-CTAGAGGATCCCCGGGTACCG-3'

Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl angesetzt. Daraus wurde pro PCR-Reaktionsansatz ein Volumen von 1,0 µl verwendet.

2.6.5. Zusammenstellung und Verdünnung der Plasmide der *shotgun-library* des Genomsequenzierungsprojektes zur Chip-Herstellung

Um möglichst alle *open reading frames* von *G. oxydans* 621H auf dem Microarray-Chip platzieren zu können, wurden zunächst die pGEM-3Z Plasmide (Insertgrösse etwa 2 kb) der *shotgun-library* des Genomsequenzierungsprojektes auf das Vorhandensein einer vollständigen Gensequenz im Insert hin überprüft. Hierbei identifizierte Plasmide wurden durch Umpipettieren in neue Mikrotiterplatten zusammengestellt. Für folgende

PCR-Reaktionen wurden die Plasmidsuspensionen verdünnt. Dazu wurden 27 µl steriles H₂O_{dest.} in Mikrotiterplatten vorgelegt und 3 µl der *template*-Plasmid-DNA zupipettiert. Die Plasmidverdünnung wurde mit der Pipette gemischt, die Platten kurz anzentrifugiert und 2 µl des verdünnten Plasmids für die PCR eingesetzt.

2.6.6. Reaktionspuffer S (10x)

Für die PCR-Amplifikation von Genen zur Microarray-Chip-Generierung bewährte sich ein Reaktionspuffer, der eine hohe Reaktionsspezifität gewährleisten, und somit falsche oder Mehrfachbanden verhindern sollte. Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

Tris-HCl	100 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	15 mM
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
pH	8,8

Der Puffer wurde in Eppendorfreaktionsgefäßen aliquotiert bei -20 °C gelagert.

2.6.7. PCR zur DNA-Amplifikation für die Microarray-Chip-Generierung

Die *in vitro*-Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde angewandt, um Amplifikate von Teilbereichen aller Gensequenzen von *Gluconobacter oxydans* 621H herzustellen. Diese wurden benötigt, um einen Microarray-Chip zu generieren, mit dessen Hilfe genomweite Transkriptionsanalysen von Zellen, die unter verschiedenen, definierten Bedingungen gewachsen waren, durchzuführen. Bei der Planung der PCR-Reaktionen wurde, soweit möglich, die Orientierung (for/rev) der universellen Primer derart berücksichtigt, dass die Genom-unspezifischen Komponenten des Reaktionsansatzes als Mastermix zusammengegeben werden konnten. Dieser Mastermix wurde dann in AB0800-Thermofast-Mikrotiterplatten (ABGene, Hamburg) vorgelegt und mit den Genomsequenz-spezifischen Komponenten

komplettiert. Für eine Amplifikation wurde folgendes Reaktionsgemisch auf Eis zusammenpipettiert und gut gemischt:

Mastermix (für 100 µl Ansatz)

dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Reaktionspuffer S	10,0 µl
H ₂ O _{dest.} (steril)	80,5 µl
GoxUni-Primer (for bzw. rev)	1,0 µl
Taq-Polymerase (MBI-Fermentas)	0,5 µl

Genomsequenz-spezifische Komponenten

Genomsequenz-spezifischer Primer (verdünnt auf 20 pmol/µl)	5,0 µl
Plasmid-DNA (Template) verdünnt	2,0 µl

Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Mikrotiterplatten mit AB0558-PCR-Folien (ABGene, Hamburg) verschlossen, erneut in der Plattenzentrifuge (s.o.) anzentrifugiert und in einen Thermocycler mit 96 Well-Cyclerblock (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg oder Primus 96*plus*, MWG, Ebersberg) gestellt. Die Polymerasekettenreaktion verlief nach folgendem Programm:

PCR-Programm

- 1 Deckel vorheizen auf 110 °C
- 2 Pause bei 4 °C (ohne Zeitlimit)
- 3 Cycler-Deckel mit 150 N verschließen
- 4 96 °C für 2 min
- 5 Start der Reaktionsschleife (33x)
- 6 95 °C 1 min (Denaturieren)
- 7 55°C 45 sec (Anlagerung der Primer an die getrennten DNA-Stränge)
- 8 72°C 1 min (Elongation)
- 9 Ende des Reaktionszyklus
- 10 72 °C 5 min (finale Elongation)
- 11 8 °C 1 sec
- 12 4 °C ohne zeitliche Begrenzung

Die erhaltenen PCR-Produkte konnten über Nacht bei 4 °C gelagert werden. Zum Überprüfen der PCR-Produkte wurden Aliquots auf ein Agarosegel (s. 2.5.) aufgetragen.

2.6.8. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die meisten PCR-Produkte für die Gesamtgenom-Microarray Herstellung wurden unter Verwendung eines Roboters (BioRobot 8000, Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Nur eine kleine Zahl PCR-Produkte wurde per Hand mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Vorbereitend wurde steriles H₂O_{dest.} auf 50 °C erhitzt. In sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden ca. 95 µl des PCR-Produkts mit 500 µl des PB-Puffers aus dem Kit gemischt. Dieses Gemisch wurde auf die Aufreinigungssäule (Kit-Bestandteil) aufpipettiert, die zuvor auf ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt wurde. Nach Zentrifugation für 60 sec. bei 13.000 Upm wurde der Durchlauf verworfen. 750 µl PE-Puffer wurden auf die Säule pipettiert und erneut durchzentrifugiert. Auch dieser Durchlauf wurde verworfen und die Säulenmatrix durch erneute Zentrifugation getrocknet. Die so getrocknete Säule wurde auf ein frisches, steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß umgesetzt und die DNA mit 50 – 70 µl des vorgeheizten, sterilen Wassers eluiert. Zur Elution der DNA von der Säule wurde diese nochmals für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im Eluat durch photometrische Messung (OD₂₆₀) bestimmt.

Beiden Methoden, per Roboter oder per Hand, liegt das gleiche Prinzip zugrunde. Allerdings führt der Roboter die Aufreinigungen im 96-Well Mikrotiterplatten-Format durch und ersetzt alle notwendigen Zentrifugationsschritte durch das Anlegen eines Vakuums.

2.6.9. DNA-Amplifikation mit zwei ORF-spezifischen Primern

In den Fällen, in denen von einem ORF zunächst kein PCR-Produkt erhalten oder aufgrund eines nicht ausreichend spezifischen Primers mehrere Produkte im Agarosegel

nachgewiesen wurden, musste eine andere Strategie gewählt werden. In diesem Fall wurde der entsprechende ORF-Abschnitt mit chromosomaler DNA als Template und zwei spezifischen Primern (*forward* und *reverse*) amplifiziert. Dazu wurden analog zur in Kapitel 2.6.1. beschriebenen Vorgehensweise neue Primer abgeleitet und auf ihre Spezifität hin überprüft. Die genomische DNA wurde mit dem AquaPure GenomicDNA Kit (Fa. Biorad, München) isoliert.

2.6.9.1. Präparation genomischer DNA

Zur Amplifikation von Genen bzw. Genabschnitten wurde auch genomische DNA als Template verwendet. Diese wurde mit Hilfe des AquaPure GenomicDNA Kits (Fa. BioRad, München) präpariert. Die dazu benötigten Lösungen waren im Kit enthalten. Die isolierte DNA war hochrein und konnte deshalb direkt als Template für PCR-Reaktionen verwendet werden. Für die DNA-Präparation wurden 5 ml Zellkultur in Mannitol- oder Glucose-Vollmedium angezogen. Davon wurden 500 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und durch Zentrifugation (14.000 Upm, 3 min) pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet durch Resuspendieren in 300 µl *Genomic DNA Lysis Solution* und anschließender Inkubation bei 80 °C für 5 min aufgeschlossen. Durch Zugabe von 1,5 µl RNase A-Lösung (4 mg/ml) und Inkubation bei 37 °C für 45 min wurde die enthaltene RNA entfernt. Proteine wurden durch Zugabe von 100 µl *Protein Precipitation Solution*, gründlichem Mischen und Zentrifugieren bei 14.000 Upm für 3 min bei RT aus dem Zell-Lysat entfernt. Der proteinfreie Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde durch Isopropanol-Zugabe (100 µl), vorsichtigem Schwenken und Zentrifugation (14.000 Upm, RT, 1 min) gefällt. Anschließend wurde das DNA-Pellet einmal mit 70 % (v/v) Ethanol (unvergällt) gewaschen und 10 min an der Luft getrocknet. In 50 µl sterilem H₂O_{dest.} wurde die genomische DNA resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

2.6.10. *In silico*-Kontrolle der *probe*-Spezifität

Das in Java programmierte und im Internet frei erhältliche Genombetrachtungs- und Annotationsprogramm Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) diene dem Überprüfen der berechneten PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Vollständigkeit und Spezifität (s. 3.2.1.). Dazu wurden die PCR-Produkt-Sequenzen in ein .gbk-File übertragen, wozu eine bislang unveröffentlichte Software (A. Ehrenreich, Göttingen) genutzt wurde. Diese .gbk-Datensätze wurden dann in die Artemis-Software eingelesen und mit Hilfe dieses Programms visualisiert, so dass nach den genannten Kriterien ausgewertet werden konnte.

2.6.11. Spotten der Chips und UV-Immobilisierung der DNA

Die *probes* wurden mit dem Lucidea-Spotter der Firma Amersham Biosciences nach dem Prinzip des ‚*contact printings*‘ gespottet. Ein Druckkopf mit 24 Füllfederhalter-artigen Nadeln nimmt aus 384-Kalotten Mikrotiterplatten pro Nadel ca. 200 nl der PCR-Produkt-Suspension (*probe*) auf. Mit hoher Präzision werden 100 pl Flüssigkeit pro Spot auf die Oberfläche eines Aminosilan-beschichteten Glas-Objektträgers mit 2,5 x 7,5 cm Kantenlänge aufgebracht. Jeder Spot weist einen Durchmesser von 150 µm auf. Der minimale Abstand der Spots beträgt 30 µm. In dieser Arbeit wurden Chips der Firma Amersham Biosciences verwendet, welche durch die Behandlung von Glasobjektträgern mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan hergestellt wurden. Diese Modifikation der *slides* ermöglicht das Binden von DNA durch Interaktion zwischen dem negativ geladenen Rückgrat der Nukleinsäure und der positiv geladenen Aminosilanoberfläche.

Vor dem Spotten wurden die PCR-Suspensionen aus den 96-Kalotten Mikrotiterplatten auf Platten mit 384 Kalotten umpipettiert und zum Denaturieren 1:1 mit DMSO versetzt. Das Spotten der *probes* erfolgte in Blöcken von 16 x 11 Spots, wobei jeder Block doppelt auf den Chip gesetzt wurde. In jeder Blockreihe, die aus 4 Blöcken besteht, sind jeweils die ersten und die letzte beiden Blöcke identisch. In den ersten acht Blockreihen wurde jeweils eine sogenannte *scorecard* mitgeführt. Hierbei handelt es sich um spezifische DNA (LucideaTM Universal ScoreCardTM, Amersham Biosciences, Freiburg), welche später zur Normalisierung der Microarraydaten diene. Nach dem Spotten der *probes* erfolgte eine UV-Immobilisierung mit dem UVC500 UV

Crosslinker (HOEFER, San Francisco). Durch das Bestrahlen der gespotteten Chips mit Licht der Energie von 500 mJ/cm^2 wurde die Bindung der DNA Fragmente an die Chipoberfläche gefestigt. Da die geprinteten Microarrays sehr feuchtigkeitsempfindlich sind, werden sie im Exsikkator bei Unterdruck über einem Trocknungsmittel aufbewahrt.

2.6.12. Analyse von DNA-Sequenzdaten

Für die Analyse von Gensequenzen wurden neben der ERGO-Software auch im Internet frei zugängliche Sequenzabgleich-Programme genutzt. Dazu gehören z.B. das ‚PredictProtein‘-Programm (http://embl-heidelberg.de/predictprotein/submit_def.html), welches auch Aussagen bezüglich der möglichen Sekundärstruktur des untersuchten Proteins trifft. Außerdem wurde der DAS-Transmembrane Prediction Server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/tmdas.cgi>), das Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk>) und TMpred (<http://www.ch.embnet.org>) verwendet, die alle zur Untersuchung auf transmembrane Helices eingesetzt wurden. Als sehr ergiebige Proteindatenbank erwies sich SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>). Ferner erfolgte eine Analyse von Sequenzdaten mit dem im Internet angebotenen Service „Blast-Search“ der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.7. Techniken für das Arbeiten mit RNA

2.7.1. Vorbereiten von Geräten und Lösungen

Bei der Arbeit mit RNA ist eine Kontamination des Probematerials mit den im Vergleich zu den DNasen sehr stabilen RNasen unbedingt zu vermeiden. Deshalb wurden alle benötigten Materialien wie z.B. Lösungen, Glaswaren oder Pipettenspitzen, soweit möglich, zweimal bei 120°C für 30 min autoklaviert. Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Latex-Handschuhen durchgeführt, die wiederum mit 70 % (v/v) Ethanol desinfiziert wurden. Auch die Arbeitsfläche und die verwendeten Pipetten wurden wiederholt mit 70%igem (v/v) Ethanol dekontaminiert.

2.7.2. Zellaufschluss von *G. oxydans* mit dem Dismembrator

Ein enzymatischer oder mechanischer Aufschluss nicht gefrorener Zellen zur Präparation von RNA aus *Gluconobacter oxydans* erscheint ungeeignet, da RNA eine sehr kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten aufweist. Zum Vermeiden langer Inkubationszeiten wurden daher gefrorene Zellen mittels Kugelmühle (Mikro-Dismembrator U, BraunBiotech, Melsungen) aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen direkt nach der Ernte bei 6000 Upm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Pellets schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterbearbeitung bei -70 °C gelagert. Für den Aufschluss wurde ein PTFE-Zylinder mit Chromstahl-Kugel in Flüssigstickstoff vorgekühlt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 200 µl TE-Puffer resuspendiert und dann in den mit flüssig-N₂ gefüllten PTFE-Zylinder pipettiert. Der Zylinder mit der erneut gefrorenen Zellsuspension wurde verschlossen und in den Halter des Dismembrators eingespannt. Mit einer Frequenz von 1600 Upm wurde die Chromstahlkugel 3 min in dem Zylinder umhergeschleudert und dadurch das Zellpellet fein zermahlen. Die gefrorenen Zelltrümmer wurden 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. Die RNA in der Probe wurde danach nicht mehr abgebaut und war bei 4°C über Nacht bis zur weiteren Präparation lagerfähig.

2.7.3. 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.

2.7.4. DNase-Verdau und Qualitätskontrolle der präparierten RNA

Zum Vermeiden von Verunreinigungen der RNA mit Resten chromosomaler DNA wurde ein DNase-Verdau der RNA Lösung durchgeführt. Zu den maximal 300 µl wässriger RNA Lösung der RNA-Präparation (s. 2.7.3.) wurden 65 µl 5x DNase-Puffer und 10 µl DNase (10 U/µl; Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert. Nach der Hydrolyse der kontaminierenden DNA während einer 45 minütigen Inkubation des Ansatzes bei 25 °C wurde die DNase durch Inkubation für 10 min bei 70 °C inaktiviert. Zur Kontrolle des vollständigen DNA-Verdaus erfolgte eine Standard-PCR, wie sie in Kapitel 2.7.5. beschrieben ist. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.5.3.1.). Der DNase-Verdau war erfolgreich, wenn ausschließlich ein Amplifikat der Positivkontrolle chromosomaler DNA aus *G. oxydans* 621H nachweisbar war. Anderenfalls wurde der DNase-Verdau wiederholt. Nicht nur die Reinheit, sondern auch die Qualität der RNA wurde überprüft. Dazu diente eine reverse Transkriptionsreaktion (2.7.6.) mit genspezifischen Primern. Auch diese Produkte wurden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Für jeden RNA enthaltenden Ansatz wurde ein Amplifikat erwartet.

2.7.5. PCR zur Kontrolle des DNase-Verdaus bei der RNA-Präparation

Diese PCR wurde mit genspezifischen Primern zum Überprüfen eines vollständigen DNase-Verdaus bei der Präparation von RNA durchgeführt. Als Positivkontrolle diente genomische DNA aus *Gluconobacter oxydans* 621H. Zur Nukleinsäureamplifikation wurde Taq-DNA-Polymerase der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) eingesetzt.

100 µl PCR-Ansatz:

5 µl	forward-Primer (20 µM)
5 µl	reverse-Primer (20 µM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
10 µl	10x PCR-Puffer
2 µl	chromosomale DNA (250 ng/µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
76,5 µl	H ₂ O _{bidest.}

PCR- Programm:

01	LIDTH ON		110 °C
02	PAUSE 2 h		4 °C
03	LIDCL	150 N	
04	TEMP	2 min	96 °C
05	LOOP [	25 x	
06	TEMP	30 s	96 °C
07	TEMP	30 s	(T _m - 5 °C) °C
08	TEMP	2 min 30 s	72 °C
09	] LOOP		
10	TEMP	10 min	72 °C
11	STORE	10 s AT	8 °C
12	TEMP	FOREVER	4 °C

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch im Agarosegel (0,8 % (w/v)) überprüft.

2.7.6. PCR mittels reverser Transkription von RNA (RT-PCR)

Bei dieser Art der PCR wird RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben und letztere dann amplifiziert. Die reverse Transkription und die anschließende PCR konnten mit dem OneStep RT-PCR-Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem Arbeitsschritt durchgeführt werden. RT-PCR-Ansatz und Programm sind nachfolgend beschrieben:

25 µl RT-PCR Ansatz:

Template RNA	1 µg
forward-Primer (5 µM)	3 µl
reverse-Primer (5 µM)	3 µl
5x Qiagen OneStep RT-PCR-Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym-Mix	1 µl
H ₂ O _{bidest.} (RNase frei)	9 µl

PCR- Programm:

01	LIDTH ON		110 °C
02	PAUSE 2 h		4 °C
03	LIDCL	150 N	
04	TEMP	30 min	50 °C
05	TEMP	15 min	95 °C
06	[LOOP 35x		
07	TEMP	30 s	94 °C
08	TEMP	45 s	50 °C
09	TEMP	1 min	72 °C
10	LOOP]		
11	STORE	10 s AT	8 °C
12	TEMP	FOREVER	4 °C

2.7.7. Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von RNA

Verbliebene Proteine, wie z.B. die DNase, wurden durch eine spezielle Form der Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Dazu wurde der RNA 1 Vol. saures Phenol (TE-gesättigt) zugegeben. Der Ansatz wurde 10 sec. auf dem Schüttler gründlich gemischt, und 1 min bei 13.000 Upm 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 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde erneut abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA-Konzentration erfolgte eine Fällung mit Ethanol (s. 2.5.2.2.). Die in Wasser gelöste RNA wurde mit 1/10 Vol. NaAcetat (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 Upm, 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 Upm und

4 °C zentrifugiert. Der Alkohol wurde erneut vorsichtig abgenommen. Das geöffnete Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem RNA-Pellet wurde in einem mit Alufolie verschlossenen, zuvor doppelt autoklaviertem 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 dann für 3 h bei RT unter gelegentlichem Mischen mit der Pipette inkubiert. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -70 °C.

2.7.8. 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).

2.8. Markierung der mRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen, Hybridisierung und Chip-Auswertung

Bei der Analyse der Genexpression wird die qualitative und quantitative Zusammensetzung zellulärer mRNA untersucht. Dabei werden die Expressionsstärken der Gene zweier Proben nach dem Markieren mit Cyaninfarbstoffen über Fluoreszenzintensitäten in Relation gesetzt. Eine der RNA-Proben entstammte unter Referenzbedingungen angezogenen Zellen. Die zweite Probe repräsentierte RNA aus Zellen, die unter abweichenden Versuchsbedingungen gewachsen waren. Die zur DNA/RNA-Hybridisierung verwendete *target*-RNA wurde beim Umschreiben in cDNA mit den fluoreszierenden Farbstoffen (Cy3 oder Cy5) markiert. Die nach der Hybridisierung von *probes* und *targets* durch Laseranregung erhaltenen Fluoreszenzsignale der beiden Farbstoffe wurden unabhängig voneinander mit dem GenePix 4000B-Scanner (AXON Instruments, Union City, USA) detektiert. Die Intensität der normalisierten Signale gab Aufschluss über die Hybridisierung der *targets* an die DNA-Spots auf dem Chip, und damit über den Expressionsstatus der Gene unter den untersuchten Bedingungen zum Zeitpunkt der Zellernte.

2.8.1. Markierung der RNA mit Cy3- oder Cy5-Fluoreszenzfarbstoff

Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription mit *random nonamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Die als Kontrolle verwendete *Scorecard* wurde mit *spike mix* spezifischer RNA (Lucidea TM Universal ScoreCard™, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) hybridisiert und für beide Fluoreszenzfarbstoffe mitgeführt. Im Verlauf des Umschreibens der RNA in cDNA wurden CyDye markierte dCTPs eingebaut. Die restlichen dNTPs wurden ohne eine Fluoreszenzmarkierung als Nukleotidmix zugegeben. Für die nachfolgend beschriebene Markierungsreaktion wurde in dieser Arbeit das „*CyScribe first strand cDNA labeling kit*“ (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) verwendet. Für eine Markierungsreaktion wurden 25 µg RNA benötigt. Die Reaktion begann mit dem *annealing* der *random nonamers* im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg). Aufgrund eines schlechteren Einbaus des Cy5-Fluoreszenzfarbstoffes in die RNA wurden hiervon zwei Ansätze zusammenpipettiert, für Cy3 war ein Ansatz ausreichend. Das Pipettieren der Ansätze und die weitere Behandlung der Proben erfolgte wegen der hohen Lichtempfindlichkeit der Cyanin-Farbstoffe im etwas abgedunkelten Labor. Für eine *annealing*-Reaktion wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

annealing-Ansatz:

25 µg isolierte RNA

1 µl *spike mix* für Cy3 oder Cy5 Reaktion

1 µl *random nonamers*

ad 11 µl H₂O

annealing-Programm:

01 LIDHT ON 110 °C
02 PAUSE 60 min 70 °C
03 HOLD 5 min 70 °C
04 TEMP GRADIENT 3,0 °C / min to 50 °C
05 TEMP GRADIENT 1,0 °C / min to 40 °C
06 TEMP GRADIENT 0,3 °C / min to 35 °C
07 TEMP GRADIENT 0,2 °C / min to 30 °C
08 TEMP GRADIENT 0,1 °C / min to 25 °C
09 TEMP GRADIENT 0,1 °C / min to 22 °C
10 HOLD 20 min 22 °C
11 TEMP FOREVER 4 °C

Für den Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes beim Umschreiben der RNA in cDNA im Zuge einer reversen Transkription wurden dem *annealing*-Ansatz folgende Komponenten hinzugefügt:

Ansatz für die reverse Transkription (Markierungsreaktion):

11 µl *annealing*-Ansatz
4 µl 5x ‚CyScript‘-Puffer
2 µl 0.1 M DTT
1 µl dCTP Nukleotid-Mix
1 µl dCTP CyDye-markierte Nukleotide (Cy3 oder Cy5)
1 µl CyScript Reverse Transkriptase (100 U/µl)

Für die Markierungsreaktion wurden die 20 µl Reaktionsansätze kurz gemischt, abzentrifugiert und 1,5 h bei 42 °C im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zum Entfernen nicht eingebauter CyDye-Nukleotide und der *template*-RNA erfolgte nach der Inkubation eine Aufreinigung der markierten cDNA. Die RNA wurde durch Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH, mischen für 10 s, kurz Anzentrifugieren und Inkubieren für 15 min bei 37 °C in kurze Oligomere hydrolysiert. Die Inkubation erfolgte im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Zum Neutralisieren wurden 10 µl 2 M HEPES hinzugegeben, 10 s gevortex und erneut zentrifugiert. Die Aufreinigung der markierten cDNA erfolgte über eine Säule des

CyScribe GFX Purification Kits (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Dabei wurden die drei Markierungsansätze (1 Markierungsansatz Cy3 markierte cDNA; zwei Markierungsansätze Cy5 markierte cDNA) gleichzeitig über eine Säule aufgereinigt. In die Säule wurden 500 µl *Capture Buffer* pipettiert, die Markierungsansätze hinzugegeben und mit der Pipette gemischt. Zum Binden der cDNA an das Säulenmaterial folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 s bei 13.000 Upm. Der Durchfluss wurde verworfen, das Retentat hingegen mit 600 µl Waschpuffer bei 13.000 Upm für 30 s gewaschen. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und der Waschschrift dreimal wiederholt. Die markierte cDNA wurde mit 70 µl 70 °C warmem Elutionspuffer eluiert. Dazu wurde nach 5 min Inkubation bei RT 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat konnte bis zur Hybridisierung lichtgeschützt auf Eis gelagert werden.

2.8.2. *Wavelength scan* zum Überprüfen der Markierungsreaktion

Um die Effizienz des Fluoreszenzfarbstoffeinbaus bewerten zu können, wurde die Absorption des Eluats (s. 2.8.1.) über einen Wellenlängenbereich von 700 nm – 500 nm photometrisch bestimmt (*wavelength scan*). Das Absorptionsmaximum von eingebautem Cy3 liegt bei 550 nm, das von Cy5 bei 650 nm. Für die freien Cy3 bzw. Cy5-Farbstoffe liegen die Werte bei ca. 520 bzw. 600 nm. 10 µl der aufgereinigten Markierungsreaktion wurden mit RNase freiem H₂O 1:6 verdünnt und zur Messung des Absorptionsspektrums in eine Quarzküvette (d = 1 cm) pipettiert. Die eingebauten pmol der beiden Farbstoffe konnten nun aus den Absorptionsmaxima bei 550 und 650 nm nach folgender Formel berechnet werden.

$$pmol \text{ Cy3 bzw. Cy5} = \frac{A \cdot z(\mu l) \cdot F \cdot 10^{12}}{E}$$

A = Absorption von Cy3 bei 550 nm bzw. Cy5 bei 650 nm

E = Extinktionskoeffizient von Cy3 (150000 l mol⁻¹ cm⁻¹)
bzw. Cy5 (250000 l mol⁻¹ cm⁻¹)

z = Volumen der cDNA-Lösung in µl

F = Verdünnungsfaktor

2.8.3. Hybridisieren der DNA-Microarrays mit markierter *target*-cDNA

Die Hybridisierung der DNA-Microarrays mit der markierten *target*-cDNA erfolgte vollautomatisch mit dem ‚Automated Slide Processor‘ (ASP Lucidea, Amersham Pharmacia Biotech), dessen Hybridisierungskammern vor dem Einlegen der Microarray-Träger gespült wurden. Vor der Hybridisierung der auf den Chip gespotteten *probe*-DNA mit der *target*-cDNA, musste letztere zunächst denaturiert werden. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation bei 95 °C für 2 Minuten, Abkühlung auf Eis und anschließender Zugabe von 50 µl *microarray hybridization buffer* des *CyScribe First Strand cDNA Labeling Kits* (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland), sowie 110 µl 100 % (v/v) Formamid. Der Ansatz wurde gemischt, bei 13.000 Upm kurz abzentrifugiert und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 µl des Hybridisierungsansatzes mit einer Hamiltonspritze (mit stumpfer Nadelspitze) in eine der Hybridisierungskammern des ASP, in welche bereits ein *probe*-Microarray-Chip eingelegt wurde, injiziert. Die Hybridisierung fand nach folgendem Programm statt:

ASP-Hybridisierungsprogramm:

00	Wait	<i>Check dummy slides</i> (Überprüfen, ob in jeder Kammer ein ‚dummy Slide‘ eingelegt ist)
01	Flush	Leeren der Schläuche und Kammern von alten Lösungen
02	Heat	Kammern auf 38 °C aufheizen
03	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen und leeren
04	Flush	Kammern mit Wasser spülen und leeren
05	Air Pump	Kammern für 60 s mit Luft trocknen
06	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
07	Prime	Schläuche mit Wash1 (Lösung 3) füllen
08	Wait	INSERT TEST SLIDES - test slides einlegen
09	Heat	Kammern auf 42 °C aufheizen
10	Wait	Proben-Lösung injizieren
11	Mix	mischen der Lösungen in den Kammern für 12 h
12	Flush	Kammern mit Lösung 3 spülen
13	Heat	Kammern auf 45 °C aufheizen
14	Mix	Mischen mit Wash 1 für 10 min
15	Prime	Kammern mit Lösung 4 füllen
16	Flush	Schläuche mit Wash 2 (Lösung 4) spülen
17	Mix	Mischen mit Wash 2 für 10 min
18	Flush	Kammern mit Lösung Wash 2 spülen
19	Mix	Mischen mit Wash 2 für 4 min
20	Prime	Schläuche mit Wash 3 (Lösung 2) füllen
21	Flush	Kammern mit Lösung Wash 3 spülen

22	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
23	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen
24	Flush	Kammern mit Wasser spülen
25	AirPump	Kammern mit Luft trocknen
26	Wait	Heizung ausschalten
27	Heat	TEST SLIDES Test slides entfernen und durch dummy slides ersetzen
28	Heat	Heizen auf 48 °C
29	Mix	Mischen mit Wash 2 für 5 min
30	Prime	Schläuche mit Wasser füllen
31	Flush	Kammern mit 6 ml Wasser spülen
32	Mix	Mischen mit Wasser für 5 min
33	Flush	Kammern mit 6 ml Wasser spülen
34	Flush	Kammern mit Luft spülen
35	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
36	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen
37	Flush	Kammern mit Wasser spülen
38	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen
39	Heat	Mischen mit Wash 2 für 10 min
	ENDE	

Lösungen:

Lösung 1: $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (min. Volumen 200ml)

Lösung 2: Wash 3 (0,1 x SSC)

Lösung 3: Wash 1 (1 x SSC/0,2 % SDS)

Lösung 4: Wash 2 (0,1 x SSC/0.2 % SDS)

Lösung 5: Isopropanol

Erläuterung der Programmbefehle:

Flush:	Spülen der Hybridisierungskammern und Schläuche
Prime :	Füllen der Schläuche bis zur Hybridisierungskammer
Mix:	Mixen der Lösung innerhalb der Kammer durch Vor- und Zurückpumpen
Heat:	Heizen der Kammer auf eine bestimmte Temperatur
Air Pump:	Trocknen der Kammer durch Luft
Wait:	Warten bis zu einer Bestätigung vom User

2.8.4. Quantifizierung der Arraydaten mittels ‚GenePix Pro’-Software

Die Hybridisierungsdaten wurden mit dem Scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City, USA) dokumentiert und mit Hilfe der Software GenePix Pro 4.0 oder 6.0

verarbeitet und visualisiert. Bereits während des Scannens erfolgte eine erste Normalisierung der Arraydaten über Kontroll-Proben, die sog. *Scorecard*. Hierbei handelt es sich um spezifische DNA, welche mit den *probes* gespottet wurde. Diese DNA wurde mit spezifischer RNA, die als *spike mix* dem Markierungsansatz hinzugefügt wurde (2.8.1.), hybridisiert. Die Fluoreszenzintensitäten der beiden den Markierungsansätzen hinzugefügten Kontrollen sollten idealerweise ein Verhältnis von 1:1 aufweisen. Dieses Verhältnis wurde beim vorläufigen sog. *Prescan* über die Empfindlichkeit der Photomultiplier (PMT (Photomultiplier-tube) 635 nm für Cy5; PMT 532 nm für Cy3) manuell eingestellt. Anschließend erfolgte das hochauflösende Einlesen der Fluoreszenzsignale mit folgenden Einstellungen: *Pixelsize* 10 μm *lines to average*: 1 *Focus Position*: 0 (μm), *Scan area*: ca.1000 x 7000 Pixel. Zur Quantifizierung der Fluoreszenzwerte jedes einzelnen *features* mit Hilfe der GenePix-Software musste zunächst ein Raster auf den Chip gelegt werden. Neben der genauen Erfassung auszuwertender Bereiche, wurde anhand dieser erzeugten Schablone auch jedem Spot die korrespondierende Annotation zugewiesen. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Computerprogramms (A. Ehrenreich, unveröffentlicht) wurde die Schablone, basierend auf einer Belegungsliste der zum Spotten der *probes* verwendeten 384-Kalotten-Mikrotiterplatten, in Form eines so genannten ‚gal files‘ generiert. Die Ausrichtung dieser Schablone wurde für jeden einzelnen Spot visuell überprüft und ggf. manuell korrigiert. Die Berechnung der Fluoreszenzwerte, des Hintergrunds und der Standardabweichung des Hintergrunds für beide Farbstoffe sowie des *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und des *Regression Ratio* erfolgte für jedes *feature* automatisch durch das Programm GenePix. Bei den *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* handelt es sich um jeweils unterschiedliche mathematische Ansätze zur Ermittlung des mittleren Verhältnisses der Fluoreszenz beider Kanäle, die sich in ihrer Anfälligkeit gegenüber verschiedener Fehlermöglichkeiten unterscheiden (s. 3.4.). Jedes Fluoreszenzsignal eines *features* setzt sich aus einer Vielzahl einzelner Bildelemente (Pixel) zusammen. Für jedes dieser Bildelemente liegt jeweils ein Wert der Pixelintensität bei der Wellenlänge 1 (IP, λ_1) und der Pixelintensität bei der Wellenlänge 2 (IP, λ_2) vor. Die Intensitäten beider Wellenlängen für die den definierten Spot umgebenden ‚Hintergrund-Pixel‘ werden ebenfalls mit einbezogen (IB, λ_1 und IB, λ_2). Das mittlere Fluoreszenzverhältnis eines *features* wird aus den einzelnen Pixel-Intensitäten berechnet. Das Verhältnis der Medianwerte *Ratio of Medians*, das dem geometrischen Mittel entspricht, wird häufig zur Berechnung von Mittelwerten

herangezogen, da starke Abweichungen einzelner Werte aus mathematischen Gründen das Endergebnis weniger beeinflussen, als beim dem arithmetischen Mittel entsprechenden *Ratio of Means*. Die Berechnung des *Ratio of Medians* erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\{(I_P, \lambda_2)_n\}_{med} - \{(I_B, \lambda_2)_n\}_{med}}{\{(I_P, \lambda_1)_n\}_{med} - \{(I_B, \lambda_1)_n\}_{med}}$$

Der Wert des *Ratio of Means* hingegen kann mehr von starken Abweichungen einzelner Pixelwerte beeinflusst werden. Der Wert des *Ratio of Means* errechnete sich wie folgt:

$$\frac{\sum_{i=1}^n \langle I_P, \lambda_2 - \{(I_B, \lambda_2)_m\}_{med} \rangle_i}{\sum_{i=1}^n \langle I_P, \lambda_1 - \{(I_B, \lambda_1)_m\}_{med} \rangle_i}$$

Zur Berechnung des *Regression Ratios* ist die Definition von Pixeln des *features* und der Hintergrund-Pixel durch die aufgelegte „Schablone“ nicht nötig. Jede Pixelintensität innerhalb des zweifachen Spotdurchmessers, unabhängig von seiner Position, wird in die Berechnung einbezogen. Das Verhältnis der Intensitäten beider Wellenlängen wird mittels linearer Regression zwischen den zwei resultierenden Pixelwolken ermittelt (vgl. Abb. 2).

Abb. 2: *Regression Ratio* eines einzelnen *features*.

Aufgetragen sind Fluoreszenzintensitäten der Pixel bei $\lambda = 532$ nm gegen jene bei $\lambda = 635$ nm. Schwarze Punkte bilden den Hintergrundbereich ab, gelbe heben sich vom Hintergrund ab. Die Linie stellt die mathematisch ermittelte Regressionsgerade dar, deren Steigung das durchschnittliche Verhältnis der Pixelintensitäten angibt und somit das Regressionsverhältnis oder *Regression Ratio* darstellt.

Die Ergebnisse wurden in Form einer Datentabelle und eines *Scatterplots* dargestellt. Nun wurden die Daten normalisiert. Nach der Annahme, dass eine signifikante Änderung der Expressionsrate unter den zu vergleichenden Bedingungen nur bei wenigen Genen auftritt, wurde im *Scatterplot* die Hauptwolke der Gene auf die Winkelhalbierende gelegt. Die Winkelhalbierende entspricht einem Verhältnis der Genexpressionen beider Untersuchungsbedingungen von 1. Durch logarithmische Auftragung der Expressionswerte wurden die Spots mit einem Expressionsfaktor von etwa 1 gestaucht und die Dichte der Hauptwolke erhöht (Abb. 3).

Abb. 3: Logarithmische Auftragung der Expressionswerte eines Microarrays als *Scatterplot* durch das Programm GenePix.

Die Hauptwolke der Gene liegt nach der Normalisierung im Bereich der Winkelhalbierenden.

2.8.5. Analyse der Transkriptionsdaten

Für die weitere Analyse der normalisierten Transkriptionsdaten wurden diese aus GenePix in die Excel-Software (Microsoft, Redmond, USA) exportiert. Hier wurden sämtliche Daten auf Qualität und somit Aussagekraft überprüft. Alle Daten wurden dahingehend gefiltert, dass die Fluoreszenzsignale des Rot- und Grünkanals abzüglich

des Hintergrundes und der Standardabweichung des Hintergrundes einen Wert größer Null besaßen. Als weiteres Kriterium der Spotqualität durften die nach unterschiedlichen mathematischen Verfahren berechneten Expressionsverhältnisse ‚*Ratio of Medians*‘, ‚*Ratio of Means*‘ und ‚*Regression Ratio*‘ (2.8.4.) für den jeweiligen Spot nicht mehr als 30 % voneinander abweichen. Bei größeren Diskrepanzen dieser Werte können methodische Artefakte nicht ausgeschlossen werden. Nach der Evaluation der Daten wurden alle ORFs mit mindestens dreifacher Expressionsänderung herausgefiltert, mit Vergleichsproben korreliert und ihre Funktion im Stoffwechsel beurteilt.

2.9. Quantitative *real-time* RT PCR

Die in dieser Arbeit angewandte Methode der quantitativen *real-time* RT PCR diente als unabhängige Methode zur Analyse von Expressionsdaten ausgewählter Gene. Dies ermöglichte eine Kontrolle der DNA Microarray Ergebnisse. Ein entscheidendes Werkzeug der *real-time* RT PCR sind Farbstoffe oder Fluorophore, über deren Signal nach Bindung an die DNA die Kinetik der Polynukleotidsynthese per PCR verfolgt werden kann. Dazu wurde in dieser Arbeit mRNA der Zellen präpariert, die in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben wurde. Dabei interkalierte das Fluorophor *SYBR green* unspezifisch in doppelsträngige DNA. Zunächst verläuft die PCR-Produktbildung annähernd linear. Limitierende Faktoren wie z.B. die Abnahme der dNTP-Konzentration, verminderte Enzymaktivität und / oder die Anhäufung von Pyrophosphat verlangsamten jedoch die Produktbildung in der späten Phase der PCR-Reaktion. Die Quantifizierung bei der *real-time* RT PCR erfolgte über den so genannten C_T -Wert (*cycle threshold*). Hierbei handelt es sich um die Zykluszahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal einer Probe eine Signifikanzgrenze überschreitet. Anhand einer Standardkurve können definierten *template*-Mengen C_T -Werte zugewiesen werden. Beim Vergleich zweier Versuchsbedingungen hinsichtlich der Expression eines ausgewählten Genes war eine solche Bestimmung der absoluten *template*-Menge nicht notwendig. In diesem Fall wurden Vergleichsproben als Positiv- bzw. Negativkontrolle in das Experiment einbezogen und lediglich die relativen C_T -Werte betrachtet.

Die Primer der ausgewählten Gene wurden mit einer Länge von 20-23 bp und einer Schmelztemperatur von etwa 64 °C generiert. Die Länge des erwarteten PCR-Produktes sollte bei allen untersuchten ORFs bei ca. 150 bp liegen. Sämtliche Arbeiten waren unter RNase freien Bedingungen durchzuführen. In dieser Arbeit wurden das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) und das iCycler iQTM *real-time* PCR Detection System der Firma BioRad (München) verwendet. Für den Ansatz der *real-time* RT PCR wurde zuerst ein Mastermix, bestehend aus QuantiTect Mastermix (Kit-Inhalt) und dem Enzymmix (ebenfalls 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. Dazu wurden 20 µl des *Premix* pipettiert. Derart wurden mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit alle Reaktionskomponenten gleichmäßig auf die einzelnen Ansätze verteilt.

25 µl Ansatz für die quantitative *real-time* PCR:

2,5 µl Primer A (5 µM)
2,5 µl Primer B (5 µM)
12,5 µl Quantitect Mastermix
0,25 µl Enzymmix
400 ng RNA
ad 25 µl H₂O_{bidest} (RNase frei)

I-Cycler PCR-Programm:

Cycle 1: (1x) Step 1: 50.0 °C, 30 min (Reverse Transkription)
Cycle 2: (1x) Step 1: 95.0 °C, 15 min (Aktivierung der DNA-Polymerase)
Cycle 3: (45 Wiederholungen)
 Step 1: 94.0 °C, 15 s (PCR)
 Step 2: 59.0 °C, 30 s
 Step 3: 72.0 °C, 30 s
Cycle 4: (1x) Step 1: 55.0 °C, 1 min (finale Elongation)
Cycle 5: (80 Wiederholungen)
 Step 1: 55.0 °C, 10 s + 0,5 °C ab Cycle 2
 (Ermittlung des Schmelzpunktes der PCR Produkte)
Cycle 6: (1x) Step 1: 4.0 °C, HOLD

2.10. Proteinpräparation aus *G. oxydans* und Proteinfractionierung

2.10.1. Zellanzucht und Ernte für die Proteinaufreinigung und für biochemische Untersuchungen an *G. oxydans* 621H

Für biochemische Untersuchungen an Rohextrakt sowie an nicht weiter aufgereinigten Proteinen im Cytoplasma oder der Membranfraktion waren kleinere Volumina Zellsuspension ausreichend. Diese konnten wie unter 2.4.5. beschrieben in Schikanekolben angezogen werden. Die Ernte der Zellen erfolgte hier durch Zentrifugation in Polypropylen-Bechern in einem GSA-Rotor bei 4 °C und 6000 U/min für 10 Minuten (Sorvall Zentrifuge RC-5B, Fa. Du Pont, Bad Homburg, Deutschland). Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.10.2. beschrieben mittels French-Press.

Für die säulenchromatographische Aufreinigung von Proteinen war ein größeres Bakterienkulturvolumen als Ausgangsmaterial notwendig. Um hier nicht mit Schikanekolben arbeiten zu müssen, wurden 20 l Steilbrustflaschen eingesetzt. Diese wurden mit Butylgummistopfen verschlossen. Die Versorgung der strikt aeroben *Gluconobacter*-Zellen mit Sauerstoff wurde über ein Steigrohr sichergestellt, durch das Pressluft strömte. Diese wurde zuvor über ein Gasdruck-Schlauchsystem durch eine autoklavierte, wattegefüllte Glasolive geleitet, um Luftkeime abzufiltern. Der kräftige Gasdurchfluss sorgte gleichzeitig für eine gute Durchmischung der Kultur. Bei zu starker Schaumbildung konnte über eine Metall-Luer-Lock-Verbindung zu einem Ernte-steigrohr mittels einer Spritze Antischaum auf Silikonbasis (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in die Suspension gegeben werden. Über das genannte Ernte-Steigrohr konnten mit Hilfe einer Spritze auch steril Proben entnommen werden, um die Reinheit und die optische Dichte der Kultur regelmäßig zu überprüfen. Durch ein Entlüftungsrohr mit einer weiteren wattegefüllten Glasolive wurde der Überdruck aus der Steilbrustflasche abgeleitet.

Zur Ernte der Zellen wurde die Flasche von der Gaszufuhr getrennt und das Ernte-Steigrohr über die Luer-Lock-Verbindung mit einem Silikonschlauch verbunden, der zum Rotor einer Durchlaufzentrifuge (Contifuge 17 RS, HERAEUS Sepatech GmbH, Osterode/Harz) führte, mit der die Zellen pelletiert wurden.

2.10.2. Zellaufschluss zur Proteinanreicherung oder für proteinbiochemische Untersuchungen an *G. oxydans* 621H

Im Vergleich zum Zellaufschluss zur DNA- oder RNA-Präparation, musste für proteinbiochemische Untersuchungen cytoplasmatischer oder membrangebundener Enzyme ein relativ großes Volumen Zellpellet aufgeschlossen werden. Diese Notwendigkeit ergab sich beispielsweise aus dem Proteinverlust bei säulenchromatographischen Enzymanreicherungen. Während kleine Pelletvolumina mittels Zelmühle aufgeschlossen werden konnten, wurden größere Mengen mit der French-Press aufgeschlossen.

Für den Aufschluss mittels French-Press wurden entweder frische Zellpellets oder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefrorene Zellen verwendet. Diese wurden in mindestens 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) pro Gramm Frischgewicht des Zellpellets aufgenommen und in einen vorgekühlten Frenchpresszylinder überführt. Der Aufschluss erfolgte durch wiederholte Passage durch die French-Press (Fa. SLM Aminco Inc., Urbana, USA) bei einem Druck von 75,84 bar (1100 psig). Die beim Zellaufschluss austretende DNA erhöht die Viskosität der Suspension und kann diesen Vorgang stark beeinträchtigen. In einem solchen Fall wurde eine Spatelspitze Deoxyribonuklease I in die Suspension gemischt. Die Vollständigkeit des Zellaufschlusses wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die resultierende Suspension wurde als Rohextrakt bezeichnet. Nicht aufgeschlossene Zellen und große Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation im SS34-Rotor (10 000 x g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sedimentiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und als gereinigtes Rohextrakt (*clarified raw extract*) bezeichnet.

2.10.3. Trennung von Cytoplasma und Membranen

Das gereinigte Rohextrakt wurde auf Ultrazentrifugenbecher des Typs T 647.5 verteilt. Je nach Volumen des gereinigten Rohextraktes musste der Zentrifugenbecher ggf. mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer aufgefüllt, bzw. austariert werden. Die Zentrifugation zum Pelletieren der Membranen erfolgte im T 647.5 Rotor in einer Sorvall Ultra 80Pro Ultrazentrifuge bei 120 000 x g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 Stunden. Die Cytoplasmafraktion (der

Überstand) wurde vorsichtig abgenommen und in Falcon-Tubes gekühlt aufbewahrt. Die Membranpellets wurden in einem Volumen Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) aufgenommen, resuspendiert und während einer einstündigen Ultrazentrifugation erneut pelletiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und das resultierende Pellet gewaschener Membranen in Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Der Proteingehalt dieser Suspension wurde nach der Bradford-Methode (s. 2.12.1.) bestimmt.

2.10.4. Solubilisieren der Membranproteine

Die Aufreinigung von membrangebundenen Enzymen macht ein sogenanntes Solubilisieren von Proteinen erforderlich. Hierbei finden sich Detergenzmoleküle in wässriger Umgebung zu Micellen zusammen. Hydrophobe Reste dieser Detergenzmoleküle lagern sich dabei an hydrophobe Bereiche der Membranproteine, wobei sie einen Teil der Membran-Phospholipide verdrängen. Ziel einer effizienten Solubilisierung ist es, möglichst viele Micellen zu erhalten, die aus Detergenzmolekülen, Membranproteinen und Phospholipiden bestehen und somit die Membranproteine in Lösung bringen. Die Solubilisierungseffizienz hängt vom verwendeten Detergenz und der Detergenzkonzentration ab, und ist für das jeweils aufzureinigende Protein zu testen. Eine gewichtige Rolle spielt auch die Art des verwendeten Puffers. Da Phosphatpuffer mit Konzentrationen von 0,1 bis 0,2 M häufig die Solubilisierungskraft des Detergenzes verstärkt, wurde in den hier beschriebenen Experimenten 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 verwendet. In dieser Arbeit war eine membrangebundene Dehydrogenase aufzureinigen, die eine oxidierende Aktivität gegenüber Hydroxypiperidin-Derivaten aufweist. Zur Solubilisierung wurde die zuvor präparierte Membranfraktion (vgl. 2.10.3.) mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS versetzt. Eine Detergenzkonzentration von 2,0 mg Detergenz pro mg Protein hatte sich in Vorversuchen als am besten geeignet herausgestellt und wurde für alle weiteren Solubilisierungen eingesetzt. Nach der Zugabe des Detergenz und einer Inkubation für mindestens 1 h unter Rühren auf Eis, folgte ein dreißigminütiger Zentrifugationsschritt (120 000 x g, 4 °C, T 647.5 Rotor). Zentrifugiert wurde in einer Sorvall Ultra 80Pro Ultrazentrifuge. Das Pellet bestand aus nicht solubilisierten Partikeln und wurde verworfen. Der sog. CHAPS-Überstand wurde auf Eis bis zur weiteren Verwendung gekühlt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes nach BRADFORD (2.12.1.) und der

Enzymaktivität wurden Aliquots entnommen. Als Solubilisationspuffer diente in der Regel der in 2.3.7. genannte 0,1 M Kaliumphosphatpuffer.

2.11. Säulenchromatographische Reinigung einer membrangebundenen Dehydrogenase mit oxidativer Aktivität gegenüber Piperidin-Derivaten

Wie bereits im Kapitel 2.10.3. beschrieben, wurde zunächst durch Ultrazentrifugationsschritte die partikuläre und die lösliche Fraktion voneinander getrennt. Nach einer in 2.10.4. beschriebenen Solubilisierung der Membranproteine schlossen sich zur Enzymanreicherung und Aufreinigung verschiedene Flüssigchromatographieschritte an. Hierfür waren zunächst die Chromatographiematerialien (Matrices) nach Vorschrift in die Borosilicatglaszylinder zu packen. Die entsprechenden Säulen wurden an einem computergestützten ÄKTAexplorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) Chromatographiesystem angeschlossen, das aus einem buffer-prep Modul mit zwei Serie P-900-Pumpen zur automatischen Puffermischung, einer Photomesszelle (Monitor UV-900), pH- und Leitfähigkeitsmesszelle (Monitor pH/C-900) und einem Mixer M-925 bestand. Über motorgetriebene Ventile konnten Verbindungen zu Säulen oder Puffern separat angesteuert werden. Durch einen mit der Anlage verbundenen Fraktionssammler (Frac-900) erfolgte die Trennung der Eluate automatisch. Über den angeschlossenen PC konnte durch die *UNICORN*-Software, Version 3.10.11., ein Chromatographieprotokoll zur Steuerung der FPLC-Anlage erstellt werden. Hierdurch ließen sich Äquilibrierungs-, Elutions-, und Fraktionsvolumina ebenso vorwählen wie die Steilheit von selbstdefinierten Salzgradienten. Dieses Programm bietet außerdem die Möglichkeit einer Kontrolle während des Laufs und einer Datenevaluation, da alle Messdaten gespeichert werden konnten. Ebenfalls angeschlossen war ein MultiTemp III Wasserbad (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), mit dem die doppelwandigen Chromatographiesäulen (ebenfalls Fa. Amersham Pharmacia) auf 4 °C gekühlt werden konnten.

2.11.1. Proteinreinigung mittels Flüssigchromatographie

Für die Reinigung von Proteinen durch Chromatographie an verschiedenen Matrices wurden die dazu notwendigen Chromatographie-Säulen (XK 16/10, XK 26/20, XK 16/60; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) an eine ÄKTAexplorer-10 Chromatographie-Anlage angeschlossen. Beim Betrieb der Anlage wurde ein Gegendruck von 4 Bar (3 Bar bei der Gelfiltration) nicht überschritten, um die Borosilicatzylinder der Säulen nicht zu beschädigen und die Säulenmaterialien nicht zu sehr zu kompaktieren. Die ersten Proteintrennungen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (IC) durchgeführt. Bei der IC werden schwache und starke Ionenaustauscher unterschieden. Die Begriffe ‚schwach‘ und ‚stark‘ bedeuten hier jedoch nicht die Bindungsstärke des Proteins an dem Material. Vielmehr weisen sie auf die Veränderung des Ionisierungszustandes der funktionellen Gruppen des Säulenmaterials mit dem pH-Wert hin.

2.11.1.1. Detergenzhaltige Säulenpuffer

Zur Verdünnung von Membransolubilisaten sowie zum Auftragen der Proteinsuspensionen auf die Chromatographiesäulen wurde ein Kaliumphosphatpuffer (0,01 M oder 0,1 M) verwendet. Diesen Puffern war das der Solubilisierung entsprechende Detergenz CHAPS zugesetzt, um die Protein-Detergenzmicellen zu stabilisieren (Tabelle 6.).

Tab. 6: Detergenzhaltige Säulenpuffer (Puffer A)

Detergenz	Säulenmatrix	CHAPS-Konzentration / Zusatz
CHAPS	QSHP ^a	0,5 mM
	PSHP ^b	0,5 mM + 1,7 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	SP-Sepharose	0,5 mM

^a = Q-Sepharose HP; ^b = Phenylsepharose HP

Mit Ausnahme der Phenylsepharose (hydrophobe Interaktionschromatographie) erfolgte die Proteinelution mit einem steigenden Salzgradienten. Wie beim Säulenpuffer (Puffer A) wurde auch zur Elution Kaliumphosphatpuffer verwendet, der außer dem

entsprechenden Detergenz auch das zur Elution notwendige Salz enthielt. Die Konzentrationen dieser Zusätze sind in Tabelle 7 angegeben.

Tab. 7: Detergenzhaltige Elutionspuffer (Puffer B)

Detergenz	Säulenmatrix	CHAPS-Konzentration / Zusatz
CHAPS	QSHP ^a	0,5 mM + 1 M NaCl
	PSHP ^b	0,5 mM
	SP-Sepharose	0,5 mM + 1 M NaCl

^a = Q-Sepharose HP; ^b = Phenylsepharose HP

2.11.1.2. Reinigung von Membranproteinen an einer Q-Sepharose HP-Matrix

Zur Enzymanreicherung wurde der nach dem Solubilisieren erhaltene Detergenz-Überstand auf eine Q-Sepharose HP-Matrix aufgetragen. Grundsätzlich besteht solch ein Ionenaustauscher aus einer unlöslichen Matrix; woran geladene Gruppen kovalent gebunden sind. Diese geladenen Gruppen interagieren mit Gegenionen in der mobilen Phase. Diese Gegenionen sind wiederum gegen Ionen / Moleküle derselben Ladung reversibel austauschbar. Bei der Q-Sepharose HP handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher, der in Kombination mit einer XK 16/10-Säule verwendet wurde. Die Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 34 µm erlaubten hohe Flussraten, die zwischen 2,5 und 3,0 ml/min eingestellt werden konnten. Die Wirkung dieser Matrix beruht auf einer Bindung von negativ geladenen Ionen oder Molekülen. An das Material gebundene Proteine konnten daher durch einen NaCl-Gradienten im Bereich von 0 bis 1 M eluiert werden, wobei die Cl⁻-Ionen die gebundenen Proteine verdrängten. Die Trennung der Proteine basierte auf einer Elution in der Reihenfolge ihrer Bindungsstärke zum Chromatographiematerial. Dabei war zu beachten, dass die Nettoladung von Proteinen vom pH-Wert abhängig ist. Die Proteine banden also erst oberhalb ihres isoelektrischen Punktes an das Material. Zum Packen der Säule wurde ein detergenzhaltiger Säulenpuffer verwendet. Das Packen erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Bei der Proteinelution wurden Fraktionen bis zu 10 ml aufgefangen. Das Säulenmaterial wurde nach Beendigung des Säulenlaufs aus der Säule genommen und regeneriert.

2.11.1.3. Ionenaustauschchromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)

Neben dem starken Anionenaustauscher QSHP wurden die solubilisierten Membranproteine auch auf einen schwachen Anionenaustauscher aufgetragen. Hierfür wurde das Chromatographiematerial DEAE-Sephacel (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) ausgewählt, da in vorangegangenen Arbeiten mit membrangebundenen Enzymen aus *Gluconobacter oxydans* in diesem Institut bereits gute Erfolge erzielt werden konnten (HEMMERLING, 1995). DEAE-Sephacel basiert auf Cellulose-Perlen und wird typischerweise für Standard-Trennungen über einen großen Molekulargewichtsbereich eingesetzt. Zum luftblasenfreien Packen der Säule nach Vorschrift des Herstellers und zum Äquilibrieren des Materials wurde 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 verwendet. Dem Puffer war das Detergenz CHAPS in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt worden. Das gereinigte Rohextrakt wurde auf die Säule aufgetragen um dann mit dem Säulenpuffer nichtgebundene Proteine auszuwaschen. Mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten von 0 – 1,5 M erfolgte die Elution der Proteine bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Das Eluat wurde in 5 bis 10 ml Fraktionen aufgefangen.

Nach Beendigung der Chromatographie wurde das Säulenmaterial aus dem Glaszylinder entfernt und auf einer Fritte gereinigt. Zum Beschleunigen der Waschschritte wurde an die Fritte ein leichtes Vakuum zum Durchsaugen der Flüssigkeit angelegt. Das Waschen des Materials erfolgte in mehreren Schritten. Dazu wurden nacheinander $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, 0,5 M HCl, 0,5 M NaOH und 3 M NaCl verwendet. Das so regenerierte Gelmaterial wurde in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.11.1.4. Chromatographie am Kationenaustauscher SP-Sepharose HP

Eine Proteinaufreinigung mittels Kationen-Austauschermatrix wurde an einem SP-Sepharose HP-Material durchgeführt. Wie bei dem Anionenaustauscher Q-Sepharose HP, hatten auch die Partikel dieser Matrix einen durchschnittlichen Durchmesser von 34 μm , was hohe Flussraten ermöglichte. Die Wirkung dieser Matrix beruht auf einer Bindung von positiv geladenen Ionen oder Molekülen. An das Material gebundene Proteine konnten daher, wie bei der Q-Sepharose HP-Säule, durch einen NaCl-

Gradienten im Bereich von 0 – 1 M Salz eluiert werden, wobei hier jedoch die Na^+ -Ionen die gebundenen Proteine verdrängen. Zum Packen der Säule wurde ein Säulenpuffer verwendet, der das jeweilig verwendete Detergenz enthielt. Das Packen erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.11.1.5. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose HP

Diese Methode beruht auf der Trennung von Proteinen nach den hydrophoben Eigenschaften ihrer Oberflächen. Diese Trennung schien für die Aufreinigung eines gesuchten Membranproteins geeignet, da Membranproteine aufgrund ihrer Lokalisation häufig Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Interaktion zwischen Proteinen und Matrix wurde durch Verwendung von 1,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im detergenzhaltigen Säulenpuffer verstärkt. Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Chromatographiesäulen erfolgte die Protein-elution hier durch einen abfallenden Salzgradienten. Die Packung des Säulenmaterials wurde nach Vorschrift des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt.

2.11.1.6. Affinitätschromatographie an Reactive Red, Reactive Green und blauer Sepharose

Bei der Affinitätschromatographie werden strukturelle Ähnlichkeiten des Säulenmaterials (vor allem von immobilisierten Farbstoffen) zu Substrat- / Kofaktorbindestellen von Proteinen genutzt. Aber auch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen können bei diesen Materialien eine Rolle zur Proteintrennung spielen. Eine spezifische Interaktion zu Proteinbindestellen kann nicht vorhergesagt werden. Ein Test verschiedener reaktiver Farbstoffe ist daher unerlässlich und wurde in dieser Arbeit mit den nachfolgend in ihrer Partialstruktur dargestellten Chromatographiematerialien durchgeführt (s. Abbildungen.: 4-6).

Blaue Sepharose CL-6B **Abb. 4: Partialstruktur der blauen Sepharose CL-6B.**Reactive Red 120 **Abb. 5: Partialstruktur der Affinitätschromatographiematrix Reactive Red 120.**Reactive Green 19 **Abb. 6: Partialstruktur der Affinitätschromatographiematrix Reactive Green 19.**

2.11.1.7. Kombinierte Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie am Toyopearl AF-Blue HC 650 M-Säulenmaterial.

Diese neuentwickelte Affinitätschromatographiematrix auf Methacrylatpolymer-Basis besitzt eine Cibacron Blue F3GA funktionelle Gruppe (Fa. TOSOH Bioscience, Stuttgart). Allgemein haben sich Cibacron-Farbstoffe bei der Aufreinigung von Dehydrogenasen und Kinasen bewährt (LAMKIN und KING, 1976; THOMPSON *et al.*, 1975; KOBAYASHI und FANG, 1976), wobei Strukturähnlichkeiten der affinen Gruppe zu Substraten oder Kofaktoren ausgenutzt wurden (vgl. Abb. 7). Gleichzeitig erlaubt dieses Material eine Kationen-Austauschchromatographie.

Abb. 7: Partialstruktur des Toyopearl AF-Blue HC 650 M-Säulenmaterials.

2.12. Standardtechniken zum Arbeiten mit Proteinen

2.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach BRADFORD (1976, mod.). 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. 20 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (BIOQUANT Protein, MERCK, Darmstadt) vermischt und für mind.

5 min bei RT inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes erfolgte die Inkubation im dunklen. Vor der photometrischen Messung wurde die Reagenz/Protein-Suspension nochmals mit einer Pipette durchmischt. Die Extinktionsmessung erfolgte in 1 ml Polystyrol-Küvetten (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 595 nm im UV/Vis Spectrophotometer (Jasco V-530; Fa. Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gotha, Deutschland oder UVIKONxs, BIO-TEK Instruments Inc., Bad Friedrichshall, Deutschland). Zur Bestimmung des Leerwertes wurde das Bradford-Reagenz in einer weiteren Küvette mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ anstelle der Probe versetzt und identisch behandelt.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen aus den gemessenen Extinktionen wurde eine Eichreihe mit Proteingehalten von 0,1-1,0 mg BSA/ml erstellt. Es wurden 20 μl der Eich-Proteinsuspension mit 1 ml Reagenz gemischt und für 5 min im dunklen bei RT inkubiert. Nach erneuter Durchmischung erfolgte die Messung gegen einen Leerwert, bestehend aus $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und Bradford-Reagenz (s.o.) bei 595 nm.

2.12.2. Einengen und Entsalzen von Proteinlösungen mittels Zentrifugenkonzentrationsröhrchen

Centrisart- (Fa. Sartorius, Göttingen), Vivaspin- (Vivascience, Hannover) und Centriplus- (Fa. Amicon, Witten) Ultrafiltrations-Zentrifugenkonzentratoren eignen sich zum Einengen kleiner Proteinmengen. Außerdem können durch die Ultrafiltration bereits Zellbestandteile abgetrennt werden. Dieser Effekt wurde z.B. bei der Proteinkonzentration für die Aldolase-Tests (s. 2.14.2.) genutzt. Hier waren niedermolekulare Substanzen abzutrennen. Die verwendeten Vivascience-Konzentratoren besaßen eine Porenweite von 10.000 Da (= molecular weight cut-off, MWCO), die Centrisart-Röhrchen 20.000 Da, bei den Centriprep-Röhrchen lag der MWCO bei 100.000 Da. Die entsprechenden Röhrchen wurden nach dem Befüllen bei $3000 \times g$ für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Sehr große Proteingehalte führten zum Zusetzen der Filtermembran der Röhrchen. Die Zentrifugation wurde dann unterbrochen um die pelletierten Proteine vorsichtig von der Membran zu spülen. Anschließend wurde weiter zentrifugiert, bis ein Konzentratvolumen von etwa 200 μl erhalten wurde. Das Retentat wurde danach zur Schonung der Filtermembran mit einer durch einen

Silikonschlauch geschützten Pasteurpipette resuspendiert und entnommen. Die Außenröhrchen konnten nach Gebrauch mit 0,5 N NaOH gereinigt werden. Die empfindlichen Innenröhrchen mit der Filtermembran wurden nur mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gereinigt. Anschließend wurden die Röhrchen mit Parafilm abgedeckt und so, gegen Austrocknung geschützt, bei 4 °C gelagert. Eine alternative Möglichkeit der Lagerung bestand in der Trocknung der Röhrchen. Dazu wurden in die Konzentratoren 0,5 ml einer 10 %igen Glycerinlösung (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) pipettiert und die Röhrchen dann getrocknet. So konnte verhindert werden, dass die Filtermembranen schrumpfen, sich vom Trägermaterial lösen und die Filtrationsröhrchen dadurch unbrauchbar wurden.

2.12.3. Bestimmung der molekularen Masse und der Reinheit von Proteinen

2.12.3.1. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung im nativen, diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengel (4-20 %) wurden Fertiggele der Fa. Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) verwendet. Bei der nativen Proteinauftrennung wird die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld genutzt. Im linearen Gel ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Teilchengröße und der Anzahl ihrer Ladungen abhängig. Im Gradientengel werden die Proteine aufgrund der zunehmenden Geldichte ihrer Größe entsprechend zurückgehalten. Sie trennen sich nach abnehmender Größe auf und können mit Protein-Größenstandards (s. Tab. 8) verglichen werden. Die Standards wurden gleichzeitig mit der Probe auf das Gel aufgetragen. Proben und Standards waren ggf. mit Elektrodenpuffer zu verdünnen, wurden 10 %ig (v/v) mit Beschwererlösung versetzt und mit einer Hamilton-Spritze (Hamilton, Reno, USA) in die gespülten Taschen gefüllt. Danach wurde eine konstante Stromstärke von 20 mA angelegt, bis die Bromphenolblau-Bande am unteren Gelrand angelangt war.

Nach Anfärben der Gele wurde die Molekularmasse von Proteinen durch Vergleich ihrer Wanderungsstrecke im Gel mit jener der Markerproteine bestimmt. Das Auftragen des Logarithmus der Molekularmassen der Standardproteine gegen deren R_f -Wert ergab eine Eichgerade, woraus die Molekularmasse unbekannter Proteine abgelesen wurde.

$$\text{Rf-Wert} = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Proteins}}{\text{Wanderungsstrecke des Farbstoffes}}$$

Tab. 8: Größenstandard der nativ-PAGE

Standardproteine	HMW-Marker [kDa] ^a
Thyroglobulin	669
Ferritin	440
Katalase	232
Lactat-Dehydrogenase	140
Rinderserumalbumin	67

^aFa. Pharmacia GmbH, Freiburg

Für die Elektrophorese wurden folgende Lösungen benötigt:

Elektrodenpuffer

Tris	1,2 g
Glycin	5,76 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Beschwererlösung

Saccharose	4,0 g
Bromphenolblau	0,005 g
Elektrodenpuffer	ad 10 ml

2.12.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Reinheitskontrolle und Molekularmassenbestimmung wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE nach LAEMMLI, 1970; modifiziert). Insbesondere nach Reduktion der Proteine mit z.B. Mercaptoethanol zerstört das anionische Detergenz SDS die Quartärstruktur von Proteinen, und lagert sich an die hydrophoben Regionen des Proteins an. Dadurch wird die Eigenladung des Proteins überdeckt, und es findet nur noch eine Auftrennung nach

der Masse und nicht nach der Ladung statt. Zur Erhöhung der Trennungsleistung arbeitet man zusätzlich mit diskontinuierlichen Gelen, bestehend aus einem Trenngel, das mit einem Sammelgel überschichtet wird. An der Grenze zwischen dem Trenngel und dem Sammelgel entsteht ein pH- und meist auch ein Acrylamid-Konzentrationsprung. Diese Diskontinuität führt dazu, dass sich die aus der Geltasche ins Sammelgel eingelaufenen Proteine an der erwähnten Sprungschicht zunächst sammeln, und dann konzentriert in das Trenngel einwandern. Das wiederum führt zu schärferen Proteinbanden.

Tab. 9: Größenstandard der SDS-Gelelektrophorese

Standardproteine	LMW-Marker [kDa] ^a
Phosphorylase b	94,0
Rinderserumalbumin	67,0
Ovalbumin	43,0
Carboanhydrase	30,0
Trypsin-Inhibitor	20,1
Lactalbumin	14,4

^aFa. Pharmacia GmbH, Freiburg

Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresekammer (Fa. Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) mit 10,1 cm x 8 cm Glasplatten und 1 mm Spacern durchgeführt.

Polyacrylamid-Gele konnten bis zu zwei Wochen im Voraus gegossen werden. In diesem Fall wurden sie zusammen mit zwei Milliliter Elektrodenpuffer in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert. Die zur Anfertigung der Gele benötigten Lösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

<u>Acrylamid-Lösung</u>	Acrylamid	30,0 g
	Bisacrylamid	0,8 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	Anschließend erfolgte eine Filtration.	

<u>Trenngelpuffer</u>	Tris/HCl	22,77 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	pH 8,8 (mit HCl eingestellt)	
<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris/HCl	7,57 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	pH 6,8 (mit HCl eingestellt)	
<u>SDS-Lösung</u>	SDS	0,5 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
<u>Ammoniumpersulfat-Lösung</u>	APS	0,1 g
	H ₂ O _{bidest.}	940 µl
<u>Elektrodenpuffer</u>	Tris	3,0 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1,0 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	pH 8,3 mit Glycin einstellen	
<u>Probenauftragspuffer I</u> = (PAP)	Sammelgelpuffer	2,0 ml
	SDS	0,2 g
	Bromphenolblau (1 % in Ethanol)	0,1 ml
	Mercaptoethanol	0,5 ml
	Glycerin	5,0 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 10,0 ml

<u>Probenauftragspuffer II</u>	Sammelgelpuffer	ad 10,0 ml
= (UPAP)	SDS	1,2 g
	Bromphenolblau	1,0 mg
	Mercaptoethanol	0,6 ml
	Glycerin	5,0 ml

Die Lösungen wurden je nach gewünschter Acrylamidkonzentration gemischt (s. Tab. 10).

Tab. 10: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamid-Gele

Lösung	Trenngel (6 ml)			Sammelgel (2 ml)
	14 %	10 %	8 %	5 %
Acrylamid-Lösung	2,8 ml	2,0 ml	1,6 ml	0,33 ml
Trenngelpuffer	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,4 ml
SDS-Lösung	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	0,4 ml
H ₂ O _{bidest.}	0,8 ml	1,6 ml	2,0 ml	0,87 ml
TEMED	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
APS	30,0 µl	30,0 µl	30,0 µl	30,0 µl

Die einzelnen Komponenten des Trenngels wurden gemischt, zwischen die mit H₂O_{bidest.} und Ethanol (70 % [v/v]) gesäuberten Glasplatten gegossen und mit H₂O_{bidest.} überschichtet. Das Überschichten der Acrylamidlösung mit H₂O_{bidest.} verhinderte einen direkten Luftsauerstoff-Zutritt. Luftsauerstoff würde den Katalyseprozess der Acrylamid-Polymerisation an der Geloberfläche stören, und verhindern, dass eine ebene Grenzfläche entsteht. Nach dem Polymerisieren wurde das überstehende Wasser mit Filterpapier entfernt, die frisch angesetzte Sammelgellösung über das Trenngel geschichtet und der Kamm zur Taschenformung luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Dichtung und der Kamm entfernt und das Gel in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gespannt. Zum Entfernen störender Gelreste und Luftblasen, die beim Herausziehen des Kammes entstehen können, wurden die Geltaschen vor der Gelbeladung vorsichtig mit dem

Elektrodenpuffer gespült. 25 µl der Probe (Proteingehalt 8-20 µg) wurden mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer vermischt und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Mit einer Hamiltonspritze wurden jeweils 20 µl des denaturierten Proteins aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei RT und einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Sie wurde beendet, wenn die blaugefärbte Lauffront das Gelende erreicht hatte.

2.12.4. Silberfärbung der Polyacrylamidgele nach BLUM *et al.* (1987; mod.)

Die Silberfärbung gilt als eine sehr empfindliche Färbemethode, da selbst sehr geringe Mengen Protein nachgewiesen werden können. Hierbei gehen Ag^+ -Ionen eine Komplexbildung mit den Aminosäureresten Glu, Asp und Cys ein. Durch die Behandlung mit alkalischem Formaldehyd wird das komplexierte Silberkation zu Silber reduziert, was zu gefärbten Proteinbanden führt.

Im Anschluss an die folgenden Arbeitsschritte der Proteinfärbung finden sich die Zusammensetzungen der hierfür benötigten Lösungen.

1. Inkubation des Gels in Fixiererlösung für mindestens 1 h
2. 3 x Waschen in 50 % Ethanol (v/v), jeweils 1 min
3. 1 min Inkubation in Thiosulfatlösung
4. 3 x 10 sec waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
5. 20 minütige Inkubation in Imprägnierlösung
6. 2 x 10 sec waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
7. Behandlung mit Entwicklerlösung bis zur deutlichen Färbung der Banden im Gel
8. 2 x 10 sec mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ waschen
9. Inkubation in Stopplösung, bis eine leichte Trübung sichtbar wird
10. Mindestens 15 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ waschen

Die Gele wurden nach der Färbeprozedur in Plastikfolie eingeschweißt und mit Hilfe eines Scanners dokumentiert. Bei der Aufbewahrung der Gele besteht die Gefahr eines Nachdunkelns, so dass das Dokumentieren möglichst bald nach dem Färben erfolgen sollte. Die abschließende Lagerung der eingeschweißten Gele erfolgte bei 4 °C.

Fixiererlösung

Methanol	500 ml
Eisessig	120 ml
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Thiosulfatlösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	0,2 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Imprägnierlösung

AgNO ₃	2,0 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,75 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃	60,0 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	4,0 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Stopplösung

EDTA	18,6 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Ein pH-Wert zwischen 7 und 8 wurde mit NaOH eingestellt

2.13. Massenspektrometrische Proteinidentifikation

Mit Hilfe der FPLC wurde die Membranfraktion von *Gluconobacter oxydans* aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre oxidative Eigenschaft gegenüber Hydroxypiperidinderivaten untersucht und auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Proteine, die per Silberfärbung (vgl. 2.12.4.) im Polyacrylamidgel (vgl. 2.12.3.2.) sichtbar gemacht wurden, sollten anschließend identifiziert werden. Die Identifikation erfolgte mittels einer nano-Elektrospray-Ionisations- (ESI) Massenspektrometrie. Hierzu wurden zunächst die Banden aus dem Acrylamid-Gel ausgeschnitten und tryptisch nach der Methode von SHEVCHENKO *et al.*, 1996, im Gel verdaut. Die entstandenen Peptide wurden mittels Wasser-Acetonitril-Gradienten auf einer Dionex-NAN75-15-03-C18-PM-Säule abgetrennt. Hierfür wurde ein Ultimate-nano-HPLC-System (Dionex, Bavel, Niederlande) verwendet. Online ESI-MS/MS²-Spektren wurden durch Verwendung eines LCQ-DecaXP^{plus} Massenspektrometers (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) erhalten. Die im Rahmen einer Doktorarbeit (PRUST, 2004) erstellte vollständige Genomsequenz von *Gluconobacter oxydans* 621H diente als Datenbank für die Identifikation der Proteine. Diese Analyse erfolgte mit Hilfe der Software SEQUEST/TURBOSEQUENT (Bioworks Browser 3.1, Thermo Finnigan). Die Proteinidentifikation wurde freundlicherweise durchgeführt von Dr. O. Valerius, Universität Göttingen.

2.14. Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

2.14.1. Enzymtest für membrangebundene Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976, mod.)

Für den Nachweis eines enzymatischen Umsatzes verschiedener Substrate, beispielsweise der Hydroxypiperidinderivate, wurde die Methode nach SHINAGAWA *et al.* verwendet. Hierbei dient Phenazinmethosulfat (PMS) als Elektronenüberträger zwischen einer membrangebundenen Dehydrogenase und dem artifiziellen Elektronenakzeptor Dichlorphenolindophenol (DCPIP).

Tab. 11.: Zusammensetzung des optisch-enzymatischen Tests auf aktive Dehydrogenasen nach Shinagawa *et al.*

Test-Bestandteil	Volumen im Test	Endkonzentration
Kaliumphosphatpuffer 0,1 M, pH 6.0	600 μ l	67,0 mM
Phenazinmetosulfat (PMS) 0,01 M	10 μ l	0,11 mM
Dichlorphenolindophenol (DCPIP) 0,05 M	30 μ l	0,17 mM
Substrat	x μ l	5 – 30 mM
Enzympräparation	1-20 μ l	
H ₂ O _{dest.} ad 900 μ l	210-229 μ l	

Die Messungen erfolgten in 1 ml Plastikkuvetten (Sarstedt) bei 578 nm im Spektralphotometer (UVIKONxs, Fa. BIO-TEK Instruments). Nach Aufnahme einer stabilen Grundlinie wurde der Test wahlweise mit der Enzympräparation oder mit dem Substrat gestartet. DCPIP hat hier die Funktion eines Redox-Indikators. Die Reduktion des DCPIP führt zu einer Extinktionsabnahme. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe der BIOLAB Software ‚Lab Power Junior-2.06-0103‘ mit der Funktion TIME DRIVE verfolgt und dokumentiert. Unter Einbeziehung der Anfangssteigung der Reaktionskurve, des Extinktionskoeffizienten von DCPIP ($14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der Proteinkonzentration wurde die spezifische Aktivität der Dehydrogenase gegenüber des eingesetzten Substrates bestimmt.

2.14.2. Aldolase Assay

Aus der Genomsequenz waren zwei Gene ersichtlich, die laut Annotation für Fructose-Bisphosphat-Aldolasen codieren. Deren Funktion sollte anhand des hier beschriebenen gekoppelten enzymatischen Tests nachgewiesen werden. Die photometrischen Messungen erfolgten in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Diese sind bis hinunter zu einer Wellenlänge von 330 nm einsetzbar. Mit diesem Test wurde eine Extinktionsabnahme im Zuge einer NADH-Oxidation gemessen. Dazu wurde eine Wellenlänge von 340 nm am UVIKONxs-Photometer (Fa. BIO-TEK Instruments Inc., Bad Friedrichshall, Deutschland) eingestellt. Vor Beginn des Tests wurde die Konzentration der Proteinsuspension mittels Bradford-Test bestimmt, um zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität eine definierte Proteinmenge in die

Küvette zu geben. Folgende Lösungen wurden wie folgt zusammenpipettiert und gut mit der Pipette durchmischt:

BisTris-Puffer (50 mM)	910 μ l – x μ l
Substrat (100 mM)	40 μ l
NADH (10 mM)	50 μ l
Triosephosphat-Isomerase (20 U)	0,6 μ l
Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (4 U)	1,5 μ l
Proteinsuspension (10 μ g Protein)	x μ l

2.15. Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen

Zellsuspensionen wurden routinemäßig lichtmikroskopisch auf ihre Reinheit kontrolliert. Dabei fielen unter bestimmten Bedingungen der Zellanzucht morphologisch veränderte Zellen auf. Die Auflösung d eines linsenoptischen Lichtmikroskops ist jedoch durch die Wellenlänge des Lichts (λ), den Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektivlinse (n) und dem halben Öffnungswinkel der Objektivlinse (α) begrenzt. Nach der Beziehung $d = (\lambda / 0,612) / n \cdot \sin \alpha$ folgt, dass die Auflösung durch kürzere Wellenlängen verbessert wird. So ist die Auflösung eines Elektronenmikroskops im Vergleich zum Lichtmikroskop etwa um den Faktor 1000 höher, was eine stärkere Vergrößerung von Objekten erlaubt. Die veränderte Morphologie der Zellen wurde daher elektronenmikroskopisch untersucht. Um die Zellen als Objekte hochvakuumfähig zu machen, waren vorbereitende Schritte notwendig, die nachfolgend erläutert werden.

2.15.1. Lichtmikroskopie und Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie durch Agareinbettung

Eine bei unterschiedlichen Wachstumsraten beobachtete morphologische Veränderung von im Chemostat gewachsenen *Gluconobacter oxydans* 621H-Zellen wurde nicht nur anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen dokumentiert (Phasenkontrastmikroskop Typ Standard, Fa. ZEISS, Oberkochen, Deutschland), sondern wurde auch mit Hilfe von

elektronenmikroskopischen Aufnahmen näher untersucht. Hierfür war es notwendig, etwa 100 bis 250 µl Zellpellet zur Verfügung zu haben. Deshalb wurde ein entsprechend großes Volumen Zellkultur dem Chemostat entnommen, in 50 ml Falcon-Tubes bei 6000 U/min und 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit je einem Volumen PBS (Phosphat gepufferte Saline) zweimal gewaschen und das Pellet in 5 ml PBS aufgenommen. Das Fixieren der Zellen erfolgte durch Zugabe von 0,5 % Formaldehyd (angesetzt aus Paraformaldehyd), 0,3 % Glutaraldehyd und Inkubation auf Eis für mindestens 1,5 h. Nach dem Fixieren erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit eiskalter PBS, die nun zusätzlich 10 mM Glycin enthielt. Nach dem Abzentrifugieren und Abnehmen des Überstandes konnte das Pellet der fixierten Zellen für wenige Tage bei 4 °C gelagert werden. Mit 500 µl PBS wurde dann das Pellet resuspendiert und in 150 µl großen Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, um den Überstand möglichst vollständig zu entfernen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Pellet durch die Zentrifugation nicht zu fest wurde und noch pipettierfähig blieb. Das Pellet wurde mit 100 µl 60 °C warmer, 1,5 %iger (w/v) Bacto-Agarlösung resuspendiert und auf Eis abgekühlt. Nach dem Abschneiden der Spitze des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde der Agarblock mit den eingeschlossenen Zellen vorsichtig mit Hilfe eines schwachen Pressluftstromes aus dem Reaktionsgefäß geblasen. Dieser Agarblock wurde mit einer Rasierklinge in ca. 1 mm² große Würfel zerteilt. Die Zellen waren damit für die im nächsten Abschnitt beschriebenen Schritte der Entwässerung und Einbettung in Kunstharz vorbereitet.

2.15.2. Entwässerung und Kunstharzeinbettung in Agar eingeschlossener Zellen

In dieser Arbeit wurde zur näheren mikroskopischen Untersuchung der Zellen die Transmissionselektronenmikroskopie verwendet. Zur Betrachtung von biologischen Objekten, die meist etwa 70 – 90 % Wasser enthalten, ist zunächst eine Folge von Entwässerungsschritten notwendig. Dazu werden die ca. 1 mm² großen Agarwürfel (vgl. 2.15.1.) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch eine Reihe ansteigender Methanolkonzentrationen sukzessive entwässert. Durch steigende Konzentrationen Lowicryl K4M-Kunstharz erfolgte letztlich die Einbettung. Lowicryl ist ein polares, auf Methacrylat/Acrylat basierendes Harz zur Einbettung von

biologischem Material bei tiefen Temperaturen. Eine Tieftemperatureinbettung war notwendig, weil dabei Proteine in organischen Lösungsmitteln nicht denaturieren.

Tab. 12: Entwässerungs- und Einbettungsschema für die Elektronenmikroskopie

Medium	Inkubationszeit (mindestens)	Inkubations- temperatur
15 % (w/v) Methanol in H ₂ O _{bidest.}	15 min	0 °C
30 % Methanol	30 min	0 °C
50 % Methanol	30 min	-20 °C
70 % Methanol	30 min	-35 °C
95 % Methanol	30 min	-35 °C
100 % Methanol	2 x 30 min	-35 °C
50 % Methanol / 50 % Harz	1 h	-35 °C
33 % Methanol / 66 % Harz	2 h	-35 °C
	1 x kurz wechseln,	
100 % Harz	dann ü.N., dann erneut kurz wechseln	-35 °C

Einzelne Würfel eingebetteter Zellen wurden dann in Gelatinekapseln, wie man sie von Pharmaka kennt, überführt, die mit 100 %igem Kunstharz gefüllt waren. Um eine Reserve zu haben, wurden in dieser Arbeit pro Versuchsbedingung vier Würfel einzeln in Gelatinekapseln überführt. Die restlichen Würfel wurden bei -35 °C gelagert. Nachdem die einzelnen Würfel auf den Boden der Kapseln gesunken waren, wurde das Harz für mindestens 24 h bei -35 °C, und anschließend bei Raumtemperatur mit UV-Licht (360 nm) polymerisiert.

Komponenten des Lowicryl-Einbettungsharzes

Crosslinker A	2,7 g
Monomer B	17,3 g
Initiator C	0,1 g

2.15.3. Anfertigung von Mikrotomschnitten für die Elektronenmikroskopie

Die morphologisch abweichenden *Gluconobacter oxydans* Zellen sollten im Transmissionselektronenmikroskop hinsichtlich einer Veränderung der Struktur ihrer Cytoplasmamembran untersucht werden. Das machte einen Ultradünnschnitt erforderlich. Nach der Fixierung mit vernetzenden Aldehyden und einer schrittweisen Entwässerung erfolgte die Kunstharzeinbettung, die einen nachfolgenden Ultradünnschnitt mit 50 – 100 nm erlaubt.

2.15.3.1. Trimmen der Kunstharzkapsel für die Ultramikrotomie

‚Trimmen‘ bezeichnet die Anfertigung einer geeigneten Anschnittfläche für die Ultramikrotomie. Dazu wurde die hergestellte, polymerisierte Kunstharzkapsel (vgl. 2.15.2.) mit dem darin eingebetteten Objekt (*Gluconobacter*-Zellen) zu einem Pyramidenstumpf mit flacher Spitze (maximal 0,5 mm²) gefräst. Hierfür wurde eine Diamantfräse (TM 60, Reichert, Österreich) verwendet. Um gerade Schnittbänder zu erhalten, wurde die Anschnittfläche möglichst rechteckig und plan gefräst. Der Winkel der Pyramiden-Seitenflächen war so zu wählen, dass sich einerseits die Spitze beim Schneiden mit dem Ultramikrotom nicht verbog, dass sich andererseits aber auch die Schnittfläche bei mehreren aufeinanderfolgenden Schnitten nicht zu schnell vergrößerte.

2.15.3.2. Herstellung von Messern und Trögen für die Ultramikrotomie

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wurden die zum Pyramidenstumpf gefrästen Kunstharzeinbettungen zum Anfertigen von Ultradünnschnitten herangezogen. Die Herstellung der Dünnschnitte erfolgte mit einem Ultramikrotom (Ultratome III, LKB, Bromma, Schweden), in das Glasmesser eingespannt wurden. Ebenfalls von LKB (Bromma, Schweden) wurden die 25 mm breiten und 6,5 mm dicken Glasstreifen bezogen, aus denen durch Anreißen und Brechen mit einem Messerbrecher (Knifemaker LKB 7800) die erwähnten Glasmesser hergestellt wurden. Das Glasmesser hat bei einem Gegenstück von 0,5 mm einen realen Winkel von 55° an der Messerkante. An die Messerkante wurde ein Kunststofftrog angesetzt, abgedichtet

und mit filtriertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gefüllt. Hierauf flottieren die hergestellten Dünnschnitte ab, die dann für mehrere Tage gelagert werden können. Bei einer silbernen Interferenzfarbe haben die Dünnschnitte eine Schichtdicke von 60 – 90 nm. Die auf der Wasseroberfläche flottierenden Dünnschnitte wurden, wie in 2.15.3.3. beschrieben, mit einem beschichteten Nickelgrid aufgenommen.

2.15.3.3. Aufnahme der Schnitte auf beschichtete Objektträger-Netze (Grids)

Objektträgernetze aus Nickel sind mit einem Trägerfilm beschichtet, damit die Präparate gestützt werden und nicht durch die Maschen der Netze fallen. Der Trägerfilm bestand aus Formvar. Beschichtete Objektträgernetze (*Grids*) wurden freundlicherweise von Priv. Doz.. Dr. M. Hoppert, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Der auf der Oberfläche der Trogflüssigkeit schwimmende Dünnschnitt konnte zunächst durch ein vorsichtiges Bewegen der Wasseroberfläche mit Hilfe einer eingespannten Wimper in die gewünschte Orientierung gebracht werden. Dabei musste darauf geachtet werden, den Schnitt nicht mit der Wimper zu berühren, um ein Verkleben zu verhindern. Ein Objektträger-Netz wurde mit der beschichteten Seite planparallel über den Schnitt gebracht und zur Aufnahme des Schnittes auf diesen getupft. Nach dem Absaugen des Wassers auf dem Grid haftete der Dünnschnitt fest an der Trägerfolie.

2.15.3.4. Kontrastieren der Zellschnitte mit Phosphorwolframsäure (3 %)

Das Kontrastieren der Zellschnitte erfolgte mit 3 %iger Phosphorwolframsäure (PWS). Etwa 20 µl PWS wurden so auf einen Parafilmstreifen pipettiert, dass sich ein gleichmäßiger Tropfen ausbildete. Auf diesen Tropfen wurde das Proben-Grid aufgelegt. Dabei befand sich der Zellschnitt auf der Unterseite des Grids, tauchte also in die PWS ein. Nach 3 min Inkubation wurde das Grid mit einer Pinzette aus dem Tropfen genommen und an einem Filterpapier getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. M. Hoppert, Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt.

2.16. Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Chemikalien der Fa. Sigma-Aldrich, München, Fa. Merck, Darmstadt und der Fa. Roth, Karlsruhe, hatten den Reinheitsgrad p.A.. Von der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und TOSOH Biosciences wurden Chromatographiematerialien bezogen. Die Restriktionsendonukleasen stammten von den Firmen New England Biolabs (Schwalmbach) und MBI Fermentas GmbH (St. Leon Rot). Die Bezugsquellen weiterer Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits sind nachfolgend aufgeführt:

Amersham Bioscience, Freiburg

CyScribe™ GFX™ Purification Kit, CyScribe™ First Strand cDNA labelling Kit, Lucidea™ Universal ScoreCard™

Biomol, Hamburg

Phenol (äquilibriert mit Tris-Puffer), TEMED, DTE, MOPS

Bio-Rad Laboratories, München

Nativ-Polyacrylamid-Fertiggradientengele „ready Gel“ (4-20%), Aqua Pure Genomic DNA Isolation-Kit

Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf:

Agarose

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

T4-DNA-Ligase, Proteinase K, RNase, ATP,

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto-Agar, Bacto-Peptone

Gerbu Trading GmbH, Gaiberg

Ampicillin, Acrylamid, CHAPS, Octylglucosid

Gibco-BRL, Eggenstein

Agarose, Hefeextrakt

Merck, Darmstadt, Deutschland

BIOQUANT Bradford-Reagenz, gebrauchsfertig, Triton X-100

Kaliumdihydrogenphosphat (zur Analyse)

Di-Kaliumhydrogenphosphat (wasserfrei, zur Analyse)

Millipore, Bedford, USA

Microcon Konzentratoren 0,5 ml MWCO 30 000

New England BioLabs, Schwalmbach

Prestained Protein Marker (Broad Range)

Oxoid, Heidelberg

Hefeextrakt, Trypton aus Casein

Pharmacia LKB, Freiburg

HMW und LMW-Markerproteine

Promega Corporation, Madison, USA

„Wizard DNA Purification Kit“

Qiagen, Hilden

OneStep RT-PCR Kit, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit, RNeasy Midi Kit, SYBR[®] Green RT-PCR Kit

Riedel- de Haen

D(-)-Mannitol extra pure

Roche Diagnostics, Mannheim

dNTPs

Roth, Karlsruhe

Aqua-Roti[®]-Phenol (H₂O gesättigt)

Serva, Heidelberg

APS, Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, BSA, EDTA, Glycin, Tris, Resazurin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Casein (sauer hydrolysiert), Dimethylformamid, Ethidiumbromid, DNase I, Silbernitrat

Vivascience, Hannover, Deutschland

Vivaspin Konzentratoren 20 ml, MWCO 10 000

Das verwendete Stickstoff-Gas (Reinheit: 99,99 %) und flüssiger Stickstoff wurden von der Fa. Messer Griesheim, Kassel, Deutschland, bezogen.

3. Experimente und Ergebnisse

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* bei einer Vielzahl biotechnologischer Produktionsprozesse eingesetzt wird. Aufgrund dieser industriellen Relevanz ist das Interesse an grundlegender Information über diesen Organismus sehr groß. In einer vorangegangenen Arbeit wurde die vollständige Genomsequenz durch PRUST (2004) bestimmt. Wie zuvor bereits vermutet wurde, bestätigte diese ein bislang noch nicht genutztes Oxidationspotential in Form von mehr als 70 nicht charakterisierter Oxidoreduktasen. Auch konnten Gene für die Enzymausstattung des Pentosephosphatweges und des KDPG-Weges identifiziert werden. Weitere aus der Genomsequenz abgeleitete Daten, wie die Zusammensetzung der Atmungskettenkomponenten oder die membrangebundenen und löslichen Dehydrogenasen, um nur zwei Beispiele zu nennen, stellten ebenfalls interessante Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen dar. Allen gemeinsam war die Tatsache, dass es sich um Informationen über das Vorhandensein von Genen handelt, die auf dem Vergleich von Ähnlichkeiten und ihrer Zuordnung zu in ihrer Funktion bekannten proteinkodierenden Genen beruhen. Darüber, ob diese Gene im sequenzierten Mikroorganismus auch tatsächlich exprimiert werden, und ob sie die annotierte Funktion auch erfüllen, sagt die reine Sequenz nichts aus. Dies sollten wichtige Fragestellungen der hier vorliegenden Arbeit sein. Auf der Basis der Genomsequenz sollte ein Gesamtgenom-Microarray hergestellt werden, um mit dessen Hilfe Transkriptionsanalysen durchzuführen. Der Schwerpunkt dieser funktionellen Genomanalyse lag auf der Untersuchung der Transkriptionsregulation löslicher und membrangebundener Dehydrogenasen, von Atmungskettenkomponenten und von Enzymen der zentralen Stoffwechselwege. Allgemein findet bei der Transkriptionsanalyse ein Vergleich zwischen einer Referenzbedingung und einer Testbedingung mit mindestens einem veränderten Parameter statt, worauf im Kapitel 3.4. genauer eingegangen werden wird.

Desweiteren sollte die Expression ausgewählter Gene von cytoplasmatischen oder membrangebundenen Dehydrogenasen mit einer zweiten, sehr sensitiven Methode in

unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Hierfür wurde die quantitative *real-time* RT PCR gewählt (vgl. 3.5.).

Die dritte Säule dieser Arbeit bildeten biochemische Untersuchungen zur enzymatischen Umsetzung ausgewählter Substrate. So bestand eines der Ziele darin, Enzymaktivitäten bei der Umsetzung verschiedener Zucker / Zuckeralkohole zu untersuchen. Die Enzymassays wurden also eingesetzt, um an ausgewählten Beispielen mit einer weiteren Methode die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse zu überprüfen. Außerdem wurde analysiert, ob *Gluconobacter oxydans* 621H zur selektiven Oxidation von einem der von KYRIELEIS (1999) synthetisierten Alkohole in der Lage ist. Einen Überblick über den Zusammenhang der genannten Methoden zur wechselseitigen Untermauerung der gefundenen Ergebnisse bietet Abbildung 8.

Abb. 8: Flussdiagramm zur Durchführung der Experimente für die vorliegende Arbeit.

Unabhängige Methoden wie die quantitative *real time* RT PCR, die Transkriptionsanalyse mittels Microarray und Enzymassays wurden an ausgewählten Beispielen verknüpft, um die jeweils gefundenen Ergebnisse zu korrelieren.

Zusammenfassend bestand das Ziel dieser Arbeit also darin, im Verbund mit den Daten der Genomsequenzierung, durch funktionelle Genomanalyse und proteinbiochemische Untersuchungen die Physiologie des Bakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H besser zu verstehen, dadurch die Basis für ein potentielles ‚*metabolic engineering*‘ zu verbreitern und so zu einer Optimierung der Produktionsstämme hinsichtlich effizienterer Stoffumwandlungen beizutragen.

3.1. Rückblick auf vorangegangene Arbeiten zur Genomsequenzierung

Der Erstellung eines DNA-Microarrays von *Gluconobacter oxydans* 621H in dieser Arbeit ist das Genomsequenzierungsprojekt von PRUST (2004) vorausgegangen. Wie bereits in der Abbildung 8 im vorangegangenen Kapitel zu erkennen war, ruhte die Konstruktion des Microarrays auf dem Pfeiler der vollständigen und annotierten Genomsequenz. Basierend auf diesen Daten wurden in dieser Arbeit zunächst PCR-Produkte für möglichst alle identifizierten ORFs hergestellt. Hierfür wurde die Plasmid-Genbank des erwähnten Sequenzierprojektes benutzt. Wegen der Wichtigkeit des Sequenzierprojektes und der daraus erhaltenen Annotationsdaten soll dieses nochmals in Abb. 9 zusammengefasst werden. Daraus wird ersichtlich, dass in dieser Arbeit der Rückgriff auf verschiedene Ebenen des Sequenzierprojektes erfolgte.

Abb. 9: Fließschema zu Strategie und Verlauf des Sequenzierungsprojekts von *G. oxydans* (nach PRUST, 2004; modifiziert).

Gluconobacter oxydans war das erste Bakterium aus der Familie der *Acetobacteriaceae* dessen Genomsequenz vollständig entschlüsselt wurde. Einige der dabei identifizierten Eckdaten des *Gluconobacter*-Genoms, die auch einen Einfluss auf die hier vorgestellte Arbeit hatten, wurden in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 13) zusammengestellt (nach PRUST *et al.*, 2005). Dazu gehörten beispielsweise neben der Genomgröße und dem G + C-Gehalt vor allem die Anzahl der vorhergesagten, proteinkodierenden ORFs und die beachtliche Anzahl der bislang nicht charakterisierten Dehydrogenasen bzw. Reduktasen. Gerade die nicht-charakterisierten Enzyme sind für die potentielle Erweiterung des Oxidationspotentials sehr interessant und wurden mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen Transkriptionsanalysen eingehender untersucht. Eine Tabelle zur Übersetzung der ERGO-Bezeichnungen in die NCBI-Nummern, sowie den Gen-Annotationen, finden sich im Anhang.

Tab. 13: Ausgewählte Eigenschaften des *G. oxydans* 621H-Genoms

Genomgröße	2.922.384 bp
davon entfallen auf 5 Plasmide	220.2 kb
G+C-Gehalt des Chromosoms	60,8 %
Kodierende Sequenz	89,9 %
Vorhergesagte proteinkodierende ORFs	2.664
ORFs mit zugewiesener Funktion	70,5 %
<i>G. oxydans</i> -spezifische ORFs	341
uncharakterisierte Dehydrogenasen/Reduktasen	> 70
uncharakterisierte Alkohol-Dehydrogenasen	> 30
uncharakterisierte Zucker/Polyol-Dehydrogenasen	> 20

3.2. Konstruktion des Gesamtgenom-Microarrays von *G. oxydans* 621H für die Transkriptionsanalyse

Die Aussage im vorangegangenen Abschnitt, *G. oxydans* sei das erste Essigsäurebakterium dessen Genomsequenz vollständig entschlüsselt wurde, gilt im gleichen Maße für die hier durchgeführte genomweite Transkriptionsanalyse. Bevor jedoch die eigentlichen Untersuchungen mit RNA aus Zellen, die unter zu vergleichenden Bedingungen gewachsen waren, angestellt werden konnten, musste zunächst das Microarray selbst hergestellt werden. Dazu wurden die o.g. PCR-Produkte möglichst aller ORFs benötigt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse der PCR-Reaktionen und der *in silico*-Kontrollen mit Hilfe der Artemis-Software werden in nachfolgendem Kapitel zusammengefasst dargelegt.

3.2.1. Amplifikation der einzelnen ORFs des *G. oxydans*-Genoms, *in silico*-Kontrolle der PCR-Produkte und Erstellen des Genomchips

Das Genom von *G. oxydans* 621H umfasst 2664 proteinkodierende ORFs (PRUST *et al.*, 2005). Das Ziel der angestrebten Transkriptionsanalyse mit diesem Bakterium war, ein möglichst detailliertes Abbild der Genaktivitäten beim Vergleich des

Wachstums unter Test- und Referenzbedingungen zu schaffen. Daraus erwuchs die Notwendigkeit zur PCR-basierten Amplifikation möglichst aller ORFs, um diese dann auf einen Aminosilan-beschichteten Objektträger aufzubringen. Die Spezifität bei der späteren Hybridisierung der cDNA an die PCR-Produkte (*probes*) auf dem Chip wurde gewährleistet, indem nur Primer für ORFs größer 250 bp abgeleitet wurden. Die resultierenden PCR-Produkte wiesen Längen zwischen 250 und 800 bp auf, wobei die durchschnittliche Produktlänge 500 bp betrug. Die Durchführung für das Ableiten der Primer, das Amplifizieren und das Spotten der PCR-Produkte ist bereits im Kapitel 2.6. beschrieben worden.

Vor dem Spotten wurden die PCR-Fragmente jedoch noch einmal *in silico*, also bioinformatisch, auf ihre korrekte Position und ihre Spezifität hin überprüft. Für diese Kontrolle wurden die berechneten PCR-Produkte als *Genebank-files* in die Artemis-Software (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) eingelesen. Als Beispiel für einen *screenshot* von dieser Software dient die Abb. 10. Zu erkennen ist ein Sequenzabschnitt aus dem Chromosom von *G. oxydans*. In türkis dargestellte Pfeile symbolisieren die Lage der ORFs in der Nukleotidsequenz. Die Anordnung der weißen Pfeile darunter widerspiegelt diese ORFs, jedoch sind hierin die PCR-Produkte der ORFs auf dem *leading strand* eingezeichnet (grün dargestellt). Auf dem grau gefärbten Balken darunter finden sich jene PCR-Produkte der ORFs auf dem *lagging strand*. Ebenfalls dargestellt ist der Einbuchstabencode der Aminosäuren in den drei möglichen Leserastern. Anhand der eingeblendeten ORF-Nummern konnte sichergestellt werden, dass die PCR-Produkte spezifisch in ihrem berechneten Sequenzabschnitt zu liegen kamen. Überlappungen mit benachbarten ORFs wurden ausgeschlossen. Nach Abschluss der PCR-Reaktionen und der computergestützten Kontrollen waren für 94 % aller ORFs von *G. oxydans* 621H PCR-Produkte generiert. Dabei konnten ca. 88 % der PCR-Reaktionen mit Plasmiden als Template, sowie einem plasmidspezifischen- und einem genspezifischen Primer durchgeführt werden. Die Sequenzen der plasmidspezifischen *universal primer* sind in 2.6.4. angegeben. 11,9 % der ORFs erbrachten aufgrund fehlender Produkte oder unspezifischer Bindung, mit der Folge von Doppelbanden im Agarose-Kontrollgel, zunächst keinen Erfolg. Deshalb wurden für diese Gene zwei ORF-spezifische Primer berechnet, die zusammen mit chromosomaler DNA in die PCR-Reaktionen eingebracht wurden. Mit Hilfe dieser Strategie konnten

noch weitere 6 % PCR-Produkte generiert, und dadurch die o.g. 94 % aller ORFs auf den Chip gebracht werden.

Abb. 10: Screenshot der Benutzeroberfläche der Artemis-Software, die zum Überprüfen der berechneten PCR-Produkte verwendet wurde. Türkis- und weißfarbene Pfeile stellen die einzelnen ORFs dar, grün eingefärbt sind die berechneten PCR-Produkte. Darunter befindet sich die Anordnung der Aminosäuren in den verschiedenen Leserastern, dargestellt als Einbuchstabencode.

Wenn berücksichtigt wird, dass etwa 3,5 % aller 2664 *Gluconobacter oxydans* ORFs kleiner als 250 bp sind und somit nicht für die Primergenerierung in Frage kamen, so bleibt festzuhalten, dass das Microarray rund 97,5 % aller ORFs > 250 bp abdeckt. Da nun ein Gesamtgenom-Microarray von *Gluconobacter oxydans* vorlag, konnte mit der Zellanzucht unter verschiedenen Bedingungen begonnen werden (s. 3.3.). Aus den geernteten Zellen wurde die gesamte RNA extrahiert (vgl. 2.7.3.) und für die Transkriptionsanalyse aufbereitet (2.7.4.).

3.3. Wachstum von *Gluconobacter oxydans* 621H in kontinuierlicher Kultur

Die Anzucht kontinuierlicher Kulturen im Chemostat eröffnet die Möglichkeit, die Reaktion von Mikroorganismen auf präzise Nährstoffzugaben ins Medium zu untersuchen (OLIJVE und KOK, 1979b). Der Chemostat ermöglicht neben einer gleichbleibenden Substratkonzentration auch konstante pH-, Temperatur- oder pO₂-Werte einzustellen. Diese Parameter werden in den Abschnitten zu den einzelnen

Experimenten der Transkriptionsanalyse genauer beschrieben. Durch die kontinuierliche Kultur erhält man hoch-reproduzierbare Kulturbedingungen, was im allgemeinen für Schüttelkulturen nicht gilt. Die Verdünnung mit frischem Medium, bei konstantem Volumen sorgt dafür, dass sich die Milieubedingungen nicht ändern (VEITH, 2004). Zudem befinden sich die Zellen im kontinuierlichen Wachstum, was eine kontinuierliche Expression von Genen für die unter den eingestellten Wachstumsbedingungen benötigten Proteine garantiert. Neben den o.g. konstanten Milieubedingungen ist diese permanente Genexpression der benötigten korrespondierenden Proteine der Schlüssel zur reproduzierbaren Transkriptionsanalyse. Darüber hinaus war zu bedenken, dass die Wachstumsrate der Zellen in der Kultur von der Durchflußrate abhängig ist und auch über diese eingestellt werden kann. Eine Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der maximalen Wachstumsrate im ausgewählten Medium. Die Bestimmung der Wachstumsraten für die standardmäßig verwendeten Vollmedien ist daher im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.3.1. Ermittlung der maximalen Wachstumsraten

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Transkription von Genen aus *Gluconobacter oxydans* 621H beim Wachstum auf verschiedenen C-Quellen untersucht. Dazu zählten Glucose, Mannitol und Sorbitol. Im allgemeinen weichen oftmals die Wachstumsraten beim Wachstum auf verschiedenen C-Quellen voneinander ab. Es sollte aber sichergestellt werden, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte trotz verschiedener C-Quellen die gleiche Wachstumsrate, zumeist etwa halbmaximal, aufwiesen. Um für die Experimente zur Transkriptionsanalyse mittels Microarray das Bakterienwachstum im Chemostat reproduzierbar zu gestalten, waren zunächst die maximalen Wachstumsraten (μ) auf den o.g. C-Quellen zu ermitteln (vgl. 2.4.6.). Hierfür wurden per Dreifachbestimmung Wachstumskurven von *G. oxydans* im Vollmedium aufgenommen, das die jeweilige C-Quelle in einer Konzentration von 50 mM enthielt. Aus dem steilsten Anstieg der Kurve (logarithmische Wachstumsphase, vgl. Abb. 11) wurde die maximale Wachstumsrate μ für jeden der drei Ansätze errechnet.

Abbildung 11: Allgemeines Beispiel einer Wachstumskurve unterteilt in die Wachstumsphasen.
Logarithmisch aufgetragen ist die optische Dichte (OD) über die Zeit.

Die pro verwendeter C-Quelle resultierenden drei Werte der maximalen Wachstumsraten wurden schließlich gemittelt und als Basis für die Einstellung der Wachstumsrate der Chemostatkulturen benutzt. Die gemittelten Werte für Glucose, Mannitol und Sorbitol finden sich in der Tab. 14. Zusätzlich wurden in der Tabelle die berechneten Verdopplungszeiten angegeben.

Tab. 14: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *G. oxydans* 621H in Vollmedium-*batch*-Kulturen.

Die angegebenen Wachstumsraten und Verdopplungszeiten repräsentieren den Mittelwert von drei Messungen pro C-Quelle.

C-Quelle	max. Wachstumsrate μ	Verdopplungszeit
Glucose	$0,45 \cdot \text{h}^{-1}$	$\sim 1,5 \text{ h}$
Mannitol	$0,46 \cdot \text{h}^{-1}$	$\sim 1,5 \text{ h}$
Sorbitol	$0,27 \cdot \text{h}^{-1}$	$\sim 2,6 \text{ h}$

Die Daten zu den Wachstumsraten und Verdopplungszeiten aus der obenstehenden Tabelle zeigten ein nahezu identisches Wachstum auf Glucose und Mannitol in Vollmedium (s. 2.3.2.). Im Gegensatz dazu verlief das Wachstum in Sorbitol-haltigem Vollmedium um etwa 50 % langsamer. Die jeweils eingestellte Wachstumsrate eines

Chemostat-Laufes wird für jedes der durchgeführten Experimente im entsprechenden Kapitel beschrieben.

3.3.2. Limitierung des Wachstums durch C- und N-Quelle im Chemostat

Da bei der kontinuierlichen Zellanzucht im Chemostat definierte Bedingungen reproduzierbar einzustellen waren, wurde ein für das Zellwachstum notwendiger Mediumbestandteil limitiert. In der vorliegenden Arbeit war dies die C-Quelle. Die tatsächliche C-Quellen-Limitierung wurde mit Hilfe eines Limitierungsversuchs überprüft. Hierbei wurde im Chemostat schrittweise die C-Quellenkonzentration erhöht und das Einstellen einer konstanten optischen Dichte nach jeweils drei Volumenwechsel abgewartet. Anschließend wurden über mindestens 24 Stunden in regelmäßigen Abständen Proben zur OD-Bestimmung (s. 2.4.2) entnommen. Exemplarisch wurde dieser Versuch mit der C-Quelle Glucose durchgeführt, wobei die Wachstumsrate einer etwa halbmaximalen Wachstumsrate von $D = 0,22 \text{ h}^{-1}$ entsprach um die Zellen im sog. *balanced growth* zu halten (vgl. 2.4.7.). Abb. 12 zeigt die Durchschnittswerte der gemessenen optischen Dichten von mindestens zehn Messungen pro Glucose-Konzentration.

Abb. 12: Zellwachstum im Chemostat nach sukzessiver Erhöhung der Glucosekonzentration, bzw. nach Zugabe einer Stickstoffquelle.

Der oben gezeigten Abbildung ist eine Zunahme der optischen Dichte nach Erhöhung der Glucosekonzentration bis 75 mM zu entnehmen. Durch eine weitere Steigerung der Glucosekonzentration auf 100 mM wurde keine Zunahme der Zelldichte im verwendeten Vollmedium mehr bewirkt. Erst nachdem zusätzlich zu den 100 mM Glucose auch noch 10 mM eines Ammoniumsalzes als Stickstoffquelle hinzukamen, war eine weitere Erhöhung der optischen Dichte deutlich erkennbar. Auch von OLIJVE und KOK (1979b) wurden Chemostat-Experimente mit Glucose-Limitierung durchgeführt. In jenen Experimenten wurden 10 g Glucose pro Liter eingesetzt, was ca. 55 mM entsprach. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde üblicherweise eine C-Quellenkonzentration von 50 mM verwendet. Davon abweichende C-Quellen-Konzentrationen werden bei entsprechenden Experimenten gesondert erwähnt.

3.4. Transkriptionsanalyse von *G. oxydans* 621H

In der Einleitung dieses Abschnitts wurden die verschiedenen Untersuchungen bereits kurz genannt. Dabei war eine der erwähnten Säulen dieses Projekts die genomweite Transkriptionsanalyse von *G. oxydans* 621H mittels Microarray. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Regulation der Transkription aller ORFs nach Anzucht der Zellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Der Vergleich der Transkriptionen von jeweils zwei Bedingungen gab dabei über regulatorische Effekte Aufschluss. Die Abb. 13 soll einen Überblick über die in dieser Arbeit miteinander verglichenen Bedingungen geben. Die in jedem der vier Kästen oben genannte Bedingung diente als Referenz zu den untenstehenden Testbedingungen. Die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Daten der Auswertungen sind so normiert berechnet, dass die jeweilige Referenzbedingung durch die GenePix-Software rot dargestellt wird. Das heißt, dass von Daten der invers markierten Proben, also einer Cy3-Markierung der Referenz, die Kehrwerte in die Auswertung aufgenommen wurden.

Abb. 13: Übersicht über die Experimente zur Transkriptionsanalyse
 Angegeben sind die bei der jeweiligen Zellanzucht in Vollmedium (VM) eingestellten Parameter.

Während Abb. 13 eine Übersicht über die verschiedenen Experimente der Transkriptionsanalyse bietet, verdeutlicht Abb. 14 den schematisch skizzierten Versuchsablauf von der Herstellung des Microarrays durch Aufbringen der PCR-Produkte über das Hybridisieren der markierten cDNA bis hin zur Analyse der Fluoreszenzdaten und der sich anschließenden Auswertung des Vergleichs von Test- und Referenzbedingung auf Ebene des Transkriptoms. Dies umfasst die Punkte 2.6 bis 2.8 des Material und Methoden-Teils dieser Arbeit. Zur Transkriptionsanalyse der zu vergleichenden Wachstumsbedingungen im Chemostat wurde jeweils RNA zweier biologisch unabhängiger Experimente verwendet. Zudem wurden die in Abb. 14 gezeigten Markierungs- und Hybridisierungsexperimente nach dem in Tab. 14 gezeigten Schema wiederholt, so dass in der Regel sechs Hybridisierungen pro Experiment ausgewertet wurden.

Abb. 14: Schema des experimentellen Ablaufs einer Transkriptionsanalyse; nach SCHMIDT (2005, mod.)

Aus Gründen der Relevanz und eines besseren Verständnisses für die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Ergebnisse, sollen hier nochmals einige Worte zur Auswertung Erwähnung finden. Als Resultat der reversen Transkription der mRNA und der Markierung der cDNA wurde nach dem Hybridisieren des Microarrays durch Laseranregung ein Fluoreszenzmuster erhalten, das von der GenePix Pro-Software in Farbsignale umgesetzt wurde. Aus Abb. 14 wird deutlich, dass Cy3-markierte cDNA grün, Cy5-markierte cDNA hingegen rot dargestellt wurde. Veränderte sich eine Genexpression unter beiden untersuchten Bedingungen nicht, so dass ein 1:1-Verhältnis der markierten cDNAs an das entsprechende *feature* hybridisierte, wurde dies als Mischfarbe gelb dargestellt. Die Berechnung der Transkriptionsregulationswerte aus den Fluoreszenzsignalen ist im Kapitel 2.6.12. beschrieben.

Tab. 14: Schema der Hybridisierungsexperimente für die Microarray-basierte Transkriptionsanalyse.

Bedingung A bzw. B steht für entweder Test- oder Referenzbedingung. Für jedes biol. Experiment wurde die Markierungsreaktion einmal identisch wiederholt und einmal ein sog. *dye switch* durchgeführt, bei dem die RNAs invertiert mit Cy-Farbstoffen markiert wurden.

Hybridisierung	Ausgangsmaterial	Markiert mit Cy3	Markiert mit Cy5
1	I. biol. Experiment	RNA Bedingung A	RNA Bedingung B
2 (Wdh. v. 1)		RNA Bedingung A	RNA Bedingung B
3 (<i>dye switch</i>)		RNA Bedingung B	RNA Bedingung A
4	II. biol. Experiment	RNA Bedingung A	RNA Bedingung B
5 (Wdh. v. 4)		RNA Bedingung A	RNA Bedingung B
6 (<i>dye switch</i>)		RNA Bedingung B	RNA Bedingung A

Über die Ergebnisse der Transkriptomvergleiche geben die nachfolgenden Kapitel Aufschluss, wobei mit dem Vergleich der Wachstumsbedingungen ‚Vollmedium mit Glucose‘ gegen ‚Vollmedium mit Mannitol‘, also von zwei unterschiedlichen C-Quellen begonnen wird. Die genannten Transkriptionsregulationswerte repräsentieren arithmetisch gemittelte Daten der Hybridisierungsexperimente und stellen keine absoluten Werte dar. Aufgrund der enormen Datenfülle, die solch ein Gesamtgenom-basiertes Experiment bietet, werden nachfolgend nur ausgewählte Gene vorgestellt.

3.4.1. Genexpression bei Wachstum mit Glucose im Vergleich zum Wachstum mit Mannitol

In diesem Experiment sollte ein Einblick in das Genexpressionsmuster beim Wachstum im Vollmedium auf dem Zucker ‚Glucose‘ im Vergleich zum Wachstum auf dem Zuckeralkohol ‚Mannitol‘ erhalten werden. Der Schwerpunkt des Interesses lag dabei allgemein auf der Regulation der Transkription von cytoplasmatischen und membranständigen Dehydrogenasen (3.4.1.1.). Interessanterweise besitzt *G. oxydans* zum Umsatz verschiedener Substrate sowohl ein cytoplasmatisches, als auch ein membranständiges Enzym. Ob diese beim Wachstum konstitutiv transkribiert werden, war ebenfalls Gegenstand der hier durchgeführten Untersuchungen. In diesem

Zusammenhang standen auch die Atmungskettenkomponenten (3.4.1.2.), da die bei der Oxidation eines Substrats anfallenden Reduktionsäquivalente hierauf übertragen werden. Unklar war bislang auch, was in Folge des C-Quellen-Wechsels regulatorisch mit dem Zentralstoffwechsel geschieht (3.4.1.3.). So war z.B. über die genetische Regulation des KDPG- und Pentosephosphat-Weges für *G. oxydans* bislang nichts beschrieben worden. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass über den Stoffwechsel des biotechnologisch seit langem eingesetzten Bakteriums noch nicht sehr viel bekannt ist. Zur Vollständigkeit wurden daher schließlich noch weitere auffällig regulierte Gene in Kapitel 3.4.1.4. aufgeführt. Das Wachstum der Zellen im Chemostat für dieses Experiment erfolgte bei einer Durchflussrate von $0,32 \text{ h}^{-1}$, die somit zwischen der maximalen und der halbmaximalen Wachstumsrate lag. Der Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) wurde mit sterilfiltrierter Pressluft auf 80 % des Luftsauerstoffgehaltes eingestellt. Der pH-Wert betrug 6,0 und die Temperatur 30°C . Geerntet wurde nach Einstellen einer konstanten OD, wobei jedoch mindestens drei Volumenwechsel abgewartet wurden.

3.4.1.1. Expression der Gene von Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen

Gluconobacter oxydans 621H verfügt über ein Set membranständiger Dehydrogenasen, die mit ihrem aktiven Zentrum in den periplasmatischen Raum hineinragen. Parallel dazu existiert aber auch ein Set cytoplasmatischer Enzyme, die mitunter dieselben Substrate oxidieren wie ihr membranständiges Pendant. Der Zweck einer solchen Redundanz ist bislang nicht abschließend geklärt, doch kann vermutet werden, dass die schnell arbeitenden membranständigen Dehydrogenasen der Bereitstellung von Energie, und die langsameren cytoplasmatischen Enzyme der Assimilation von Substraten für den Anabolismus dienen. Bislang war unbekannt, wie das Zusammenspiel der Enzyme beim Wechsel der C-Quelle auf Transkriptionsebene reguliert wird. Die Gesamtgenom-Microarray basierte Transkriptionsanalyse sollte hierüber Aufschluss geben. Die aus mehreren Hybridisierungsexperimenten (vgl. 3.4.) erhaltenen und gemittelten Transkriptionsregulationswerte von Dehydrogenasen sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 15) aufgeführt. Werte um etwa 1,0 galten als unter beiden untersuchten Bedingungen nicht abweichend reguliert. Der *cut-off* einer deutlichen Transkriptionsänderung unter einer der Bedingungen wurde bei mindestens 2,5 bis

3facher Regulation gelegt. Die Bedingung ‚Glucose als C-Quelle‘ entsprach hier einer Cy5-Markierung, also der roten Darstellung durch die Auswertsoftware GenePix (nicht gezeigt). Folglich wurden die Daten für die C-Quelle Mannitol derart aufbereitet, dass sie einer Cy3-Markierung entsprächen. Von *dye-switch*-Daten wurden dazu die Kehrwerte gebildet.

Tab. 15: Transkriptionsregulation von Dehydrogenasen beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Mannitol im Chemostat.

Ein *ratio of medians* > 1 bedeutet mehr Transkript unter der ‚Glucose-Bedingung‘, ein *ratio* < 1 mehr Transkript unter der ‚Mannitol-Bedingung‘.

ERGO-Nr.	Gen ID (NCBI-Nr.)	Annotation	<i>ratio</i> Glc/Man
1337	GOX0065	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,99
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,74
1473	GOX0191	3-Isopropylmalate dehydrogenase	0,91
1507	GOX0218	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,34
1603	GOX0313	soluble alcohol dehydrogenase	0,97
1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreductase protein	1,02
1742	GOX0417	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase	1,15
1807	GOX0473	Dihydroorotate dehydrogenase	0,95
1838	GOX0499	Putative NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	0,59
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,83
1918	GOX0569	Aldehyde dehydrogenase-like protein	1,15
1934	GOX0585	Cytochrome c subunit of aldehyde dehydrogenase	1,03
1935	GOX0586	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase, small subunit	1,27
1936	GOX0587	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase, large subunit	0,80
1988	GOX0632	D-amino acid dehydrogenase small subunit	0,98
2009	GOX0652	Xanthine dehydrogenase Xdh C protein	1,14
2010	GOX0653	Xanthine dehydrogenase XdhB protein	0,97
2124	GOX0756	Alcohol dehydrogenase 15 kDa subunit	0,95
2159	GOX0792	Methylene-THF dehydrogenase	1,34
2231	GOX0855	D-Sorbitol dehydrogenase subunit SldB	0,65
2241	GOX0865	Xylitol Dehydrogenase	0,96
2255	GOX0878	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	0,41
2260	GOX0882	2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 component	0,93
2310	GOX0924	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,96
2377	GOX0991	Histidinol dehydrogenase	1,22
2454	GOX1067	Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit precursor	0,94
2455	GOX1068	Alcohol dehydrogen. large subunit (membr-bound, PQQ-linked)	0,94
2460	GOX1073	(E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase	1,03
2523	GOX1122	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	0,98
2565	GOX1168	Putative membrane-bound dehydrogenase	0,88
2582	GOX1187	Myo-inositol 2-dehydrogenase	0,90
2631	GOX1230	Gluconate 2-dehydrogenase, cytochrome c subunit	0,53
2632	GOX1231	Gluconate 2-dehydrogenase alpha chain	0,73
2633	GOX1232	Gluconate 2-dehydrogenase gamma chain	0,59
2657	GOX1253	D-Lactate dehydrogenase (NAD dependent)	0,59

2708	GOX1300	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,56
2731	GOX1336	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	1,09
0010	GOX1432	NADP-D-sorbitol dehydrogenase	0,86
0027	GOX1441	Uncharacterized PQQ-dependent dehydrogenase 3	0,92
0094	GOX1497	Acyl-CoA dehydrogenase	0,44
0112	GOX1517	Homoserine dehydrogenase	1,04
0280	GOX1675	NADH dehydrogenase type II	0,63
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	0,63
0325	GOX1712	Aldehyde dehydrogen. (low similarity to L-sorbose dh)	1,01
0494	GOX1857	Uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 1	0,18
0607	GOX1959	Shikimate 5-dehydrogenase	0,75
0618	GOX1969	Uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 2	1,22
0667	GOX2015	NAD(P)-dependent glucose 1-dehydrogenase	1,13
0671	GOX2018	Aldehyde dehydrogenase (involved in Pyr degrad.)	0,89
0731	GOX2071	D-Lactate dehydrogenase (cytochrome c-dependent)	0,63
0748	GOX2088	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,78
0754	GOX2094	Sorbitol dehydrogenase cytochrome c subunit	0,86
0755	GOX2095	Sorbitol dehydrogenase large subunit	0,99
0757	GOX2097	Sorbitol dehydrogenase small subunit	1,01
0772	GOX2108	NADH-dependent iron-containing alcohol dehydrogenase	0,80
0781	GOX2117	Proline dehydrogenase/d-1-pyrroline-5-carboxylate dh	0,50
0855	GOX2181	Putative polyol dehydrogenase	0,67
0864	GOX2187	Gluconate 5-dehydrogenase (NADP)	0,77
0898	GOX2215	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,87
0956	GOX2250	Putative arogenate dehydrogenase / prephenate dehydrogenase	1,16
0989	GOX2264	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	1,22
1021	GOX2290	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	0,98
1022	GOX2290	Dihydrolipoamide acetyltransferase comp. of pyruvate dh	0,93
1023	GOX2291	Dihydrolipoamide dehydrogenase	0,98
1107	GOX2376	Putative aldehyde dehydrogenase	0,81
1110	GOX2378	Short chain alcohol dehydrogenase	1,41
3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	0,88
2245	GOX0868	Electron transfer flavoprot.-ubiquinone oxidored/put. Oxidored.	0,78
3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	0,97
2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	0,56

Aus der oben gezeigten Tabelle, in der alle zuordenbaren ORFs der Dehydrogenasen sowie drei ORFs von elektronentransfer-Flavoproteinen aufgelistet sind, die in diesen Hybridisierungsexperimenten auswertbar waren, wurde ersichtlich, dass die meisten der Dehydrogenasen keine deutliche Änderung ihrer Transkription nach dem in diesem Versuch durchgeführten Wechsel der C-Quelle aufwiesen. Eine Ausnahme bildete der in der Tabelle grau hinterlegte ORF einer uncharakterisierten, PQQ-abhängigen Dehydrogenase, worauf im Verlauf dieses Kapitels noch eingegangen wird.

Um die Relation der Transkriptionsregulation von cytoplasmatischen und membrangebundenen Enzymen deutlicher zu veranschaulichen, wird an dieser Stelle Bezug auf eine Abbildung aus der Veröffentlichung von PRUST *et al.* (2005) genommen, die in dieser Arbeit modifiziert dargestellt ist (s. Abb. 15).

Abb. 15: Schematischer Überblick über Zucker- und Alkohol-Dehydrogenasen sowie über Atmungskettenkomponenten von *G. oxydans* 621H.

Die Zuordnung von Nummern der dargestellten Enzyme zu ihren ERGO- bzw. NCBI-Bezeichnungen und Annotationen befindet sich in den jeweils nachfolgenden Tabellen.

Betrachtet man die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse für die *spots* der in Abb. 15 aufgelisteten ORFs, so ergab sich beim Vergleich der Transkription dieser Enzyme zwischen Wachstum auf Glucose und Wachstum auf Mannitol das in der nachfolgenden Tabelle 16 gezeigte Bild:

Tab. 16: Auswertung der Hybridisierungsexperimente für die in Abb. 15 gezeigten Enzyme.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) oder Mannitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

NR.	ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1	0731	GOX2071	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	0,63
2	2454	GOX1067	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	0,94
	2455	GOX1068	ADH gr. Unterein. (membrangeb. PQQ-abh.)	0,94
3	1934	GOX0585	Cyt. c Untereinheit d. Aldehyd-Dehydrogenase	1,03
	1935	GOX0586	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	1,27
	1936	GOX0587	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Unterein.	0,80
4	1549	GOX0265	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	n.d.
5	2631	GOX1230	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	0,53
	2632	GOX1231	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	0,73
	2633	GOX1232	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	0,59
6	3621	GOX0854	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.
	2231	GOX0855	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	0,65
7	0754	GOX2094	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	0,86
	0755	GOX2095	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	0,99
	0757	GOX2097	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	1,01
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen, s. Tab. 18			
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen, s. Tab. 18			
10	3500	GOX0516	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.
	0027	GOX1441	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	0,92
	0494	GOX1857	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	0,18
	0618	GOX1969	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	1,22
11	0667	GOX2015	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	1,13
12	0864	GOX2187	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	0,77
13	2001	GOX0644	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	0,96
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen, s. Tab. 18			
15	0010	GOX1432	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	0,86
16	2223	GOX0849	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	0,80
17	3517	GOX1081	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.
18	0671	GOX2018	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	0,89
19	1603	GOX0313	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	0,97
20	2657	GOX1253	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	0,59

n.d. = nicht auswertbar

Wie bereits weiter oben in diesem Kapitel erwähnt wurde, erfüllt unter den eingestellten Bedingungen interessanterweise nur einer der hier aufgelisteten auswertbaren ORFs das

Signifikanz-Kriterium einer mindestens dreifachen Transkriptionsänderung beim Vergleich des Wachstums auf Vollmedium mit Glucose als C-Quelle gegen jenes mit Mannitol. Diese uncharakterisierte PQQ-haltige Dehydrogenase mit der ERGO-Bezeichnung 0494 und der NCBI-Nummer GOX1857 weist ein Transkriptionsverhältnis von 0,18 auf. Es wurde somit etwa 5,6fach stärker transkribiert, wenn das Bakterium statt auf Glucose auf Mannitol als C-Quelle wuchs. Die anderen Fluoreszenzintensitätsverhältnisse zeigten hingegen keine signifikante Transkriptionsänderung. Das bedeutete, die Gene wurden unter beiden getesteten Bedingungen in etwa gleich stark transkribiert.

Da eines der Qualitätskriterien bei der Auswertung der Microarray-Daten aus dem Vorliegen einer Fluoreszenzintensität, nach Abzug der Hintergrund-Intensität sowie der Standardabweichung des Hintergrundsignals, von größer als Null bestand, wurde vermutet, dass die o.g. Gene auch tatsächlich transkribiert wurden. Um dies zu bestätigen, wurde exemplarisch, anhand der Versuchsbedingungen eines Zellwachstums im Chemostat auf Glucose- oder Mannitol-Vollmedium, die Intensität der Fluoreszenzsignale bestimmt (nach QUACKENBUSCH, 2002). Dafür wurde der Logarithmus zur Basis zehn des Produkts des roten- (Cy5) und grünen (Cy3) Farbsignals errechnet. Auch hierbei wurden, wie zuvor bei der Bestimmung des *ratio of medians*, das Hintergrundsignal und die Standardabweichung des Hintergrundes vom Vordergrundsignal abgezogen. In diese Berechnung wurden fünf Microarray-Analysen mit jeweils zwei Messpunkten für jedes Gen, also insgesamt zehn Messpunkte pro Gen einbezogen. Außerdem wurde eine Gesamtintensität der Negativkontrolle der *scorecard* von 4,35 (ebenfalls das arithmetische Mittel über die Einzeldaten von fünf Microarrays) abgezogen. Bei diesen Experimenten waren jeweils die Glucose-Bedingung rot- und die Mannitol-Bedingung grün markiert. Der $\log_{10}(R \cdot G)$ wurde zunächst für jeden Messpunkt errechnet, um dann daraus ein arithmetisches Mittel für jedes der in Tab 17 gezeigten Gene zu bestimmen.

Tab. 17: Gesamt-Fluoreszenzintensität ($\log_{10} (R \cdot G)$) von ausgewählten Dehydrogenasen beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Mannitol.

NR.	ERGO	Annotation	$\log_{10} (R \cdot G)$
1	0731	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	n.d.
2	2454	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	3,53
	2455	ADH gr. Untereininh. (membrangeb. PQQ-abh.)	3,67
3	1934	Cyt. c Untereinheit d. Aldehyd-Dehydrogenase	0,86
	1935	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	1,60
	1936	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Untereininh.	0,77
4	1549	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	n.d.
5	2631	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	1,89
	2632	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	1,92
	2633	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	2,32
6	3621	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.
	2231	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	2,15
7	0754	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	1,33
	0755	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	0,77
	0757	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	2,62
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen		s. Tab 19
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen		s. Tab. 19
10	3500	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.
	0027	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	0,99
	0494	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	3,49
	0618	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	2,11
11	0667	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	2,62
12	0864	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	0,92
13	2001	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	2,50
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen		s. Tab. 19
15	0010	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	1,89
16	2223	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	1,25
17	3517	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.
18	0671	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	1,40
19	1603	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	1,50
20	2657	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	1,28

Diese Daten bestätigten, dass die dazugehörigen Gene deutlich transkribiert wurden, wenn auch in verschiedenem Ausmaß.

Gezeigt werden konnte also nicht nur eine in etwa gleiche Transkriptionsregulation der genannten Gene unter den getesteten Bedingungen, sondern auch ein sich deutlich vom Hintergrund abhebendes Fluoreszenzsignal, das auf die tatsächlich erfolgende Transkription schließen ließ. Inwiefern dies auch für die in der Tabelle 16 und 17 nicht angegebenen ORFs uncharakterisierter Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen zutrif, darauf geben die nun folgenden Tabellen 18 und 19 einen Hinweis:

Tab. 18: Transkriptionsregulation weiterer, in Tab. 16 nicht genannter Enzyme in auf Vollmedium mit Glucose oder Mannitol gewachsenen Chemostat-Kulturen.

Ein *ratio of medians* > 1 kennzeichnet eine verstärkte Transkription auf Glucose, ein *ratio* < 1 die verstärkte Transkription auf Mannitol.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1485	GOX0201	NAD(P)H-flavin oxidoreduct., nitroreduct. family	1,04
1579	GOX0290	Putative oxidoreductase	1,14
1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreduct.	1,02
1784	GOX0454	Putative transmembrane oxidoreductase	0,49
1787	GOX0458	Putative oxidoreductase	0,94
1810	GOX0476	Putative oxidoreductase	1,90
1813	GOX0478	Putative oxidoreductase	0,90
1869	GOX0525	Putative oxidoreductase	0,82
1952	GOX0601	Putative oxidoreductase	1,13
1999	GOX0642	Putative oxidoreductase	0,87
2003	GOX0646	Putative oxidoreductase	1,14
2080	GOX0716	Putative oxidoreductase	0,88
2206	GOX0834	Putative oxidoreductase	1,22
2245	GOX0868	Electron transf. flavoprot.-uq oxidored./put. oxidored.	0,78
3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	0,97
2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	0,56
2286	GOX0905	Putative oxidoreductase	0,93
2332	GOX0946	Putative oxidoreductase	1,02
2337	GOX0950	Putative oxidoreductase	1,29
2422	GOX1034	Putative oxidoreductase	0,68
2458	GOX1071	Putative oxidoreductase	0,80
2539	GOX1139	Putative oxidoreductase	1,41
2595	GOX1199	Putative oxidoreductase	0,89
2700	GOX1292	Putative oxidoreductase	0,52
2753	GOX1356	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,73
2800	GOX1400	Putative oxidoreductase	1,06
0044	GOX1452	Putative oxidoreductase	1,06
0058	GOX1458	Putative oxidoreductase	1,08
0065	GOX1462	Putative oxidoreductase	0,75
0091	GOX1495	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,96
0134	GOX1538	Putative oxidoreductase	1,49
0194	GOX1598	Putative oxidoreductase	1,09
0212	GOX1615	Putative oxidoreductase	1,23
0228	GOX1630	Putative oxidoreductase	1,43
0330	GOX1717	Putative oxidoreductase	0,72

0427	GOX1801	Putative oxidoreductase	0,79
0542	GOX1899	Putative oxidoreductase	0,66
0690	GOX2036	Putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	0,59
0771	GOX2107	NADPH-spec. quinone oxidoreduct. (drug modulator)	0,66
0828	GOX2159	Putative oxidoreductase	0,97
0959	GOX2253	Putative oxidoreductase (similar to HpnA)	0,92
3006	GOX2371	Putative oxidoreductase	1,40
1138	GOX2403	Putative oxidoreductase (NAD-binding motive)	1,11
1167	GOX2418	Putative oxidoreductase	1,12
2907	GOX2594	Putative oxidoreductase transmembrane protein	0,80
3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	0,88

Tab. 19: Gesamt-Fluoreszenzintensität ($\log_{10} (R^*G)$) von uncharakterisierten Enzymen beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Mannitol.

ERGO	Annotation	$\log_{10} (R^*G)$
1485	NAD(P)H-flavin oxidoreduct., nitroreduct. family	n.d.
1579	Putative oxidoreductase	0,77
1604	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreduct.	1,49
1784	Putative transmembrane oxidoreductase	n.d.
1787	Putative oxidoreductase	1,24
1810	Putative oxidoreductase	n.d.
1813	Putative oxidoreductase	3,16
1869	Putative oxidoreductase	1,02
1952	Putative oxidoreductase	2,38
1999	Putative oxidoreductase	1,39
2003	Putative oxidoreductase	1,08
2080	Putative oxidoreductase	0,72
2206	Putative oxidoreductase	1,17
2245	Electron transf. flavoprot.-uq oxidored./put. oxidored.	1,11
3513	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	0,60
2248	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	2,53
2286	Putative oxidoreductase	n.d.
2332	Putative oxidoreductase	2,51
2337	Putative oxidoreductase	0,83
2422	Putative oxidoreductase	0,78
2458	Putative oxidoreductase	0,56
2539	Putative oxidoreductase	1,19
2595	Putative oxidoreductase	1,14
2700	Putative oxidoreductase	0,41
2753	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	1,57
2800	Putative oxidoreductase	1,28
0044	Putative oxidoreductase	0,98
0058	Putative oxidoreductase	0,96
0065	Putative oxidoreductase	1,59
0091	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	1,11
0134	Putative oxidoreductase	2,10
0194	Putative oxidoreductase	1,01

0212	Putative oxidoreductase	2,26
0228	Putative oxidoreductase	n.d.
0330	Putative oxidoreductase	0,67
0427	Putative oxidoreductase	0,91
0542	Putative oxidoreductase	2,62
0690	Putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	1,13
0771	NADPH-spec. quinone oxidoreduct. (drug modulator)	n.d.
0828	Putative oxidoreductase	1,33
0959	Putative oxidoreductase (similar to HpnA)	1,80
3006	Putative oxidoreductase	0,83
1138	Putative oxidoreductase (NAD-binding motive)	1,69
1167	Putative oxidoreductase	2,61
2907	Putative oxidoreductase transmembrane protein	0,96
3589	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	2,39

Auch anhand der Daten in diesen zwei Tabellen konnte geschlossen werden, dass die Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen in *G. oxydans* 621H unter den hier betrachteten Bedingungen deutlich transkribiert (s. Tab. 19), beim Wechsel der C-Quelle aber offensichtlich nicht signifikant in ihrer Transkription reguliert wurden (s. Tab 18). Keiner der hier angegebenen ORFs veränderte beim Wechsel des Substrats seine Transkription um das mindestens dreifache.

3.4.1.2. Expression der Gene des zentralen C-Stoffwechsels

Im vorangegangenen Kapitel war bereits vom Vorhandensein löslicher Dehydrogenasen die Rede, die möglicherweise der Bereitstellung von Metaboliten für den Anabolismus dienen. Neben diesen Enzymen sind jedoch die Möglichkeiten des Substratabbaus in *G. oxydans* eingeschränkt. Eine vollständige Glykolyse ist aufgrund des fehlenden Schlüsselenzyms, der 6-Phosphofructokinase, nicht möglich. Auch der Tricarbonsäurezyklus ist unterbrochen. Über das Vorhandensein des KDPG-Wegs war zunächst nicht viel bekannt. Lange Zeit galt deshalb der Pentosephosphatweg als der wichtigste Weg des Zentralstoffwechsels in *G. oxydans* 621H zur Bereitstellung des reduzierten Kofaktors NADPH und von wichtigen Ausgangssubstanzen für Syntheseprozesse. Erst das Genomsequenzierungsprojekt von PRUST (2004) deckte die genetische Grundlage für die Enzymausstattung des KDPG-Wegs auf. Zur Veranschaulichung werden nachfolgend der Pentosephosphat-Weg (Abb. 16) und der KDPG-Weg (Abb. 17) mit den ORFs der beteiligten Enzyme schematisch dargestellt (nach PRUST, 2004). Die in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsexperimente

sollten nun Daten zur Transkription der an diesen Stoffwechselwegen beteiligten Gene liefern.

Abb. 16: Die Reaktionen des Pentosephosphat-Weges sowie der beteiligten Enzyme in der Übersicht (nach PRUST, 2004).

Die Nummerierung entspricht der ERGO-Bezeichnung der ORFs. GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat; -P = Phosphat; TA = Transaldolase; TK = Transketolase.

Abb. 17: Überblick über die Reaktionen des KDPG-Weges und der daran beteiligten Enzyme (nach PRUST, 2004).

Die Nummerierung entspricht der ERGO-Bezeichnung der ORFs. GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat; Glc-6-P-DH = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; KDPG = 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat; -P = Phosphat, -phospho;. Die Umwandlung des GAP zum Pyruvat erfolgt wie in der Glykolyse über die GAP-DH, Phosphoglycerat-Kinase, Phosphoglyceromutase, Enolase und Pyruvat-Kinase.

Die Transkriptionsdaten zu den in den Abbildungen 16 und 17 aufgeführten ORFs der am Pentosephosphat- und KDPG-Weg beteiligten Enzyme befinden sich in der Tabelle 20, die nachfolgend gezeigt ist. Vorab ist anzumerken, dass der von PRUST genannte ORF 1008 nach Überarbeitung der Sequenzinformation nicht mehr existent ist. Die Enolase wird lediglich vom ORF 1007 kodiert.

Tab. 20: Daten zur Transkription von Genen des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) oder Mannitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

ERGO	NCBI	Annotation	<i>ratio</i>
<u>Pentosephosphat-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,06
0321	GOX1709	Gluconokinase	1,43
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,35
0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase	1,39
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	1,59
0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase	1,53
2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,45
0314	GOX1703	Transketolase	1,52
0315	GOX1704	Transaldolase	1,72
<u>KDPG-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,06
0321	GOX1709	Gluconokinase	1,43
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,35
2775	GOX1375	Gluconolactonase	1,26
2781	GOX1381	Gluconolactonase	1,62
1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase	1,4
1756	GOX0430	KDPG aldolase	1,07
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,32
1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase	1,16
1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase	1,02
1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain)	n.d.
0955	GOX2250	Pyruvate kinase	1,21

Die Daten in der Tabelle 20 geben einen Überblick über die Transkriptionsregulation der Gene von am Pentosephosphat- und/oder KDPG-Weg beteiligten Enzymen. Werte des *ratio of medians* um die 1,0 deuteten eine sehr ähnliche Transkription der ORFs unter beiden Bedingungen an. Eine signifikante Transkriptionsänderung unter einer der getesteten Bedingungen konnte nicht beobachtet werden. Wie erwähnt, sind die in der Tabelle genannten Werte ein Maß für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der markierten cDNA beider untersuchter Versuchsbedingungen. Wie in den Abschnitten zuvor, so blieb auch für die hier aufgeführten Stoffwechselwege zu zeigen, ob die

Fluoreszenzintensitäten nach Abzug der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle deutlich über dem Hintergrundsignal lagen. Der $\log_{10} (R \cdot G)$ wurde erneut zunächst für jeden Messpunkt errechnet um dann daraus ein arithmetisches Mittel für jedes der in Tab 21 gezeigten Gene zu bestimmen.

Tab. 21: Gesamt-Fluoreszenzintensität ($\log_{10} (R \cdot G)$) zum Nachweis der Transkription von Genen des KDPG- und des Pentosephosphatweges beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Mannitol.

ERGO	NCBI	Annotation	$\log_{10} (R \cdot G)$
<u>Pentosephosphat-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,61
0321	GOX1709	Gluconokinase	1,46
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	3,36
0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase	2,50
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	3,52
0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase	0,90
2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,45
0314	GOX1703	Transketolase	2,42
0315	GOX1704	Transaldolase	2,06
<u>KDPG-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,61
0321	GOX1709	Gluconokinase	1,46
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	3,36
2775	GOX1375	Gluconolactonase	1,15
2781	GOX1381	Gluconolactonase	2,50
1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase	1,40
1756	GOX0430	KDPG aldolase	1,42
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2,96
1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase	2,59
1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase	2,42
1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain)	n.d.
0955	GOX2249	Pyruvate kinase	2,56

3.4.1.3. Expression der Gene von Atmungsketten-Komponenten

Den Daten der Sequenzierung durch PRUST (2004) ließ sich entnehmen, dass kein ORF einer protonentranslozierenden NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (entsprechend

dem Komplex I der Atmungskette in Mitochondrien), keine Succinat-Dehydrogenase des TCC (entsprechend dem Komplex II) und auch keine Cytochrom c Oxidase (dem Komplex IV entsprechend) im Genom von *G. oxydans* 621H identifiziert werden konnten. Auf ein Vorhandensein verschiedener anderer Atmungskettenkomponenten konnte jedoch geschlossen werden. Hierzu zählen neben den membrangebundenen Dehydrogenasen, die die bei der Oxidation eines Substrates anfallenden Elektronen direkt in die Atmungskette einschleusen, z.B. auch die terminalen Oxidasen und eine Transhydrogenase. Eine Auswahl der für den Energiestoffwechsel und die Biosynthese von PQQ sowie Ubichinon benötigten Gene ist in Tabelle 22 zusammengestellt.

Tab. 22: Transkriptionsregulation einer Auswahl benötigter Gene für den Energiestoffwechsel und die Kofaktor-Biosynthese.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) oder Mannitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
0164	GOX1568	Cytochrome b561	0,58
1542	GOX0258	Putative cytochrome c-552	0,78
1913	GOX0564	Cytochrome c precursor	0,99
1563	GOX0278	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	0,84
1564	GOX0279	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	0,85
0554	GOX1911	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	0,78
0555	GOX1912	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	0,88
0557	GOX1913	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	0,82
0558	GOX1914	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	0,77
1914	GOX0565	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	1,15
1915	GOX0566	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit	1,10
1916	GOX0567	Ubiquinol-cytochrome-c reduct. cytochrome c1	0,94
2972	GOX2658	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	1,08
1600	GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	1,69
1601	GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	1,08
1602	GOX0312	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	1,27
2370	GOX0983	Coenzyme PQQ synthesis protein E	1,10
3312	GOX0984	Coenzyme PQQ synthesis protein D	1,41
2372	GOX0985	Coenzyme PQQ synthesis protein C	1,0
2373	GOX0986	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,04
1306	GOX0038	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	0,98
2790	GOX1390	Methyltransferase inv. ubiquinone/menaquinone biosynthesis	0,80
0623	GOX1975	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase	0,84

1259	GOX2500	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	1,22
0245	GOX1647	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH (C-term. missing)	0,81
0247	GOX1648	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	0,87
0249	GOX1650	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	0,85
0250	GOX1651	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	0,79

inv = involved in; reduct. = reductase; term. = terminus

Die Microarray-Daten der Atmungskettenkomponenten in obenstehender Tabelle ließen für jeden der ORFs eine Transkription vermuten. Diese wurde beim Wachstum auf den C-Quellen Glucose oder Mannitol in Vollmedium nicht signifikant verändert, da keines der berechneten Verhältnisse eine Änderung um einen Faktor von mindestens drei zeigte. Selbst eine Verringerung der Signifikanzgrenze auf nur 2,5fache Regulation ergab keine Auffälligkeit. Auf der Grundlage der Daten lässt sich daher für die hier untersuchten Bedingungen das folgende Bild von der Atmungskette in *G. oxydans* 621H zeichnen (s. Abb. 18a und b). Die unter den untersuchten Bedingungen konstitutiv transkribierten membrangebundenen Dehydrogenasen leiten die Reduktionsäquivalente über einen membranständigen Ubichinonpool auf die terminalen Oxidasen weiter, wo sie auf Sauerstoff übertragen werden (Abb. 18a). Die Funktion eines Cytochrom *bc*₁-Komplexes in *G. oxydans* 621H ist jedoch unklar, da im Genom die Information für eine Cytochrom *c*-Oxidase fehlt. Im cytoplasmatischen Stoffwechsel entstehendes NADH wird über eine nicht-protonentranslozierende Typ II NADH-Dehydrogenase regeneriert. Dabei werden die Reduktionsäquivalente ebenfalls in den membranständigen Ubichinonpool eingespeist. Lösliche Dehydrogenasen können die anfallenden Reduktionsäquivalente aber auch auf NADP übertragen. Nach PRUST (2004) wäre denkbar, dass NADPH an einer Transhydrogenase regeneriert wird, was dann, neben der Reduktion von NAD, auch mit einer Protonentranslokation gekoppelt sein könnte (Abb. 18b).

Abb. 18a: Ableitung eines Elektronenflusses über membranständige Proteine aus den Daten der Transkriptionsanalyse.

Als Datengrundlage diente ein Vergleich der Transkriptionen nach Wachstum auf Glucose bzw. Mannitol in Vollmedium im Chemostat. Abkürzungen: Cyt = Cytochrom; UQ / UQH₂ = Ubichinon / Ubichinol

Abb. 18b: Kofaktorregenerierung durch Übertragung der Reduktionsäquivalente auf die Atmungskette.

Die Daten beruhen auf einem Vergleich der Transkriptionen nach Wachstum auf Glucose bzw. Mannitol in Vollmedium im Chemostat. Abkürzungen: cytopl. = cytoplasmatisch; UQ / UQH₂ = Ubichinon / Ubichinol

3.4.1.4. Zusammenstellung sonstiger auffällig regulierter Gene

Die bislang präsentierten Daten für die Transkriptionsregulation von löslichen und membranständigen Dehydrogenasen, für Enzyme des zentralen Kohlenstoffwechsels und auch für Atmungskettenkomponenten, zeigten eine weitgehend unveränderte Transkription im Vergleich der C-Quellen Glucose und Mannitol in Vollmedium nach Wachstum der Zellen im Chemostat. Nun wurde gezielt nach Genen gesucht, die auf einer der beiden Bedingungen deutlich, d.h. dreifach reguliert wurden. Für die Glucose-Bedingung waren dies die ORFs mit der ERGO-Nr. 1387 (NCBI-Nr. GOX0111) und 0364 (NCBI-Nr. GOX1749) einer putativen Permease respektive eines hypothetischen Proteins. Die Regulation der putativen Permease (ORF 1387) war 4fach, die des hypothetischen Proteins (ORF 0364) 3,8fach. Setzt man die Signifikanzgrenze auf mindestens 2,5fach herab, so kommt noch ein hypothetisches Transmembranprotein (ERGO-ORF-Nr. 0347/ NCBI-Nr. GOX1734) mit einer 2,6fachen Regulation hinzu.

Bei Betrachtung der Mannitol-Bedingung fielen bei einer Signifikanzgrenze von mindestens dreifacher Regulation zwei ORFs auf. Zum einen war dies eine uncharakterisierte PQQ-enhaltende Dehydrogenase, die bereits in Tabelle 15 des Kapitels 3.4.1.1. aufgeführt wurde. Dieses Enzym mit der ERGO-Bezeichnung 0494 (NCBI GOX1857) war etwa 6fach reguliert. Zudem wurde der ORF 0681 (NCBI GOX2028) eines hypothetischen Proteins etwa 7fach auf Mannitol als C-Quelle erhöht transkribiert. Setzte man die Signifikanzgrenze auch hier auf 2,5fach herab, konnte noch der ORF 1276 (NCBI GOX0013) eines hypothetischen Proteins zu den auffällig regulierten Enzymen hinzugerechnet werden.

Fasst man das Resultat dieser o.g. offenbar regulierten Gene zusammen, so fällt auf, dass es sich dabei um Gene bislang nicht charakterisierter, putativer oder hypothetischer Proteine handelt. Insofern unterstützt dieses Ergebnis die Aussage, über den Stoffwechsel dieses seit geraumer Zeit biotechnologisch genutzten Bakteriums sei noch einiges nicht bekannt. Mit Hilfe der hier durchgeführten Transkriptionsanalysen können nun gezielt auffällig regulierte ORFs genannt werden. Diese genomweiten Daten schaffen somit eine Basis für einen detaillierten Einblick, auf dessen Grundlage gezielt weitere Experimente auf biochemischer Ebene folgen können, um die Funktion dieser

bislang unbekannten Proteine zu verstehen und den industriellen Einsatz dieses Bakteriums zu optimieren.

3.4.2. Genexpression bei Wachstum mit Glucose im Vergleich zum Wachstum mit Sorbitol

Nach der vergleichenden Analyse der Genexpression beim Wachstum auf Glucose bzw. Mannitol, wurde die Transkription von Genen beim Wachstum mit einer weiteren C-Quelle untersucht. Die Referenzbedingung bildete erneut das Vollmedium mit 50 mM Glucose. Als Testbedingung wurde nun Sorbitol als C-Quelle (ebenfalls 50 mM) eingesetzt. Wie auch beim Versuch mit Mannitol, wurden die Chemostat-Parameter für die Zellanzuchten in Glucose- und Sorbitolmedium auf pH 6,0, 30 °C und einen pO₂-Wert von 80 % des Luftsauerstoff-Partialdrucks eingestellt. Die Wachstumsraten entsprachen den in Vorversuchen ermittelten halbmaximalen Wachstumsraten (vgl. Tab 14 Kapitel 3.3.1.). Die Auswertung erfolgte analog zu den im Kapitel 3.4.1. bearbeiteten Fragestellungen nach der Transkription von Dehydrogenasen beziehungsweise Oxidoreduktasen im allgemeinen, aber auch im Hinblick auf eine spezielle Auswahl dieser Enzyme. Zudem interessierten auch hier die Gen-Transkriptionen von Atmungskettenkomponenten und der zentralen Stoffwechselwege. Abschließend erfolgte die Analyse des Datensatzes auf anderweitige Gene mit auffällig veränderter Transkription unter einer der Bedingungen.

3.4.2.1. Expression der Gene von Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen

Wie im Kapitel 3.4.1., beim Transkriptionsvergleich nach Wachstum von *G. oxydans* 621H auf Glucose- und Mannitol-Vollmedium im Chemostat, wurde auch hier, beim Vergleich der Bedingungen Glucose oder Sorbitol als C-Quelle, zunächst allgemein die Transkription von Dehydrogenasen betrachtet (Tab. 23).

Tab. 23: Transkriptionsregulation von Dehydrogenasen beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Sorbitol.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) oder Sorbitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

ERGO-Nr.	Gen ID (NCBI-Nr.)	Annotation	<i>ratio</i> Glc/Sorb
1337	GOX0065	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,34
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,82
1473	GOX0191	3-Isopropylmalate dehydrogenase	1,31
1507	GOX0218	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,33
1603	GOX0313	soluble alcohol dehydrogenase	1,41
1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreductase protein	1,26
1742	GOX0417	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase	1,34
1807	GOX0473	Dihydroorotate dehydrogenase	1,33
1838	GOX0499	Putative NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	0,83
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,08
1918	GOX0569	Aldehyde dehydrogenase-like protein	1,55
1934	GOX0585	Cytochrome c subunit of aldehyde dehydrogenase	1,39
1935	GOX0586	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase, small subunit	1,32
1936	GOX0587	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase, large subunit	0,99
1988	GOX0632	D-amino acid dehydrogenase small subunit	1,78
2009	GOX0652	Xanthine dehydrogenase Xdh C protein	1,81
2010	GOX0653	Xanthine dehydrogenase XdhB protein	1,98
2124	GOX0756	Alcohol dehydrogenase 15 kDa subunit	0,89
2159	GOX0792	Methylene-THF dehydrogenase	1,34
2231	GOX0855	D-Sorbitol dehydrogenase subunit SldB	1,17
2241	GOX0865	Xylitol Dehydrogenase	1,25
2255	GOX0878	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	0,93
2260	GOX0882	2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 component	1,22
2310	GOX0924	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,24
2377	GOX0991	Histidinol dehydrogenase	1,73
2454	GOX1067	Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit precursor	1,41
2455	GOX1068	Alcohol dehydrogenase large subunit (membrane-bound, PQQ-linked)	0,96
2460	GOX1073	(E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase	1,31
2523	GOX1122	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	1,81
2565	GOX1168	Putative membrane-bound dehydrogenase	1,45
2631	GOX1230	Gluconate 2-dehydrogenase, cytochrome c subunit	0,68
2632	GOX1231	Gluconate 2-dehydrogenase alpha chain	0,71
2633	GOX1232	Gluconate 2-dehydrogenase gamma chain	0,64
2657	GOX1253	D-Lactate dehydrogenase (NAD dependent)	0,88
2708	GOX1300	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,08
2731	GOX1336	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	1,11
0010	GOX1432	NADP-D-sorbitol dehydrogenase	1,09
0027	GOX1441	Uncharacterized PQQ-dependent dehydrogenase 3	1,04
0094	GOX1497	Acyl-CoA dehydrogenase	1,19
0280	GOX1675	NADH dehydrogenase type II	1,11
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	1,04
0325	GOX1712	Aldehyde dehydrogenase (low similarity to L-sorbose dehydrogen.)	0,69

0494	GOX1857	Uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 1	0,31
0607	GOX1959	Shikimate 5-dehydrogenase	1,59
0618	GOX1969	Uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 2	1,31
0667	GOX2015	NAD(P)-dependent glucose 1-dehydrogenase	1,56
0671	GOX2018	Aldehyde dehydrogenase (involved in Pyruvate degradation)	1,82
0731	GOX2071	D-Lactate dehydrogenase (cytochrome c-dependent)	1,90
0748	GOX2088	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1,01
0754	GOX2094	Sorbitol dehydrogenase cytochrome c subunit	1,33
0755	GOX2095	Sorbitol dehydrogenase large subunit	1,20
0757	GOX2097	Sorbitol dehydrogenase small subunit	1,34
0772	GOX2108	NADH-dependent iron-containing alcohol dehydrogenase	1,15
0781	GOX2117	Proline dehydrogenase/d-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	1,29
0855	GOX2181	Putative polyol dehydrogenase	0,82
0864	GOX2187	Gluconate 5-dehydrogenase (NADP dependent)	1,46
0898	GOX2215	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,52
0956	GOX2251	Putative arogenate dehydrogenase / prephenate dehydrogenase	1,14
0989	GOX2265	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	1,34
1021	GOX2290	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	1,57
1022	GOX2291	Dihydrolipoamide acetyltransferase comp. of pyruvate dehydrogenase	1,62
1023	GOX2292	Dihydrolipoamide dehydrogenase	1,49
1107	GOX2376	Putative aldehyde dehydrogenase	0,63
1110	GOX2378	Short chain alcohol dehydrogenase	1,23
3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	1,19
2245	GOX0868	Electron transfer flavoprot.-ubiquinone oxidoreduct/put. oxidoreduct.	1,26
3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	1,79
2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	1,65

Bei der Auswertung der oben gezeigten Transkriptionsregulationswerte fiel zunächst kein signifikanter Unterschied zu den in Tab. 15 des Kapitels 3.4.1.1. aufgelisteten Werten auf. Auch hier wird eine konstitutive Transkription einer Vielzahl von Dehydrogenasen vermutet. Nur bei einer Ausnahme war beim Vergleich der Glucose-Bedingung mit der Sorbitol-Bedingung eine deutliche Regulation der Transkription am *ratio of medians* erkennbar. Dies betraf wie schon im zuvor durchgeführten Experiment den ORF mit der ERGO-Nummer 0494 (NCBI GOX1857). Offensichtlich wurde dieser ORF im Vergleich zu Glucose sowohl auf Mannitol als C-Quelle, als auch auf Sorbitol verstärkt transkribiert. Dieser ORF scheint daher sehr interessant für weitere Untersuchungen zu sein, in denen nach einer Aufreinigung dieses Enzyms das Substratspektrum biochemisch zu bestimmen wäre. Aufgrund der verstärkten Transkription auf Mannitol und Sorbitol besteht die Vermutung, dass die Substratspezifität dieses Enzyms nicht sehr eng gefasst ist, und darum möglicherweise auch weitere, für industrielle Anwendungen interessante Substrate umgesetzt werden können.

In der nun folgenden Tabelle 24 wurden die Transkriptionsregulationswerte einiger ausgewählter Enzyme aufgelistet. Wie bereits im Kapitel 3.4.1.1. sind dies jene prominenten Enzyme, die in der Literatur von PRUST *et al.* (2005) aufgeführt, und in der vorliegenden Arbeit in Abb. 15 zur besseren Übersicht dargestellt wurden.

Tab. 24: Auswertung der Hybridisierungsexperimente für die in Abb. 15 aufgelisteten Enzyme.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) bzw. Sorbitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

NR.	ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1	0731	GOX2071	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	1,90
2	2454	GOX1067	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	1,41
	2455	GOX1068	ADH gr. Untereininh. (membrangeb. PQQ-abh.)	0,96
3	1934	RGOX0585	Cyt. c Untereinheit d. Aldehyd-Dehydrogenase	1,39
	1935	RGOX0586	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	1,32
	1936	RGOX0587	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Untereinheit	0,99
4	1549	GOX0265	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	n.d.
5	2631	GOX1230	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	0,68
	2632	GOX1231	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	0,71
	2633	GOX1232	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	0,64
6	3621	GOX0854	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.
	2231	GOX0855	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	1,17
7	0754	GOX2094	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	1,33
	0755	GOX2095	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	1,20
	0757	GOX2097	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	1,34
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen, s. Tab. 25			
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen, s. Tab. 25			
10	3500	GOX0516	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.
	0027	GOX1441	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	1,04
	0494	GOX1857	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	0,31
	0618	GOX1969	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	1,31
11	0667	GOX2015	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	1,56
12	0864	GOX2187	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	1,46
13	2001	GOX0644	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	1,02
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen, s. Tab. 25			
15	0010	GOX1432	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	1,98
16	2223	GOX0849	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	1,41
17	3517	GOX1081	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.
18	0671	GOX2018	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	1,82
19	1603	GOX0313	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	1,41
20	2657	GOX1253	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	0,88

n.d. = nicht auswertbar

Bei Betrachtung der nach der allgemeinen Aufstellung in Tabelle 23 zur besseren Übersicht in Anlehnung an Abb. 15 hier gesondert aufgeführten Enzyme, wurde mit Ausnahme des ERGO-ORFs 0494 (NCBI GOX1857), einer uncharakterisierten PQQ-abhängigen Dehydrogenase, keine auffällige Gen-Regulation beim Vergleich des Wachstums auf Glucose bzw. Sorbitol gefunden. Dieser Befund entsprach den Erkenntnissen des Transkriptionsvergleichs von Glucose bzw. Mannitol im Vollmedium.

Inwieweit diese Vergleichbarkeit der beiden Experimente auch auf die Transkription weiterer Oxidoreduktasen zutrifft, zeigt die folgende Tabelle.

Tab. 25: ORF-Bezeichnungen nach ERGO und NCBI sowie Annotation weiterer, in Tab. 24 nicht genannter Dehydrogenasen bzw. Oxidoreduktasen.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) bzw. Sorbitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1485	GOX0201	NAD(P)H-flavin oxidoreduct., nitroreduct. family	0,80
1579	GOX0290	Putative oxidoreductase	0,89
1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreduct.	1,26
1784	GOX0454	Putative transmembrane oxidoreductase	1,33
1787	GOX0458	Putative oxidoreductase	1,11
1810	GOX0476	Putative oxidoreductase	n.d.
1813	GOX0478	Putative oxidoreductase	0,96
1869	GOX0525	Putative oxidoreductase	1,11
1952	GOX0601	Putative oxidoreductase	1,39
1999	GOX0642	Putative oxidoreductase	1,30
2003	GOX0646	Putative oxidoreductase	1,57
2080	GOX0716	Putative oxidoreductase	1,31
2206	GOX0834	Putative oxidoreductase	1,32
2245	GOX0868	Electron transf. flavoprot.-uq oxidored./put. oxidored.	1,26
3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	1,79
2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	1,65
2286	GOX0905	Putative oxidoreductase	1,65
2332	GOX0946	Putative oxidoreductase	1,32
2337	GOX0950	Putative oxidoreductase	1,33
2422	GOX1034	Putative oxidoreductase	1,01
2458	GOX1071	Putative oxidoreductase	1,29
2539	GOX1139	Putative oxidoreductase	1,48
2595	GOX1199	Putative oxidoreductase	1,24
2700	GOX1292	Putative oxidoreductase	1,14
2753	GOX1356	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,81
2800	GOX1400	Putative oxidoreductase	1,35
0044	GOX1452	Putative oxidoreductase	1,46
0058	GOX1458	Putative oxidoreductase	1,16
0065	GOX1462	Putative oxidoreductase	1,71

0091	GOX1495	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,95
0134	GOX1538	Putative oxidoreductase	1,55
0194	GOX1598	Putative oxidoreductase	1,77
0212	GOX1615	Putative oxidoreductase	1,66
0228	GOX1630	Putative oxidoreductase	1,87
0330	GOX1717	Putative oxidoreductase	1,56
0427	GOX1801	Putative oxidoreductase	1,26
0542	GOX1899	Putative oxidoreductase	1,32
0690	GOX2036	Putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	0,69
0771	GOX2107	NADPH-spec. quinone oxidoreduct. (drug modulator)	1,15
0828	GOX2159	Putative oxidoreductase	1,08
0959	GOX2253	Putative oxidoreductase (similar to HpnA)	1,11
3006	GOX2371	Putative oxidoreductase	1,20
1138	GOX2403	Putative oxidoreductase (NAD-binding motive)	1,31
1167	GOX2418	Putative oxidoreductase	1,77
2907	GOX2594	Putative oxidoreductase transmembrane protein	1,52
3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	1,19

Wie die Daten in den zuvor gezeigten Tabellen, so entsprachen auch die hier dargestellten Werte der Vermutung einer konstitutiven Expression einer Vielzahl verschiedener Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen in *G. oxydans* 621H unter den bislang getesteten Bedingungen. Eine signifikant abweichende Transkriptionsregulation dieser Enzyme fand dabei nicht statt. Ob die ermittelten Übereinstimmungen der wahrscheinlichen Transkription von Genen verschiedener Enzyme unter den hier getesteten Bedingungen auch bei der Transkriptionsregulation von Genen für zentrale Stoffwechselwege ihre Fortsetzung finden, soll im nächsten Kapitel beleuchtet werden.

3.4.2.2. Expression der Gene des cytoplasmatischen C-Stoffwechsels

Ein Blick in die nachfolgende Tabelle 26 zeigt, dass auch die dort angegebenen Gene zentraler Stoffwechselwege nicht abweichend transkribiert wurden, da eine signifikante Veränderung, der Transkription um einen Faktor von mindestens drei nicht festzustellen war. Als Resultat dieses Experimentes kann daher von einem parallelen Vorliegen beider Stoffwechselwege, also des Pentosephosphatweges und des KDPG-Weges, unter den gegebenen Bedingungen ausgegangen werden.

Tab. 26: Daten zur Transkription von Genen des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) bzw. Sorbitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
<u>Pentosephosphat-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,43
0321	GOX1709	Gluconokinase	0,61
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,82
0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase	0,85
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	1,04
0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase	1,15
2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,00
0314	GOX1703	Transketolase	2,11
0315	GOX1704	Transaldolase	0,87
<u>KDPG-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,43
0321	GOX1709	Gluconokinase	0,61
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,82
2775	GOX1375	Gluconolactonase	1,32
2781	GOX1381	Gluconolactonase	0,65
1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase	1,27
1756	GOX0430	KDPG aldolase	1,47
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,08
1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase	0,87
1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase	1,03
1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain)	n.d.
0955	GOX2249	Pyruvate kinase	1,00

n.d. = nicht auswertbar

3.4.2.3. Expression der Gene von Atmungsketten-Komponenten

Nach den bislang ermittelten Daten wäre zu erwarten gewesen, dass auch das Transkriptionsmuster der Atmungskettenkomponenten denen des experimentellen Vergleichs der Transkriptionen auf Glucose- und Mannitol-Vollmedium ähnelt. Eine Betrachtung der diesbezüglichen Daten des Glucose/Sorbitol-Experiments bestätigte diese Vermutung (s. Tab. 27).

Tab. 27: Transkriptionsregulation einer Auswahl benötigter Gene des Energiestoffwechsels und der Kofaktor-Biosynthese.

Angegeben ist das *ratio of medians* des Transkriptions-Vergleichs von auf Vollmedium mit Glucose- (*ratio* > 1) bzw. Sorbitol (*ratio* < 1) gewachsenen Chemostat-Kulturen.

ERGO	NCBI	Annotation	<i>ratio</i>
0164	GOX1568	Cytochrome b561	1,78
1542	GOX0258	Putative cytochrome c-552	1,96
1913	GOX0564	Cytochrome c precursor	1,31
1563	GOX0278	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	1,35
1564	GOX0279	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,18
0554	GOX1911	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	1,47
0555	GOX1912	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	1,32
0557	GOX1913	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	1,31
0558	GOX1914	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	1,28
1914	GOX0565	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	1,03
1915	GOX0566	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit	1,49
1916	GOX0567	Ubiquinol-cytochrome-c reduct. cytochrome c1	1,00
2972	GOX2658	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	1,18
1600	GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	1,60
1601	GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	1,09
1602	GOX0312	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	1,33
2370	GOX0983	Coenzyme PQQ synthesis protein E	0,95
3312	GOX0984	Coenzyme PQQ synthesis protein D	1,74
2372	GOX0985	Coenzyme PQQ synthesis protein C	1,14
2373	GOX0986	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,86
1306	GOX0038	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	1,17
2790	GOX1390	Methyltransferase inv. ubiquinone/menaquinone biosynthesis	1,89
0623	GOX1975	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase	1,48
1259	GOX2500	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	1,17
0245	GOX1647	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH (C-term. missing)	1,99
0247	GOX1648	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	1,51
0249	GOX1650	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	3,55
0250	GOX1651	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	2,08

inv = involved in; reduct. = reductase; term. = terminus

Die einzige Ausnahme zu den erwarteten Transkriptionsregulationswerten bildete der ORF 0249 (NCBI GOX1650) eines Cytochrom c Biogenese-Proteins, der mit einem etwa 3,5fach erhöhtem *ratio of medians* auf eine stärkere Transkription bei Wachstum auf Glucose gegenüber Sorbitol hindeutete. Hierzu muss jedoch angemerkt werden,

dass nur 50 % der für diesen ORF vorliegenden *features* der Microarrays ausgewertet werden konnten, die Datengrundlage hierfür also als eingeschränkt gelten muss. Die der Funktion einer Cytochrom c Biogenese ebenfalls zugeordneten ORFs 0245 (NCBI GOX1647), 0247 (NCBI GOX1648) und 0250 (NCBI GOX1651) wiesen hingegen nicht auf eine stärkere Transkription der Cytochrom c Biogenese hin. Das wiederum entspräche der für die anderen ORFs ermittelten Ähnlichkeit der Transkriptionslevel zum Experiment mit Glucose/Mannitol als Kohlenstoffquelle.

3.4.2.4. Zusammenstellung sonstiger auffällig regulierter Gene

Wie bereits beim Vergleich der Transkriptionen auf Glucose und Mannitol, so war auch beim hier durchgeführten Vergleich der Wachstumsbedingungen mit Glucose und Sorbitol als C-Quelle eine verstärkte Transkription des ORFs eines hypothetischen Proteins mit der ERGO-Nr. 0364 (NCBI GOX1749) zu beobachten. Auch der Transkriptionslevel respektive das *ratio of medians* ist mit 3,97 fast identisch zu der 3,8fachen Transkription auf Glucose des Glucose/Mannitol-Experiments. Auf Sorbitol wurden die ORFs 0494 (NCBI GOX1857) und 0681 (NCBI GOX2028) verstärkt transkribiert. Der ORF 0494 einer uncharakterisierten PQQ-enthaltenden Dehydrogenase war bereits auf Mannitol als C-Quelle mit einer etwa 6fachen Transkription aufgefallen, und besitzt hier ein etwa 4faches *ratio of medians* beim Wachstum auf Sorbitol. Auch das Gen des hypothetischen Proteins mit der ERGO-Nummer 0681 (NCBI GOX2028) wurde bereits auf Mannitol als Kohlenstoffquelle etwa 7fach verstärkt abgelesen, und fiel nun auch auf Sorbitol mit einer 6,5fachen Transkription gegenüber Glucose auf.

Durch Herabsetzen der Signifikanzgrenze für eine augenscheinlich verstärkte Transkription von mindestens dreifach auf mindestens 2,5fach konnten zwei weitere ORFs mit leicht erhöhtem *ratio of medians* auf Seiten des Sorbitols als C-Quelle identifiziert werden. Neben dem ORF 1276 (NCBI GOX0013), der bereits auf Mannitol 2,5fach und nun auch auf Sorbitol 3fach reguliert vorlag, wurde der ORF 2674 (NCBI GOX1269) eines hypothetischen Proteins mit 2,6fach höherer Transkription auf Sorbitol gegenüber Glucose identifiziert.

Somit waren nicht nur die Transkriptionsmuster an sich, sondern auch die Transkriptionsregulationswerte der beiden Hybridisierungsexperimente Glucose/Mannitol und Glucose/Sorbitol untereinander sehr ähnlich. Diese Vergleichbarkeit wird anhand ausgewählter Gene im folgenden Kapitel noch einmal deutlicher herausgestellt.

3.4.3. Vergleich der Transkriptionsregulation zwischen *batch*- und Chemostat-gewachsenen Kulturen

In den folgenden Tabellen sollen die Regulationswerte der bislang beschriebenen Hybridisierungsexperimente (Glucose/Mannitol und Glucose/Sorbitol) direkt gegenübergestellt werden um etwaige Unterschiede oder deren Vergleichbarkeit zu verdeutlichen. Zugleich wurden in diese Aufstellungen auch diejenigen Werte aufgenommen, die bei der Etablierung der Methode des Gesamtgenom-Microarrays für *Gluconobacter oxydans* 621H mit *batch*-, also Schüttelkulturen, erhalten wurden. Diese Schüttelkulturen wurden bei einer optischen Dichte von 0,7 – 0,8 geerntet. Bei diesen optischen Dichten befanden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Im Unterschied zur Chemostat-gewachsenen Kultur, bei deren Wachstum die C-Quelle limitiert war, befanden sich die Zellen der Schüttelkulturen im Zeitraum der logarithmischen Wachstumsphase im unlimitierten Zustand. So war auch ein Vergleich der Transkriptionsregulation des bezüglich der C-Quelle limitierten und des unlimitierten Wachstums möglich. In den folgenden Tabellen werden Transkriptionsregulationsverhältnisse der Vergleiche von Glucose/Mannitol- und Glucose/Sorbitol- Schüttelkulturen den entsprechenden Experimenten der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Chemostat-Versuche gegenübergestellt.

Tab. 28: Vergleich der Transkriptionsregulation von Genen des Pentosephosphat-Weges zwischen Chemostat- und Schüttelkulturen. Die Daten beruhen jeweils auf den Experimenten Glucose vs. Mannitol und Glucose vs. Sorbitol. Ein *ratio of medians* > 1 wurde auf Glucose bezogen, *ratios* < 1 zeigten eine verstärkte Transkription auf Mannitol bzw. Sorbitol an.

ERGO		Annotation	<i>batch</i>	<i>batch</i>	Chem	Chem
			Glc/Man	Glc/Sor	Glc/Man	Glc/Sor
		<u>Pentosephosphat-Weg</u>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>
1170	Glucokinase		1,07	n.d.	1,06	1,43
0321	Gluconokinase		0,82	0,76	1,43	0,61
1424	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase		0,69	1,40	1,35	0,82
0318	6-Phosphogluconolactonase		0,54	0,83	1,39	0,85
0316	6-Phosphogluconate dehydrogenase		0,59	1,23	1,59	1,04
0320	Ribose 5-phosphate isomerase		n.d.	0,59	1,53	1,15
2749	Ribulose-phosphate 3-epimerase		0,57	1,11	1,45	1,00
0314	Transketolase		0,72	1,19	1,52	2,11
0315	Transaldolase		0,59	1,01	1,72	0,87

Aus Platzgründen ist lediglich die ERGO-Bezeichnung angegeben. Die NCBI-Nummer kann aus dem Anhang ersehen werden. Abkürzungen: Glc = Glucose; Man = Mannitol; Sor = Sorbitol; *ratio* = *ratio of medians*-Durchschnittswerte; n.d. = nicht auswertbar

Ein Blick in die Tabelle 28 zeigte, dass keines der Gene für Enzyme des Pentosephosphatweges signifikant, d.h. mindestens dreifach reguliert wurde. Insofern konnte gefolgert werden, dass bei der Regulation des Pentosephosphatweges kein wesentlicher Unterschied zwischen dem limitierten Wachstum im Chemostat oder dem unlimitierten Wachstum in der *batch*-Kultur für die Zelle bestand. Auch eine Unterscheidung auf Ebene der genetischen Regulation bei Wachstum auf Glucose, Mannitol oder Sorbitol erfolgte offensichtlich nicht. Dieses Resultat bestätigte die gängige Annahme, dass der Pentosephosphatweg die wesentliche Basis zur Bereitstellung von Intermediärmetaboliten und reduzierten Kofaktoren in *G. oxydans* darstellt. In dieser für das Zellwachstum unerlässlichen Funktion wäre auch eine nahezu konstitutive Expression dieser Enzyme unter Vollmedium-Bedingungen mit ausreichend Nährstoffen zu erwarten. Die Tabelle 29 beschreibt die Regulation der für den KDPG-Weg notwendigen Gene.

Tab. 29: Vergleich der Transkriptionsregulation von Genen des KDPG-Weges zwischen Chemostat- und Schüttelkulturen.

Die Daten beruhen jeweils auf den Experimenten Glucose vs. Mannitol und Glucose vs. Sorbitol. Ein *ratio of medians* > 1 wurde auf Glucose bezogen, *ratios* < 1 zeigten eine verstärkte Transkription auf Mannitol bzw. Sorbitol an.

ERGO	Annotation	<i>batch</i>	<i>batch</i>	Chem	Chem
		Glc/Man	Glc/Sor	Glc/Man	Glc/Sor
	<u>KDPG-Weg</u>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>
1170	Glucokinase	1,07	n.d.	1,06	1,43
0321	Gluconokinase	0,82	0,76	1,43	0,61
1424	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,69	1,40	1,35	0,82
2775	Gluconolactonase	0,77	0,66	1,26	1,32
2781	Gluconolactonase	0,64	1,14	1,62	0,65
1757	Phosphogluconate dehydratase	1,13	0,39	1,4	1,27
1756	KDPG aldolase	0,97	0,73	1,07	1,47
1847	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,82	0,75	1,32	1,08
1846	Phosphoglycerate kinase	0,87	0,95	1,16	0,87
1622	Phosphoglycerate mutase	0,81	0,77	1,02	1,03
1007	Enolase (C-terminal domain)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0955	Pyruvate kinase	0,89	1,14	1,21	1,00

Aus Platzgründen ist lediglich die ERGO-Bezeichnung angegeben. Die NCBI-Nummer kann aus dem Anhang ersehen werden. Abkürzungen: Glc = Glucose; Man = Mannitol; Sor = Sorbitol; *ratio* = *ratio of medians*-Durchschnittswerte; n.d. = nicht auswertbar

Auch die Tabelle 29 zeigte weitgehend übereinstimmende Daten beim Vergleich der *ratios* von Glucose vs. Mannitol bzw. Glucose vs. Sorbitol der Chemostat-Kulturen untereinander, aber auch zu den Daten jener Experimente, für die die Zellen in Schüttelkulturen angezogen worden waren. Wie bereits für die Enzyme des Pentosephosphatweges in Tab. 28 dargelegt werden konnte, galt also auch für die Enzyme des KDPG-Weges, dass eine deutliche Transkriptionsänderung von mehr als dreifach unter einer der Bedingungen nicht zu beobachten war. Auch wenn der KDPG-Weg für *Gluconobacter oxydans* 621H bislang nicht als biochemisch parallel zum Pentosephosphatweg vorliegend beschrieben worden ist, so ist die Transkription der dafür notwendigen Gene doch ein Hinweis auf eine physiologische Funktion. Für den KDPG- wie auch für den Pentosephosphatweg konnte an dieser Stelle festgestellt werden, dass die für beide Stoffwechselwege benötigten Gene in sehr ähnlicher Weise transkribiert wurden, wobei der Faktor eines limitierten oder eines unlimitierten

Wachstums auf keiner der getesteten C-Quellen einen Einfluss gehabt hatte. Ob diese Aussage auch für die Regulation von Genen des Energiestoffwechsels bzw. der Kofaktor-Biosynthese galt, kann aus Tab. 30 ersehen werden.

Tab. 30: Vergleich der Transkriptionsregulation von Genen des Energiestoffwechsels und der Kofaktor-Biosynthese zwischen Chemostat- und Schüttelkulturen.

Die Daten beruhen jeweils auf den Experimenten Glucose vs. Mannitol und Glucose vs. Sorbitol. Ein *ratio of medians* > 1 wurde auf Glucose bezogen, *ratios* < 1 zeigten eine verstärkte Transkription auf Mannitol bzw. Sorbitol an.

ERGO	Annotation	<i>batch</i>	<i>batch</i>	Chem	Chem
		Glc/Man	Glc/Sor	Glc/Man	Glc/Sor
		<i>ratio</i>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>	<i>ratio</i>
0164	Cytochrome b561	1,85	1,67	0,58	1,78
1542	Putative cytochrome c-552	1,41	1,79	0,78	1,96
1913	Cytochrome c precursor	0,96	1,33	0,99	1,31
1563	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	0,94	0,36	0,84	1,35
1564	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,15	1,02	0,85	1,18
0554	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	1,58	0,99	0,78	1,47
0555	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	1,12	1,03	0,88	1,32
0557	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	1,19	1,15	0,82	1,31
0558	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	1,59	0,74	0,77	1,28
1914	Ubiquinol-cytochr. c reductase iron-sulfur subunit	0,96	1,35	1,15	1,03
1915	Ubiquinol-cytochr. c reductase cytochr. b subunit	1,22	2,17	1,10	1,49
1916	Ubiquinol-cytochr.-c reduct. cytochr. c1	0,96	1,18	0,94	1,00
2972	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	0,90	1,30	1,08	1,18
1600	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,69	1,26	1,69	1,60
1601	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,81	0,83	1,08	1,09
1602	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	0,57	0,71	1,27	1,33
2370	Coenzyme PQQ synthesis protein E	1,23	1,11	1,10	0,95
3312	Coenzyme PQQ synthesis protein D	n.d.	0,62	1,41	1,74
2372	Coenzyme PQQ synthesis protein C	0,93	1,53	1,0	1,14
2373	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,0	1,42	1,04	1,86
1306	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	1,29	1,18	0,98	1,17
2790	Methyltransf. inv. uq/menaquinone biosynth.	1,23	1,11	1,10	0,95
0623	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase	n.d.	0,62	1,41	1,74
1259	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	0,93	1,53	1,0	1,14

0245	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH	1,07	0,82	0,81	1,99
0247	Cyt. c-type biogenesis protein CycL precursor	1,12	0,86	0,87	1,51
0249	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	0,89	0,50	0,85	(3,55)
0250	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	1,87	1,07	0,79	2,08

Aus Platzgründen ist lediglich die ERGO-Bezeichnung angegeben. Die NCBI-Nummer kann aus dem Anhang ersehen werden. Abkürzungen: Glc = Glucose; Man = Mannitol; Sor = Sorbitol; *ratio* = *ratio of medians*-Durchschnittswerte; n.d. = nicht auswertbar

Mit einer einzigen Ausnahme, dem ORF 0249 eines Cytochrom c Biogenese-Proteins, auf dessen Einschränkung der Aussagekraft des *ratios* bereits in Kapitel 3.4.2.3. hingewiesen wurde, wurde keiner der angegebenen ORFs mehr als dreifach reguliert. Deshalb konnte an dieser Stelle eine Übereinstimmung der Aussage einer konstanten Transkription der beschriebenen Gene für den KDPG- und den Pentosephosphatweg, wie auch für die Gene des Energiestoffwechsels und für die Kofaktorbiosynthese unter den getesteten Bedingungen festgestellt werden.

Einen Einblick in die Transkriptionsregulation von prominenten Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen (vgl. Abb. 15) vermittelten die Daten der Tab. 31 (s.u.). Wie bei den vorangegangenen Tabellen, so sind auch in der Tab. 31 die Daten derart normiert, dass die Referenzbedingung ‚Glucose-Vollmedium‘ als rot-markiert dargestellt ist. Bei invers markierten Proben wurden daher bei der Auswertung die Kehrwerte der Messdaten berechnet. Für auf Glucose-Vollmedium stärker transkribierte ORFs sind die berechneten *ratios* also größer als 1,0.

Tab. 31: Vergleich der Transkriptionsregulation von Dehydrogenase-/Oxidoreduktase-Genen zwischen Chemostat- und Schüttelkulturen. Die Daten beruhen jeweils auf den Experimenten Glucose vs. Mannitol und Glucose vs. Sorbitol. Ein *ratio of medians* > 1 wurde auf Glucose bezogen, *ratios* < 1 zeigten eine verstärkte Transkription auf Mannitol bzw. Sorbitol an.

NR.	ERGO	Annotation	batch	batch	Chem	Chem
			Glc/	Glc/	Glc/	Glc/
			Man	Sor	Man	Sor
			ratio	ratio	ratio	ratio
1	0731	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	1,64	0,74	0,63	1,90
2	2454	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	2,29	1,99	0,94	1,41
	2455	ADH gr. Untereinh. (membrangeb. PQQ-abh.)	2,45	2,84	0,94	0,96
3	1934	Cyt. c Untereinheit d. Aldehyd-Dehydrogenase	0,89	1,04	1,03	1,39
	1935	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	0,86	0,95	1,27	1,32
	1936	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Untereinh.	1,60	1,03	0,80	0,99
4	1549	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	n.d.	0,73	n.d.	n.d.
5	2631	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	1,37	0,87	0,53	0,68
	2632	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	1,13	1,10	0,73	0,71
	2633	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	0,98	0,97	0,59	0,64
6	3621	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2231	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	1,24	1,59	0,65	1,17
7	0754	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	0,64	0,71	0,86	1,33
	0755	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	n.d.	0,57	0,99	1,20
	0757	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	1,15	1,37	1,01	1,34
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen		nicht gezeigt			
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen		nicht gezeigt			
10	3500	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0027	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	1,34	n.d.	0,92	1,04
	0494	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	0,14	0,14	0,18	0,31
	0618	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	0,45	0,6	1,22	1,31
11	0667	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	0,95	1,49	1,13	1,56
12	0864	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	n.d.	0,68	0,77	1,46
13	2001	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	1,19	1,59	0,96	1,02
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen		nicht gezeigt			
15	0010	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	1,20	1,6	0,86	1,98
16	2223	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	0,59	0,52	0,80	1,41
17	3517	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	0671	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	1,04	0,97	0,89	1,82
19	1603	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	0,40	1,10	0,97	1,41
20	2657	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	0,97	1,52	0,59	0,88

Ein Blick in die oben gezeigte Tabelle machte deutlich, dass auch die in der Literatur von PRUST *et al.* (2005) beschriebenen prominenten Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen fast ausnahmslos auf Glucose-, Mannitol- oder Sorbitol-Vollmedium konstitutiv exprimiert wurden, ungeachtet eines Wachstums in der Schüttelkultur oder im Chemostat. Wie bereits aus den Daten der Chemostat-Experimente (s. 3.4.1. und 3.4.2.) ersichtlich wurde, so war auch in der Schüttelkultur die uncharakterisierte, PQQ-haltige Dehydrogenase mit der ERGO-Bezeichnung 0494 auf Mannitol und Sorbitol im Vergleich zu Glucose stark angeschaltet. Keiner der anderen hier beschriebenen ORFs wies eine solche, mehr als dreifache und somit signifikante Regulation auf.

3.4.4. Vergleichende Transkriptionsanalyse nach Wachstum bei pH-Werten von 3,5 und 5,5

Nachdem in den vorhergehenden Kapiteln die Transkriptionsregulation von proteinkodierenden ORFs beim Wachstum auf den drei C-Quellen Glucose, Mannitol und Sorbitol verglichen worden ist, wurde mit den nun beschriebenen Experimenten ein anderer Ansatz gewählt. Zunächst wurden nicht verschiedene Substrate, sondern der Umsatz von Glucose als C-Quelle bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Im Jahre 1979 wurde ein Artikel von OLIJVE und KOK veröffentlicht, in dem der Einfluss verschiedener Parameter auf das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* 621H in Chemostat-Kulturen beschrieben worden ist (OLIJVE und KOK; 1979b). Zu eben diesen Parametern zählte der Einfluss des pH-Wertes, der von ihnen als Referenz-Bedingung auf 5,5 eingestellt wurde. Zuvor hatten sie bereits in einem Artikel berichtet, dass der Kohlenstoff-Fluss in Schüttelkulturen über den Pentosephosphat-Weg nicht nur vom pH-Wert, sondern auch von der Glucosekonzentration im Medium abhängig sei (OLIJVE und KOK, 1979a). Dabei stellten sie mit Hilfe von Titrations die Produktion von Säure beim Glucoseumsatz fest, bestimmten die Ketogluconatproduktion mit Hilfe von Papierchromatographie und ermittelten den molaren Wachstumsertrag mittels Trockengewichtsbestimmung. Sie kamen zu der Aussage, dass bei pH-Werten unter 3,5 – 4,0 die cytoplasmatische Glucose- und Gluconatoxidation völlig inhibiert wurde, was in einer vollständigen Gluconat-Ansammlung im Medium resultierte. Wegen der sich ständig verändernden Bedingungen in der Schüttelkultur wiederholten sie ihre Experimente im Chemostat. Eine Zellanzucht in einem chemisch definierten Medium

bei pH 2,5 gelang ihnen nicht, weshalb sie die Versuche in Vollmedium mit Glucose durchführten. Bei einem pH-Wert von 5,5 setzten sie 10,0 g Glucose pro Liter Medium ein, steigerten die Glucosekonzentration beim pH-Wert von 2,5 aber aufgrund eines geringeren Zellertrags auf 50,0 g/l. Sie schlussfolgerten aus einer vollständigen Ansammlung von Gluconat beim Umsatz der Glucose bei pH 2,5, dass unter dieser Bedingung Glucose lediglich als Energiequelle, nicht aber als Kohlenstoffquelle genutzt wurde, und demzufolge der Pentosephosphatweg abgeschaltet sein musste. Bei pH 5,5 wurde nach Ansicht von OLIJVE und KOK ein Teil der Glucose über den Pentosephosphatweg umgesetzt, was in einem gesteigerten Zellertrag pro Mol verbrauchter Glucose zum Ausdruck kam.

Diese von OLIJVE und KOK durchgeführten Experimente sollten nun in dieser Arbeit wiederholt werden, um die beobachteten Effekte auf der Ebene von Transkriptionsregulationen zu untersuchen. Zudem ließen OLIJVE und KOK den KDPG-Weg außer Acht. Bisherige in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Hybridisierungsexperimente deuteten auf eine konstitutive Transkription der Gene für die Enzyme beider Stoffwechselwege auf unterschiedlichen C-Quellen hin. Somit stellte sich die interessante Frage, wie diese Wege der Kohlenstoff-Assimilation bei unterschiedlichen pH-Werten reguliert sind. Die bisher in dieser Arbeit verwendeten Medien besaßen einen pH-Wert von 6,0. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den von OLIJVE und KOK (1979b) durchgeführten Experimenten wurde das Glucose-Vollmedium nun auf pH 5,5 für die Referenzbedingung eingestellt, während andere Parameter, wie die Temperatur von 30 °C oder ein 80 %iger pO_2 -Wert unverändert blieben. Als Testbedingung sollte ein Zellwachstum, wie in dem zuvor zitierten Experiment, bei pH 2,5 erfolgen. Zwar gelang diese Zellanzucht, nicht jedoch die weitere Probenaufarbeitung für die Transkriptionsanalyse. Der Grund hierfür konnte bislang nicht geklärt werden. Eine Adaptation des Transkriptionsanalyse-Protokolls in weiteren Experimenten könnte hier zum Erfolg führen. In ihren Artikeln (1979a und b) beschreiben OLIJVE und KOK eine Inhibierung des Pentosephosphatweges unterhalb eines pH-Wertes von 3,5 bis 4,0. Beim Wachstum von *G. oxydans* 621H auf Vollmedium mit 50 mM Glucose mit einer Durchflussrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ im Chemostat, stellte sich aufgrund der Ketosäure-Produktion nach Abschalten der automatischen pH-Regulation ein pH-Wert von etwa 3,4 – 3,5 ein. Im Gegensatz zu den bei pH 2,5 geernteten Zellen gelang nach der Ernte von bei pH 3,5 gewachsenen Zellen die weitere

Probenaufbereitung für Hybridisierungsexperimente. Somit konnten nun Transkriptionsanalysen zeigen, welchen Einfluss ein abgesenkter pH-Wert nicht nur auf die Transkription des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges, sondern auch auf die von Dehydrogenasen oder Atmungskettenkomponenten hatte. In der ersten Tabelle sollen jedoch zunächst die hier gefundenen Daten in Kontext zu dem von OLIJVE und KOK beschriebenen Effekt des pH-Wertes auf die Ausprägung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus gestellt werden.

Tab. 32: Daten zur Transkription von Genen des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges in Chemostat-gewachsenen Zellen bei pH 5,5 und 3,5.
Ein *ratio of medians* > 1 kennzeichnet eine stärkere Transkription bei pH 5,5, ein Wert < 1 eine stärkere Transkription bei pH 3,5.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
<u>Pentosephosphat-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,03
0321	GOX1709	Gluconokinase	0,51
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,63
0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase	0,69
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	0,41
0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase	0,73
2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,39
0314	GOX1703	Transketolase	0,43
0315	GOX1704	Transaldolase	0,74
<u>KDPG-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,03
0321	GOX1709	Gluconokinase	0,51
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,63
2775	GOX1375	Gluconolactonase	0,73
2781	GOX1381	Gluconolactonase	0,72
1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase	1,19
1756	GOX0430	KDPG aldolase	0,70
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,13
1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase	0,75
1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase	1,79
1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain)	n.d.
0955	GOX2249	Pyruvate kinase	0,51

Nach Betrachtung der in der Tabelle 32 aufgelisteten Werte für die Transkriptionsregulation der Gene von Enzymen des Pentosephosphat- bzw. KDPG-Wegs konnte kein Abschalten des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus bei einem auf 3,5 abgesenkten pH-Wert beobachtet werden. Dieser Befund stand nicht unmittelbar im Widerspruch zu dem von OLJVE und KOK beobachteten Phänomen des Abschaltens dieser Wege bei tiefen pH-Werten, da deren biochemische Messungen nach Wachstum bei einem pH-Wert von 2,5 erfolgten. Es kann mit der in dieser Arbeit angestellten Untersuchung nicht ausgeschlossen werden, dass ein solcher Effekt bei einem tieferen pH-Wert als 3,5 tatsächlich eingetreten wäre, doch war, wie bereits erwähnt, eine Probenaufbereitung für die Transkriptionsanalyse unter solch sauren Bedingungen mit dem für *G. oxydans* etablierten Protokoll bislang nicht gelungen. Zu diskutieren wäre, inwieweit ein völliges Abschalten des Zentralstoffwechsels unter sauren Bedingungen, unter Beibehaltung des Zellwachstums, für *Gluconobacter* überhaupt denkbar wäre. Ein regulatorischer Effekt, der unter den hier getesteten Bedingungen zwischen einer Transkription der für den Pentosephosphat- oder für den KDPG-Weg notwendigen Gene entscheidet, wurde ebenfalls nicht beobachtet. Auch hier muss also von einem konstitutiven Vorliegen beider Wege ausgegangen werden.

Ob beim Vergleich der Transkription der für den Energiestoffwechsel und die Kofaktor-Biosynthese benötigten Gene nach dem Wachstum bei pH 5,5 oder 3,5 ein regulatorischer Effekt sichtbar wurde, darüber geben die Werte in der Tabelle 33 Auskunft.

Tab. 33: Transkriptionsregulation einer Auswahl benötigter Gene für den Energiestoffwechsel und die Kofaktor-Biosynthese.

Ein *ratio of medians* > 1 kennzeichnet eine stärkere Transkription bei pH 5,5, ein Wert < 1 eine stärkere Transkription bei pH 3,5.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
0164	GOX1568	Cytochrome b561	0,78
1542	GOX0258	Putative cytochrome c-552	2,22
1913	GOX0564	Cytochrome c precursor	0,86
1563	GOX0278	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	0,55
1564	GOX0279	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	0,46
0554	GOX1911	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	0,80
0555	GOX1912	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	1,10

0557	GOX1913	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	0,81
0558	GOX1914	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	0,76
1914	GOX0565	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	1,05
1915	GOX0566	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit)	0,71
1916	GOX0567	Ubiquinol-cytochrome-c reduct. cytochrome c1	0,91
2972	GOX2658	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	0,89
1600	GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	1,34
1601	GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,79
1602	GOX0312	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	1,02
2370	GOX0983	Coenzyme PQQ synthesis protein E	1,03
3312	GOX0984	Coenzyme PQQ synthesis protein D	0,94
2372	GOX0985	Coenzyme PQQ synthesis protein C	1,04
2373	GOX0986	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,53
1306	GOX0038	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	0,83
2790	GOX1390	Methyltransferase inv. ubiquinone/menaquinone biosynthesis	1,40
0623	GOX1975	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase	1,68
1259	GOX2500	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	0,88
0245	GOX1647	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH (C-term. missing)	1,31
0247	GOX1648	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	1,35
0249	GOX1650	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	1,45
0250	GOX1651	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	1,31

inv = involved in; reduct. = reductase; term. = terminus

Erneut war erkennbar, dass keines der Gene mehr als dreifach reguliert wurde. Selbst das Herabsetzen der Signifikanzgrenze auf eine mindestens 2,5fache Regulation lässt keinen der ORFs herausstechen. Insofern bleibt hier die Aussage zu treffen, dass die in obiger Tabelle aufgeführten Komponenten des Energiestoffwechsels und der Kofaktor-Biosynthese von der in diesem Experiment eingestellten pH-Absenkung unbeeinflusst transkribiert wurden.

Wurde der Fokus auf die Oxidoreduktasen gerichtet, so waren auch hier kaum Ausnahmen von der bislang beobachteten konstitutiven Transkription einer Vielzahl dieser Enzyme festzustellen. Um diese Aussage mit Daten der Transkriptionsverhältnisse zu belegen, werden diese in den nachfolgenden Tabellen 34 (prominente Enzyme nach Abb. 15) und 35 (uncharakterisierte Enzyme) präsentiert. Im Anschluss an diese Tabellen werden dann die Ausnahmen zusammen mit sonstigen auffällig regulierten Proteinen gesondert erwähnt.

Tab. 34: Auswertung des Vergleichs der Transkriptionen nach Wachstum bei pH 5,5 oder 3,5 für die in Abb. 15 gezeigten prominenten Enzyme.
 Ein *ratio of medians* > 1 kennzeichnet eine stärkere Transkription bei pH 5,5, ein Wert < 1 eine stärkere Transkription bei pH 3,5.

Nr	ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1	0731	GOX2071	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	n.d.
2	2454	GOX1067	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	0,59
	2455	GOX1068	ADH gr. Unterein. (membrangeb. PQQ-abh.)	0,55
3	1934	GOX0585	Cyt. c Untereinheit d. Aldehyd-Dehydrogenase	0,99
	1935	GOX0586	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	0,79
	1936	GOX0587	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Unterein.	0,90
4	1549	RGOX0265	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	0,66
5	2631	GOX1230	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	0,80
	2632	GOX1231	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	0,71
	2633	GOX1232	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	0,81
6	3621	GOX0854	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.
	2231	GOX0855	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	0,97
7	0754	GOX2094	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	1,15
	0755	GOX2095	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	0,65
	0757	GOX2097	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	0,93
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen, s. Tab. 35			
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen, s. Tab. 35			
10	3500	GOX0516	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.
	0027	GOX1441	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	n.d.
	0494	GOX1857	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	11,25
	0618	GOX1969	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	3,28
11	0667	GOX2015	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	1,22
12	0864	GOX2187	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	1,20
13	2001	GOX0644	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	0,81
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen, s. Tab. 35			
15	0010	GOX1432	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	0,85
16	2223	GOX0849	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	0,92
17	3517	GOX1081	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.
18	0671	GOX2018	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	0,71
19	1603	GOX0313	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	1,04
20	2657	GOX1253	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	0,80

n.d. = nicht auswertbar

Tab. 35: Transkriptionsregulation uncharakterisierter Dehydrogenasen/Oxidoreduktasen beim Wachstum der Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten in Vollmedium mit Glucose als C-Quelle im Chemostat.
 Ein *ratio of medians* > 1 kennzeichnet eine stärkere Transkription bei pH 5,5, ein Wert < 1 eine stärkere Transkription bei pH 3,5.

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1485	GOX0201	NAD(P)H-flavin oxidoreduct., nitroreduct. family	1,37
1579	GOX0290	Putative oxidoreductase	0,57
1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreduct.	0,75
1784	GOX0454	Putative transmembrane oxidoreductase	1,92
1787	GOX0458	Putative oxidoreductase	0,68
1810	GOX0476	Putative oxidoreductase	0,42
1813	GOX0478	Putative oxidoreductase	0,75
1869	GOX0525	Putative oxidoreductase	1,20
1952	GOX0601	Putative oxidoreductase	0,99
1999	GOX0642	Putative oxidoreductase	1,08
2003	GOX0646	Putative oxidoreductase	1,32
2080	GOX0716	Putative oxidoreductase	0,82
2206	GOX0834	Putative oxidoreductase	0,90
2245	GOX0868	Electron transf. flavoprot.-uq oxidored./put. oxidored.	n.d.
3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	1,42
2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	1,06
2286	GOX0905	Putative oxidoreductase	0,67
2332	GOX0946	Putative oxidoreductase	0,81
2337	GOX0950	Putative oxidoreductase	1,71
2422	GOX1034	Putative oxidoreductase	0,86
2458	GOX1071	Putative oxidoreductase	0,95
2539	GOX1139	Putative oxidoreductase	0,66
2595	GOX1199	Putative oxidoreductase	0,65
2700	GOX1292	Putative oxidoreductase	0,80
2753	GOX1356	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,37
2800	GOX1400	Putative oxidoreductase	1,09
0044	GOX1452	Putative oxidoreductase	0,98
0058	GOX1458	Putative oxidoreductase	0,65
0065	GOX1462	Putative oxidoreductase	0,42
0091	GOX1495	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,78
0134	GOX1538	Putative oxidoreductase	0,75
0194	GOX1598	Putative oxidoreductase	1,13
0212	GOX1615	Putative oxidoreductase	0,87
0330	GOX1717	Putative oxidoreductase	1,21
0427	GOX1801	Putative oxidoreductase	0,53
0542	GOX1899	Putative oxidoreductase	0,97
0690	GOX2036	Putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	0,39
0771	GOX2107	NADPH-spec. quinone oxidoreduct. (drug modulator)	1,55
0828	GOX2159	Putative oxidoreductase	0,78
0959	GOX2253	Putative oxidoreductase (similar to HpnA)	0,76
3006	GOX2371	Putative oxidoreductase	0,79
1138	GOX2403	Putative oxidoreductase (NAD-binding motive)	2,05
1167	GOX2418	Putative oxidoreductase	1,04
3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	0,33

Nach den in den oben gezeigten Tabellen 34 und 35 aufgelisteten prominenten oder uncharakterisierten Enzymen, sollen auch jene Proteine, die beim Filtern der Daten in der Excel-Auswertung eine mindestens dreifache Transkriptionsänderung aufwiesen, erwähnt werden.

Beim pH-Wert von 5,5 wurde ein putatives DnaJ-ähnliches Protein mit der ERGO-Nummer 0014 (NCBI GOX1433) etwa dreimal stärker transkribiert als beim pH-Wert von 3,5. DnaJ gehört zu den Proteinen, die für die DNA-Replikation zwar essentiell, an deren Synthese jedoch nicht direkt beteiligt sind. Zudem wurde der ORF 0425 (NCBI GOX1799) einer Proteintranslokase-Untereinheit 4,4fach- und der ORF 0618 (NCBI GOX1969) einer uncharakterisierten PQQ-enhaltenden Dehydrogenase ebenfalls 4fach verstärkt transkribiert. Am auffälligsten war jedoch erneut die Transkription des ORFs 0494 (NCBI GOX1857) der uncharakterisierten PQQ-haltigen Dehydrogenase. Diese wurde beim pH-Wert von 5,5 etwa elfmal stärker transkribiert als beim pH-Wert von 3,5. Bei dem tieferen pH-Wert wurde hingegen eine verstärkte Transkription von vier hypothetischen Proteinen gefunden. Dies waren die ORFs 0230 (NCBI GOX1632) mit 5fach erhöhter, 0231 (NCBI GOX1633) mit 3fach erhöhter, 0262 (NCBI GOX1660) ebenfalls 3fach erhöhter und 2108 (NCBI GOX0741) mit einer 2,8fach erhöhten Transkription. Mit einer etwa 4fach erhöhten Transkription wurde ein dem RpfN ähnliches Porin (ERGO 2126, NCBI GOX0758) nachgewiesen, sowie ein putatives transmembran-Transportprotein (ERGO 1712, NCBI GOX0392) mit dreifach stärkerer Transkription. Ein eisenbindendes Bacterioferritin, kodiert vom ORF 0363 (NCBI GOX1748) wurde 4fach stärker transkribiert. Zwei hintereinander liegende Gene für eine Eisen-Schwefel-bindende Untereinheit einer Oxidoreduktase (ERGO 2753, NCBI GOX1356) und für ein putatives Elektronen-Transportprotein (2754, NCBI GOX1357) wurden 2,7fach- bzw. 3,3fach verstärkt beim Wachstum bei pH 3,5 abgelesen. Letztlich fiel auch der ORF 3589 (NCBI GOX2676) einer putativen Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenase mit einem *ratio* von 0,33, also einer 3fach stärkeren Transkription bei tieferem pH-Wert, auf.

Im Vergleich zu den Experimenten, die bei pH 6,0 mit unterschiedlichen C-Quellen durchgeführt wurden, blieben die Gene der für den Pentosephosphat- und KDPG-Weg benötigten Proteine bei pH 5,5 und 3,5 ebenfalls unverändert transkribiert. Gleiches wurde für die Gene von Atmungskettenkomponenten und Kofaktor-Biogenese-

Proteinen gezeigt. Auch die Mehrzahl der prominenten sowie der uncharakterisierten Dehydrogenasen unterschied sich nicht im Verhältnis ihrer Transkription bei den getesteten pH-Werten. Dennoch wurden einige Proteine, wie gezeigt, reguliert, wozu auch Eisen-Schwefel-haltige Proteine und ein am transmembranen Transport beteiligtes Enzym gehörten. Diese wurden unter sauren Bedingungen verstärkt abgelesen.

3.4.5. Transkriptionsanalyse nach Wachstum bei verschiedenen Wachstumsraten ($\mu = 0,26, 0,16, 0,05 \cdot \text{h}^{-1}$)

Aufbauend auf die bereits zitierte Veröffentlichung von OLIJVE und KOK (1979b) wurde neben dem Einfluss des pH-Wertes auch der Einfluss der Wachstumsrate μ auf das Wachstum von *G. oxydans* 621H in einem chemisch-definierten Medium im Chemostat untersucht. So fanden die Autoren heraus, dass eine ansteigende Wachstumsrate in Glucose-limitierten Kulturen bei einem konstanten pH-Wert von 5,5 zu einer Verschiebung des Glucoseumsatzes vom Pentosephosphat-Weg zur direkten Glucoseoxidation führte, wobei Gluconat als Reaktionsprodukt entstand. Diese Verschiebung machten sie an der aus Glucose produzierten CO_2 -Menge fest, die bei jeweils unterschiedlichen Wachstumsraten gemessen werden konnte. Während bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ 49,4 % des eingetragenen Kohlenstoffs zu CO_2 oxidiert wurden, waren es bei $\mu = 0,26 \cdot \text{h}^{-1}$ lediglich 1,3 %, was sich auch an den molaren Wachstumserträgen zeigte. Wie im Falle des von OLIJVE und KOK untersuchten Einflusses verschiedener pH-Werte auf die Oxidation von Glucose, wurden auch für die Untersuchung des Effektes verschiedener Wachstumsraten, wie gerade beschrieben, physiko-chemische Messungen (z.B. Bestimmungen des Gaswechsels, des Trockengewichts oder aber ein Produktnachweis mittels Papierchromatographie) durchgeführt. Eine Untersuchung der im Kontext der beobachteten Effekte stehenden Regulation der Transkription korrespondierender Gene erfolgte bislang nicht. In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass *G. oxydans* 621H auf dem basalen Salzmedium nach BELLY und CLAUS (1972), welches nach den Angaben von OLIJVE und KOK (1979a) mit Vitaminen und L-Glutamin versetzt wurde, nur unzureichende optische Dichten für Transkriptionsanalysen mit Chemostat-gewachsenen Kulturen erreichte. Im Verlaufe der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation konnte das Minimalmedium noch optimiert werden, was auch im Zuge der

in nachfolgenden Kapiteln beschriebenen *real-time* RT-PCR-Experimente Verwendung fand. Ein Einsatz dieses Mediums im Chemostat wurde noch nicht durchgeführt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss verschiedener Wachstumsraten auf die Transkription, insbesondere der Gene zentraler Stoffwechselwege, mit dem in Kapitel 2.3.2. beschriebenen Vollmedium untersucht. Mit Hilfe der Microarray-Experimente sollte nun ein Einblick in die auf genetischer Ebene erfolgende Regulation erhalten werden, die im Zusammenhang zu den von OLIVJE und KOK gefundenen Beobachtungen zum Einfluss verschiedener Wachstumsraten auf die Aktivität des Pentosephosphatweges steht.

In der nachfolgenden Tabelle werden die Daten zur Transkription der Gene der für den Pentosephosphatweg und den von OLIVJE und KOK nicht betrachteten KDPG-Weg notwendigen Proteine präsentiert. Als Referenzbedingung diente die Wachstumsrate von $0,26 \text{ * h}^{-1}$. Diese wurde ins Verhältnis zu den Wachstumsraten $0,05 \text{ * h}^{-1}$ bzw. $0,16 \text{ * h}^{-1}$ gesetzt. Die resultierenden Daten wurden in der Tabelle 36 direkt gegenübergestellt.

Tab. 36: Einfluss der Wachstumsrate auf die Transkription von Genen des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges nach Wachstum von *G. oxydans* 621H in Glucose-Vollmedium im Chemostat.

Die erste Datenspalte beschreibt das Verhältnis der Transkription von Genen im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ * h}^{-1}/0,05 \text{ * h}^{-1}$, die zweite Datenspalte beschreibt das Verhältnis der Transkription von Genen im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ * h}^{-1}/0,16 \text{ * h}^{-1}$. Ein *ratio* > 1 zeigt eine verstärkte Transkription bei $\mu = 0,26 \text{ * h}^{-1}$ an.

ERGO	NCBI	Annotation	<i>ratio</i> (0,26/0,05) * h^{-1}	<i>ratio</i> (0,26/0,16) * h^{-1}
<u>Pentosephosphat-Weg</u>				
1170	GOX2419	Glucokinase	1,58	0,93
0321	GOX1709	Gluconokinase	0,86	0,86
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,69	0,87
0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase	0,95	0,93
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	0,69	0,90
0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase	0,71	0,97
2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase	0,99	1,08
0314	GOX1703	Transketolase	0,69	0,84
0315	GOX1704	Transaldolase	0,67	0,80

<u>KDPG-Weg</u>			<i>ratio</i> (0,26/0,05) * h ⁻¹	<i>ratio</i> (0,26/0,16) * h ⁻¹
1170	GOX2419	Glucokinase	1,58	0,93
0321	GOX1709	Gluconokinase	0,86	0,86
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,69	0,87
2775	GOX1375	Gluconolactonase	0,89	0,85
2781	GOX1381	Gluconolactonase	1,15	0,98
1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase	1,01	0,78
1756	GOX0430	KDPG aldolase	0,76	0,88
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,28	1,02
1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase	1,24	1,08
1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase	0,60	1,07
1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain)	n.d.	n.d.
0955	GOX2249	Pyruvate kinase	0,86	0,82

n.d. = nicht auswertbar

Obwohl die in obenstehender Tabelle 36 gezeigten Daten aus voneinander unabhängigen Experimenten abgeleitet wurden, weisen sie doch eine sehr große Ähnlichkeit auf. Anhand dieser präsentierten Transkriptionsverhältnisse des Vergleichs der Wachstumsraten von $0,26 \text{ * h}^{-1}/0,05 \text{ * h}^{-1}$ und $0,26 \text{ * h}^{-1}/0,16 \text{ * h}^{-1}$ konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl die Gene des Pentosephosphatwegs, als auch die des KDPG-Wegs unter den hier untersuchten Bedingungen konstitutiv transkribiert vorlagen. Eine signifikant abweichende Regulation erfolgte für keinen dieser ORFs. Eine sukzessive Abnahme der Pentosephosphatweg-Aktivität in Abhängigkeit einer ansteigenden Wachstumsrate, wie von OLIJVE und KOK 1979 postuliert, konnte auf transkriptioneller Ebene nicht beobachtet werden. Einige nach dieser Erkenntnis denkbare Ursachen für die beobachteten physiologischen Phänomene sollen deshalb im Abschnitt der Diskussion der vorliegenden Arbeit erörtert werden.

Die hier durchgeführten Gesamtgenom-Microarray-Experimente boten die Gelegenheit, außer der Betrachtung der Transkriptionsregulation von korrespondierenden Genen des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus, auch einen Einblick in die möglicherweise wachstumsratenabhängige Regulation weiterer Proteine, wie z.B. von Dehydrogenasen oder Atmungskettenkomponenten zu erlangen. Diesbezügliche Daten sollen in den nun folgenden Tabellen präsentiert werden.

Tab. 37: Regulation der Transkription von Genen für Energiestoffwechsel und Kofaktor-Biosynthese bei verschiedenen Wachstumsraten.

Die erste Datenspalte beschreibt das Verhältnis der Transkription von Genen im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ * h}^{-1}/0,05 \text{ * h}^{-1}$, die zweite Datenspalte beschreibt das Verhältnis der Transkription von Genen im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ * h}^{-1}/0,16 \text{ * h}^{-1}$. Ein *ratio* > 1 zeigt eine verstärkte Transkription bei $\mu = 0,26 \text{ * h}^{-1}$ an.

ERGO	Annotation	<i>ratio</i> (0,26/0,05) * h ⁻¹	<i>ratio</i> (0,26/0,16) * h ⁻¹
0164	Cytochrome b561	0,82	1,36
1542	Putative cytochrome c-552	1,69	1,07
1913	Cytochrome c precursor	0,95	0,97
1563	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	0,27	1,04
1564	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	0,22	0,94
0554	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	1,54	1,00
0555	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	1,48	0,92
0557	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	1,58	0,82
0558	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	1,22	0,89
1914	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	0,78	0,83
1915	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit	1,05	0,89
1916	Ubiquinol-cytochrome-c reduct.; cytochrome c1	0,94	1,01
2972	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	0,96	1,03
1600	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,35	1,07
1601	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,84	1,04
1602	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	0,61	1,11
2370	Coenzyme PQQ synthesis protein E	1,89	1,13
3312	Coenzyme PQQ synthesis protein D	0,97	1,41
2372	Coenzyme PQQ synthesis protein C	2,00	1,14
2373	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,74	1,19
1306	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	1,05	0,96
2790	Methyltransferase inv. ubiquinone/menaquinone biosynth.	0,64	1,63
0623	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase	1,29	1,01
1259	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	0,84	1,12
0245	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH	2,59	1,14
0247	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	1,49	1,10
0249	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	2,97	1,03
0250	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	2,77	1,16

Im Gegensatz zu den bislang gezeigten Tabellen gab es im Falle von Genen für Atmungskettenkomponenten und Kofaktor-Biogenese-Proteinen offenbar eine Regulation. So wurde eine etwa 4fach stärkere Transkription der Cytochrom d Ubichinol-Oxidase Untereinheiten I und II (ERGO 1563 und 1564, resp. NCBI GOX0278 und GOX0279) bei der geringen Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ festgestellt (s. Tab. 37). Im Vergleich zur Wachstumsrate von $0,26 \cdot \text{h}^{-1}$ konnte diese Regulation bereits bei einer Wachstumsrate von $0,16 \cdot \text{h}^{-1}$ nicht mehr beobachtet werden. Ebenfalls bei $D = 0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ war eine etwa dreifach verstärkte Transkription einer NAD(P)-Transhydrogenase-alpha-Untereinheit (ERGO 1600, NCBI GOX0310) festzustellen. Drei von vier Cytochrom c-Typ Biogeneseproteinen (ORFs 0245, 0249 und 0250 resp. NCBI GOX1647, GOX1650 und GOX1651) wiesen hingegen eine leicht signifikant erhöhte Transkription zwischen etwa 2,5 bis 3fach bei einer Wachstumsrate von $0,26 \cdot \text{h}^{-1}$ auf. Die in dieser Arbeit mit Hilfe der Transkriptionsanalysen ermittelten Daten deuteten darauf hin, dass im Gegensatz zu der von OLIJVE und KOK 1979 geäußerten Vermutung einer Verdünnungs- bzw. Wachstumsraten-abhängigen Regulation des Pentosephosphatweges, eine Wachstumsraten-abhängige Regulation von Atmungskettenkomponenten vorliegt. Diese könnte möglicherweise mitentscheidend für die Kohlenstoff-Oxidation über den Pentosephosphatweg oder einer direkten Oxidation sein.

Ob auch eine Wachstumsraten-abhängige Regulation der Transkription von prominenten Dehydrogenasen stattfand, darüber soll die Tabelle 38 einen Überblick geben.

Tab. 38: Vergleich der Transkriptionsverhältnisse nach Wachstum bei verschiedenen Wachstumsraten für die in Abb. 15 aufgelisteten Enzyme.

Die erste Datenspalte beschreibt das Verhältnis der Transkription von Genen im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ h}^{-1}/0,05 \text{ h}^{-1}$, die zweite Datenspalte beschreibt das Verhältnis der Transkription von Genen im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ h}^{-1}/0,16 \text{ h}^{-1}$. Ein $ratio > 1$ zeigt eine verstärkte Transkription bei $\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$ an.

Nr	ERGO	Annotation	$ratio$ (0,26/0,05) h^{-1}	$ratio$ (0,26/0,16) h^{-1}
1	0731	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	n.d.	n.d.
2	2454	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	0,86	0,88
	2455	ADH gr. Untereininh. (membrangeb. PQQ-abh.)	0,84	1,03
3	1934	Cyt. c Untereinheit d. Aldehyd-Dehydrogenase	0,78	0,81
	1935	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	1,28	0,98
	1936	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Untereininh.	0,63	0,95
4	1549	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	n.d.	n.d.
5	2631	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	1,35	0,91
	2632	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	1,23	0,84
	2633	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	1,08	1,01
6	3621	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.	n.d.
	2231	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	1,17	0,84
7	0754	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	n.d.	0,93
	0755	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	n.d.	1,14
	0757	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	1,07	1,06
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen,		nicht gezeigt	
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen,		nicht gezeigt	
10	3500	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.	n.d.
	0027	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	n.d.	1,34
	0494	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	1,06	0,98
	0618	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	1,41	1,14
11	0667	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	0,98	1,26
12	0864	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	0,89	1,44
13	2001	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	0,63	1,03
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen,		nicht gezeigt	
15	0010	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	0,39	1,21
16	2223	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	0,83	1,19
17	3517	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.	n.d.
18	0671	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	0,81	0,88
19	1603	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	0,60	0,84
20	2657	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	0,44	0,62

n.d. = nicht auswertbar

Bei Betrachtung der auswertbaren Dehydrogenasen fiel auf, dass keines dieser Enzyme mehr als dreifach reguliert wurde, wenn man die Transkriptionsverhältnisse bei Wachstumsraten von $0,26 \text{ h}^{-1}$ / $0,05 \text{ h}^{-1}$ und $0,26 \text{ h}^{-1}$ / $0,16 \text{ h}^{-1}$ miteinander vergleicht. Lediglich der ORF 0010 (NCBI GOX1432) käme nach einem Herabsetzen der Signifikanzgrenze auf 2,5fach in den Bereich einer sehr gering verstärkten Transkription bei einer Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$. Wesentliche Unterschiede waren also auch hier nicht feststellbar.

In *E. coli* ist die Anzahl der Ribosomen abhängig von der Wachstumsrate. Zwar wird die Translation der ribosomalen Proteine reguliert, doch sollte auch auf der Stufe der Transkription eine Regulation zu erkennen sein. Ein Blick in die nachfolgende Tabelle 39 zeigt, dass die Regulation der Transkription auf Seiten der Wachstumsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ gegenüber $0,05 \text{ h}^{-1}$ leicht erhöht ist. So beträgt das arithmetische Mittel über die *ratios* der genannten Gene ribosomaler Proteine 2,0. Auch wenn diese Regulation nur relativ schwach ausgeprägt war, so bestätigte sie doch die o.g. Erwartung.

Tab. 39: Transkriptionsvergleich von Genen ribosomaler Proteine.

Angegeben ist das *ratio of medians* nach Wachstum der Zellen mit Wachstumsraten von $0,26 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,05 \text{ h}^{-1}$ auf Vollmedium mit Glucose im Chemostat. Ein *ratio* > 1 zeigt eine verstärkte Transkription bei $\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$ an.

ERGO	Annotation	ratio
1348	SSU ribosomal protein S2P	2,83
1382	LSU ribosomal protein L28P	2,18
1392	LSU ribosomal protein L32P	n.d.
1401	SSU ribosomal protein S21P	1,10
1417	LSU ribosomal protein L21P	1,48
1418	LSU ribosomal protein L27P	1,81
1478	LSU ribosomal protein L19P	1,73
1481	SSU ribosomal protein S16P	1,58
1547	LSU ribosomal protein L20P	1,48
1548	LSU ribosomal protein L35P	1,11
1593	LSU ribosomal protein L9P	n.d.
1594	SSU ribosomal protein S18P	2,37
1595	SSU ribosomal protein S6P	2,00
1656	LSU ribosomal protein L17P	1,72
1659	SSU ribosomal protein S11P	1,83
1660	SSU ribosomal protein S13P	1,88
1664	LSU ribosomal protein L15P	2,61
1665	LSU ribosomal protein L30P	n.d.
1667	SSU ribosomal protein S5P	2,45
1669	LSU ribosomal protein L18P	1,34
1670	LSU ribosomal protein L6P	2,81
1671	SSU ribosomal protein S8P	1,89

1673	SSU ribosomal protein S14P	1,45
3496	LSU ribosomal protein L5P	n.d.
1678	LSU ribosomal protein L24P	1,76
1679	LSU ribosomal protein L14P	2,55
1680	SSU ribosomal protein S17P	2,45
1681	LSU ribosomal protein L29P	2,61
1683	LSU ribosomal protein L16P	2,56
1684	SSU ribosomal protein S3P	2,60
1685	LSU ribosomal protein L22P	1,55
1686	SSU ribosomal protein S19P	1,84
1688	LSU ribosomal protein L2P	2,28
1689	LSU ribosomal protein L23P	2,27
1690	LSU ribosomal protein L4P	2,37
1691	LSU ribosomal protein L3P	2,00
1693	SSU ribosomal protein S10P	1,85
1696	SSU ribosomal protein S7P	2,32
1697	SSU ribosomal protein S12P	2,53
1704	LSU ribosomal protein L12P (L7/L12)	3,24
1706	LSU ribosomal protein L10P	2,37
1707	LSU ribosomal protein L1P	1,42
1708	LSU ribosomal protein L11P	1,47
1779	SSU ribosomal protein S9P	2,98
1780	LSU ribosomal protein L13P	4,15
1844	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	n.d.
3504	SSU ribosomal protein S1P	n.d.
2099	LSU ribosomal protein L36P	1,64
2141	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	0,77
2172	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase A	n.d.
2542	LSU ribosomal protein L25P	2,58
0180	Ribosome-binding factor A	1,24
3149	SSU ribosomal protein S15P	n.d.
0268	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase C	1,26
0402	SSU ribosomal protein S4P	2,93
0443	Ribosome Recycling Factor (RRF)	1,34
0457	LSU ribosomal protein L34P	n.d.
0622	Ribosomal protein L11 methyltransferase	n.d.
0983	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J	1,42
1005	LSU ribosomal protein L33P	n.d.
1123	Ribosomal protein L11 methyltransferase	n.d.
3227	LSU ribosomal protein L31P	0,96
1261	SSU ribosomal protein S20P	1,18

Nachdem gezielt nach ORFs gesucht wurde, die bei einer Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ mindestens dreifach verstärkt transkribiert wurden, fielen neun Gene auf. Dazu zählte ein zwei-Komponenten-*response*-Regulator mit der ERGO-Bezeichnung 0594 (NCBI GOX1946) (3fach stärker transkribiert), ein hungerinduzierbares DNA-Bindeprotein (ERGO 2070, NCBI GOX0707) (6fach), eine putative Protease (ERGO 2107, NCBI GOX0740) (5fach), ein putatives Efflux-Protein (ERGO 2303, NCBI GOX0919) (4fach), ein putativer RNA-Polymerase Sigma-E Faktor (Sigma-24-Protein; ERGO 1143, NCBI GOX2406), eine D-Aminoacylase E.C. 3.5.1.81 (ERGO 2573, NCBI

GOX1177) (5fach), das permease-Protein (ERGO 3185, NCBI GOX2184) eines wahrscheinlichen Mannitol/Sorbitol ABC-Transporters sowie dessen ATP-bindendes Protein (ERGO 3184, NCBI GOX2183) jeweils etwa 5fach, wobei die Datengrundlage für die ATP-bindende Untereinheit nur 50 % betrug, und letztlich ein kleines Hitzeschock-Protein (ERGO 3112, NCBI GOX1329) mit einer um den Faktor neun deutlich erhöhten Transkription. Eine entsprechende Suche beim Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \text{ h}^{-1}$ und $0,16 \text{ h}^{-1}$ erbrachte hingegen keine Hinweise auf signifikant abweichend regulierte Gene.

3.4.6. Dokumentation einer veränderten Zellmorphologie bei einer Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$

Obwohl aus den Transkriptionsanalyse-Daten nicht unmittelbar darauf geschlossen werden konnte, so fand dennoch beim Wachstum im Chemostat bei einer Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ eine Veränderung der Zellmorphologie statt, die an dieser Stelle dokumentiert werden soll. Nach der Beschreibung von DE LEY *et al.* (1984) ist *Gluconobacter oxydans* ellipsoidal bis stäbchenförmig und weist eine Größe von etwa $0,5 - 0,8 \times 0,9 - 4,2 \text{ }\mu\text{m}$ auf. Typischerweise liegen Einzelzellen oder Zellpaare vor, seltener auch Ketten. Es ist aber auch ein Vorkommen von irregulären Zellformen beschrieben worden, wozu aufgetriebene Filamente, große sackförmige Zellen oder andere abweichende Zellformen gehören. BATZING *et al.* (1973) beschrieben eine cytologische Differenzierung zwischen *Acetobacter suboxydans* Zellen in der exponentiellen oder in der frühen stationären Wachstumsphase. Dabei wurde für letztere lichtmikroskopisch eine Zunahme der Dichte an den Zellpolen, und elektronenmikroskopisch eine Ansammlung intracytoplasmatischer Membranen in diesen Regionen beschrieben. CLAUS *et al.* (1975) schrieben über die Bildung intracytoplasmatischer Membranen, sie seien vermutlich zurückzuführen auf eine fortgesetzte Plasmamembranbildung am Ende der aktiven Zellteilung. In der vorliegenden Arbeit konnte nun bei der o.g. geringen Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ bei einigen Zellen eine Veränderung in der Zellmorphologie beobachtet werden. Neben den von DE LEY *et al.* (1984) beschriebenen Zell-Ketten kamen hier auch langgestreckte Einzelzellen vor. Aliquots dieser Kultur wurden für die Elektronenmikroskopie aufbereitet (vgl. 2.15.). Die Abbildung 19 zeigt eine solche langgestreckte Zelle.

Abb. 19: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *G. oxydans* 621H nach Wachstum in Vollmedium mit Glucose als C-Quelle bei einer Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$. Neben Zellen mit ellipsoider Morphologie (A) ist eine langgestreckte Zellform im Längsschnitt gezeigt (B).

Neben der langgestreckten Zellmorphologie ist hier auch eine polare Verdichtung zu erkennen. CLAUS *et al.* (1975) beschrieben solche Verdichtungen als Ansammlung von Ribosomen und zusammengelagertem Membranmaterial. Helle Strukturen im Bereich des Cytoplasmas beruhen auf kondensierter DNA. Ein Hinweis auf intracytoplasmatische Membranen lässt sich den folgenden zwei Abbildungen entnehmen.

Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zell-Querschnittes. (A) vermutlich intracytoplasmatische Membran; (B) Zellwandmaterial; (C) an die Cytoplasmamembran angelagerte intracytoplasmatische Membranen.

CLAUS *et al.* (1975) beschrieben in ihrer Veröffentlichung, dass auch Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase manchmal zusätzliche Membrananteile zeigen, wenn auch in viel geringerem Maße als Zellen der stationären Phase. Dies scheint bei Betrachtung der in Abb. 20 dargestellten Zelle der Fall zu sein, die wie die in Abb. 19 dargestellten Zellen bei einer Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ im Chemostat auf Vollmedium mit 50 mM Glucose als C-Quelle, bei einem pH-Wert von 5,5 und einem pO_2 von 80 % wuchsen.

Abb. 21: Detailvergrößerung eines Zell-Querschnittes.
(A) Zellwand; (B) Periplasma; (C) Cytoplasmamembran;
(D) intracytoplasmatisches Membranmaterial.

In der Detailvergrößerung wurde die Struktur noch einmal deutlicher. Neben der Zellwand und dem periplasmatischen Raum ist in der Abb. 21 die Cytoplasmamembran erkennbar, ebenso wie ein Membranmaterial, dass als intracytoplasmatische Membran bezeichnet werden konnte. Mit diesen Aufnahmen wurden also die von BATZING *et al.* (1973) und CLAUS *et al.*, (1975) im wesentlichen an Zellen der stationären Phase beobachtete Bildung intracytoplasmatischer Membranen auch für im Chemostat wachsende Zellen (Wachstumsrate $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$) gezeigt.

3.4.7. Vergleichende Transkriptionsanalyse nach Wachstum bei zwei verschiedenen pO_2 -Werten

In den zuvor beschriebenen Kapiteln wurden Untersuchungen zur Transkriptionsregulation beim Vergleich verschiedener C-Quellen, verschiedener pH-Werte und beim Vergleich unterschiedlicher Wachstumsraten beschrieben. Dieses Kapitel gibt nun die Ergebnisse einer vierten Versuchsreihe, der Analyse des Transkriptionsverhältnisses beim Wachstum in Glucose-Vollmedium mit unterschiedlichen pO_2 -Werten wieder. Die dabei eingestellte Wachstumsrate betrug $0,26 \cdot h^{-1}$, die Temperatur lag bei $30^\circ C$ und der pH-Wert wurde automatisch mit 1 N NaOH bei 5,5 gehalten. Als Referenz diente ein auf 80 % des Luftsauerstoff-Volumenanteils eingestellter Partialdruck, wie er auch in den vorhergehend beschriebenen Experimenten der vorliegenden Arbeit üblich war. Für die Testbedingung wurden hingegen lediglich 2 % Sauerstoffanteil einreguliert. Die nachfolgenden Tabellen beschreiben nun die Ergebnisse des genomweiten Transkriptionsvergleichs.

Tab. 40: Auswertung der Hybridisierungsexperimente nach Zellwachstum bei 80 % und 2 % des Luftsauerstoff-Volumenanteils. Verzeichnet sind die in Abb. 15 angegebenen Enzyme.

Ein *ratio* > 1 zeigt eine erhöhte Transkription bei 80 % O_2 , ein *ratio* < 1 eine erhöhte Transkription bei 2 % O_2

Nr	ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1	0731	GOX2071	D-Lactat-Dehydrogenase (Cyt. c-abh.)	0,86
2	2454	GOX1067	Alkohol-DH Cyt. c Untereinheit Vorläufer	0,86
	2455	GOX1068	ADH gr. Untereinheit. (membrangeb. PQQ-abh.)	1,18
3	1934	GOX0585	Cyt. c Untereinheit der Aldehyd-Dehydrogenase	1,27
	1935	GOX0586	Membrangeb. Aldehyd-Dh, kl. Untereinheit	0,88
	1936	GOX0587	Membrangeb. Aldehyd-Dh, gr. Untereinheit.	1,28
4	1549	GOX0265	Membrangeb. Glucose-Dehydrogenase	n.d.
5	2631	GOX1230	Gluconat 2-Dehydrogenase, Cyt. c Untereinheit	0,95
	2632	GOX1231	Gluconat 2-Dehydrogenase alpha Kette	0,86
	2633	GOX1232	Gluconat 2-Dehydrogenase gamma Kette	0,94
6	3621	GOX0854	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldA	n.d.
	2231	GOX0855	D-Sorbitol-Dehydrogenase Untereinheit SldB	0,94
7	0754	GOX2094	Sorbitol-Dehydrogenase Cyt. c Untereinheit	0,84
	0755	GOX2095	Sorbitol-Dehydrogenase große Untereinheit	0,95
	0757	GOX2097	Sorbitol-Dehydrogenase kleine Untereinheit	0,89
8	Uncharakterisierte membrangebundene Dehydrogenasen, s. Tab. 41			
9	Uncharakterisierte Flavin-haltige Dehydrogenasen, s. Tab. 41			

10	3500	GOX0516	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 4	n.d.
	0027	GOX1441	Uncharakt. PQQ-abh. Dehydrogenase 3	n.d.
	0494	GOX1857	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 1	1,60
	0618	GOX1969	Uncharakt. PQQ-haltige Dehydrogenase 2	1,05
11	0667	GOX2015	NAD(P)-abhängige Glucose 1-Dehydrogenase	1,01
12	0864	GOX2187	Gluconat 5-Dehydrogenase (NADP)	1,59
13	2001	GOX0644	Putative 2,5-diketo-D-Gluconat-Reduktase	1,00
14	Uncharakterisierte cytoplasmatische Oxidoreduktasen, s. Tab. 41			
15	0010	GOX1432	NADP-D-Sorbitol-Dehydrogenase	1,21
16	2223	GOX0849	NADPH-abhängige L-Sorbose-Reduktase	1,25
17	3517	GOX1081	Pyruvat-Decarboxylase	n.d.
18	0671	GOX2018	lösliche Acetaldehyd-Dehydrogenase	0,95
19	1603	GOX0313	lösliche Alkohol-Dehydrogenase	0,26
20	2657	GOX1253	D-Lactat-Dehydrogenase (NAD abh.)	1,33

Die in Tabelle 40 genannten Daten deuteten darauf hin, dass die angegebenen prominenten Enzyme fast alle ungeachtet der im Chemostat eingestellten Sauerstoffbedingungen konstitutiv transkribiert wurden. Lediglich der ERGO-ORF 1603 (NCBI GOX0313) einer löslichen Alkohol-Dehydrogenase wurde bei 2 % Sauerstoff etwa 4fach stärker transkribiert als bei 80 % Sauerstoffanteil. Insofern war dieses Ergebnis einer fehlenden oder nur gering ausgeprägten Regulation der Transkription einer Vielzahl der Dehydrogenasen konform zu den bislang in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen.

Die nächste Tabelle soll einen Überblick über die Regulation von uncharakterisierten Enzymen bieten.

Tab. 41: ORF-Bezeichnungen nach ERGO und NCBI sowie Annotation von uncharakterisierten Oxidoreduktasen.

Ein *ratio* > 1 zeigt eine erhöhte Transkription bei 80 % O₂, ein *ratio* < 1 eine erhöhte Transkription bei 2 % O₂

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
1485	GOX0201	NAD(P)H-flavin oxidoreduct., nitroreduct. family	1,24
1579	GOX0290	Putative oxidoreductase	0,88
1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreduct.	0,56
1784	GOX0454	Putative transmembrane oxidoreductase	n.d.
1787	GOX0458	Putative oxidoreductase	0,70
1810	GOX0476	Putative oxidoreductase	0,78
1813	GOX0478	Putative oxidoreductase	0,98

1869	GOX0525	Putative oxidoreductase	0,87
1952	GOX0601	Putative oxidoreductase	0,94
1999	GOX0642	Putative oxidoreductase	1,10
2003	GOX0646	Putative oxidoreductase	0,69
2080	GOX0716	Putative oxidoreductase	0,88
2206	GOX0834	Putative oxidoreductase	1,14
2245	GOX0868	Electron transf. flavoprot.-uq oxidored./put. oxidored.	0,93
3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	0,43
2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	0,93
2286	GOX0905	Putative oxidoreductase	1,00
2332	GOX0946	Putative oxidoreductase	0,92
2337	GOX0950	Putative oxidoreductase	n.d.
2422	GOX1034	Putative oxidoreductase	1,28
2458	GOX1071	Putative oxidoreductase	1,26
2539	GOX1139	Putative oxidoreductase	0,46
2595	GOX1199	Putative oxidoreductase	0,93
2700	GOX1292	Putative oxidoreductase	1,13
2753	GOX1356	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,93
2800	GOX1400	Putative oxidoreductase	1,07
0044	GOX1452	Putative oxidoreductase	0,94
0058	GOX1458	Putative oxidoreductase	1,31
0065	GOX1462	Putative oxidoreductase	1,04
0091	GOX1495	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	0,97
0134	GOX1538	Putative oxidoreductase	1,00
0194	GOX1598	Putative oxidoreductase	1,27
0212	GOX1615	Putative oxidoreductase	0,96
0228	GOX1630	Putative oxidoreductase	n.d.
0330	GOX1717	Putative oxidoreductase	0,78
0427	GOX1801	Putative oxidoreductase	0,83
0542	GOX1899	Putative oxidoreductase	0,97
0690	GOX2036	Putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	1,22
0771	GOX2107	NADPH-spec. quinone oxidoreduct. (drug modulator)	0,97
0828	GOX2159	Putative oxidoreductase	1,03
0959	GOX2253	Putative oxidoreductase (similar to HpnA)	1,05
3006	GOX2371	Putative oxidoreductase	1,05
1138	GOX2403	Putative oxidoreductase (NAD-binding motive)	1,30
1167	GOX2418	Putative oxidoreductase	0,79
2907	GOX2594	Putative oxidoreductase transmembrane protein	1,27
3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	1,88

n.d. = nicht auswertbar

Erneut wiesen die Transkriptionsregulationsverhältnisse Werte auf, die nicht auf eine signifikante Veränderung unter einer der beiden eingestellten Sauerstoff-Bedingungen schließen ließen. Diese Aussage deckte sich mit der zuvor getroffenen, dass die hier getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Transkription der prominenten Enzyme hatten. Ein Blick auf die Tabelle 42, die die berechneten *ratios* für den Pentosephosphat- und KDPG-Weg enthält, sollte zeigen, inwieweit sich verschiedene Sauerstoffpartialdrücke auf die Transkription dieser Stoffwechselwege auswirkten.

Tab. 42: Daten zur Transkription von Genen des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges nach Wachstum im Chemostat bei 80 % bzw. 2 % Sauerstoff.

Ein *ratio* > 1 zeigt eine erhöhte Transkription bei 80 % O₂, ein *ratio* < 1 eine erhöhte Transkription bei 2 % O₂

ERGO	NCBI	Annotation	<i>ratio</i>
<u>Pentosephosphat-Weg</u>			
1170	GOX2419	Glucokinase	1,04
0321	GOX1709	Gluconokinase	1,21
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,14
0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase	1,11
0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase	1,00
0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase	1,08
2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,07
0314	GOX1703	Transketolase	1,01
0315	GOX1704	Transaldolase	1,11
<u>KDPG-Weg</u>			
1170	GOX24197	Glucokinase	1,04
0321	GOX1709	Gluconokinase	1,21
1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,14
2775	GOX1375	Gluconolactonase	1,00
2781	GOX1381	Gluconolactonase	1,00
1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase	0,92
1756	GOX0430	KDPG aldolase	1,11
1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,99
1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase	1,08
1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase	0,92
1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain)	n.d.
0955	GOX2249	Pyruvate kinase	1,01

Es war offensichtlich, dass beide Wege, sowohl bei 80 % als auch bei 2 % Sauerstoff im Medium, konstitutiv transkribiert wurden, was aus den in o.g. Tabelle anhand der sehr ähnlichen und um einen Wert von 1,0 liegenden Werte deutlich wurde.

Erstaunlicherweise galt das auch für die in der nachfolgenden Tabelle 43 gezeigten Daten der am Energiestoffwechsel und der Kofaktor-Biosynthese beteiligten Gene. Hier hätte durchaus eine Regulation der Atmungskettenkomponenten, beispielsweise der terminalen Oxidasen, erwartet werden können.

Tab. 43: Auswahl von benötigten Genen für den Energiestoffwechsel und die Kofaktor-Biosynthese.

Ein *ratio* > 1 zeigt eine erhöhte Transkription bei 80 % O₂, ein *ratio* < 1 eine erhöhte Transkription bei 2 % O₂

ERGO	NCBI	Annotation	ratio
0164	GOX1568	Cytochrome b561	1,06
1542	GOX0258	Putative cytochrome c-552	0,99
1913	GOX0564	Cytochrome c precursor	0,95
1563	GOX0278	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	1,40
1564	GOX0279	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1,62
0554	GOX1911	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	0,79
0555	GOX1912	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	0,76
0557	GOX1913	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	0,67
0558	GOX1914	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	0,68
1914	GOX0565	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	1,08
1915	GOX0566	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit)	1,02
1916	GOX0567	Ubiquinol-cytochrome-c reduct. cytochrome c1	0,90
2972	GOX2658	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	0,91
1600	GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,44
1601	GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	0,60
1602	GOX0312	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	0,35
2370	GOX0983	Coenzyme PQQ synthesis protein E	1,16
3312	GOX0984	Coenzyme PQQ synthesis protein D	0,87
2372	GOX0985	Coenzyme PQQ synthesis protein C	0,94
2373	GOX0986	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,15
1306	GOX0038	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	0,98
2790	GOX1390	Methyltransferase inv. ubiquinone/menaquinone biosynthesis	0,73
0623	GOX1975	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase	0,87
1259	GOX2500	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	1,05
0245	GOX1647	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH (C-term. missing)	0,93
0247	GOX1648	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	0,91
0249	GOX1650	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	1,01
0250	GOX1651	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	0,90

inv = involved in; reduct. = reductase; term. = terminus

De facto wies aber lediglich der ORF 1602 (NCBI 0312) einer NAD(P)-Transhydrogenase-Untereinheit bei 80 % Sauerstoff eine 2,9fach höhere Expression im Vergleich zu 2 % Sauerstoff auf.

Im experimentellen Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke von 80 % zu 2 % des Sauerstoff-Volumenanteils der Luft (etwa 20 – 21 %) fielen nach einem Filtern der Transkriptionsanalyse-Daten auf Werte kleiner oder gleich 0,3, also einer signifikanten Veränderung der Transkription bei 2 % Sauerstoff von mehr als 3fach, vor allem Flagellen-assoziierte- und mit der Chemotaxis in Verbindung stehende Gene auf. Eine Auswahl dieser auffällig regulierten ORFs ist in Tabelle 44 zusammengestellt.

Tab. 44: Auswahl von Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen, die beim Zellwachstum mit 2 % des Luftsauerstoff-Volumenanteils im Chemostat verstärkt transkribiert wurden.

Ein *ratio* > 1 zeigt eine erhöhte Transkription bei 80 % O₂, ein *ratio* < 1 eine erhöhte Transkription bei 2 % O₂

ERGO	NCBI	Annotation	<i>ratio</i>
0121	1525	Flagellar biosynthetic protein FliQ	0,20
0122	1526	Flagellar hook-basal body protein FleE	0,17
0123	1527	Flagellar basal-body rod protein FlgC	0,07
0124	1528	Flagellar basal-body rod protein FlgB	0,18
0145	1549	Methyl-accepting chemotaxis protein	0,20
0148	1552	Chemotaxis protein CheA	0,15
1404	0127	Chemotaxis MotB-Protein	0,09
1977	0621	Flagellar P-ring protein precursor	0,20
2155	0788	Flagellin assembly protein	0,14
2413	1025	Flagellar hook-associated protein 3 FlgL	0,13
2414	1026	Flagellar hook-associated protein 1 FlgK	0,13
2415	1027	Flagellar hook protein FlgE	0,06
2699	1291	Flagellar L-ring protein flgH	0,20

Die Daten der Transkriptionsanalyse korrelierten in diesem Fall gut mit der lichtmikroskopisch gemachten Beobachtung, dass ein großer Anteil der *Gluconobacter*-Zellen nach Belüftung mit nur 2 % Sauerstoff im Chemostat beweglich wurde.

Neben den Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen fiel außerdem der ORF 0303 (NCBI GOX1693) eines Zellzyklus-Transkriptionsregulators (CtrA) auf, der mit einem *ratio* von 0,08, also etwa 12,5fach, bei nur 2 % Sauerstoff transkribiert wurde.

3.4.8. Untersuchung von Fructose-Bisphosphat-Aldolase-Isoenzymen

Sowohl der Tricarbonsäurezyklus als auch die Glykolyse liegen in *Gluconobacter* nicht vollständig vor. Das wurde auf enzymatischer Ebene bereits vor längerer Zeit untersucht (HAUGE *et al.*, 1955; KITOS *et al.*, 1958; STOUTHAMER, 1959; WILLIAMS und RAINBOW, 1964; GREENFIELD und CLAUS, 1972) und auf genetischer Ebene durch die Genomsequenzierung von PRUST (2004) bestätigt. Deshalb galt der Pentosephosphatweg lange Zeit als der Hauptweg des Substratabbaus zu CO₂ in *Gluconobacter*. Doch auch die Enzyme des KDPG-Wegs wurden nachgewiesen (KOVACHEVICH und WOOD, 1955; LEISINGER, 1965). Trotz der Einschränkung des Stoffwechsels durch Abwesenheit der Glykolyse, der das Schlüsselenzym 6-Phosphofructokinase fehlt, konnte anhand der Genomsequenz ein Vorliegen von Fructose-Bisphosphat-Aldolase-Isoenzymen erkannt werden. Fructose-1-6-bisphosphat-Aldolasen (EC 4.1.2.13) stehen am Kreuzungspunkt des Hexose- und Triose-Zweigs der Glykolyse (DAX *et al.*, 2005). Wie der Abbildung 22 zu entnehmen ist, katalysieren sie eine reversible Spaltung von Fructose-1-6-bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Es werden zwei Klassen von Aldolasen unterschieden. Klasse I Aldolasen wurden zunächst Tieren und höheren Pflanzen zugeordnet und spalten Fructose-1-6-bisphosphat über die Bildung einer Schiff'schen Base. Klasse II Aldolasen stellen hingegen Metalloenzyme dar, die überwiegend in Bakterien, Hefen und Pilzen vorkommen und durch direkte Metallionen-Bindung an den Carbonyl-Sauerstoff das Substrat spalten (LEWIS und LOWE, 1977). Klasse I Aldolasen konnten aber auch in Bakterien gefunden werden, wo sie als alleiniges Enzym, oder, wie z.B. in *E. coli*, zusammen mit dem Klasse II-Enzym vorkommen (BALDWIN und PERHAM, 1978). Dieser letztere Fall schien auch in *Gluconobacter* vorzuliegen, was sich anhand eines Abgleiches der Aminosäuresequenz mit öffentlichen Datenbanken zeigte. Jedoch war nicht bekannt, ob die im Genom vorhandenen Gene der ORFs ERGO 0136 (NCBI GOX1540) und 2146 (NCBI GOX0780) tatsächlich transkribiert werden.

Abb. 22: Übersicht über die in *Gluconobacter* vorhandenen Enzyme der Glykolyse (nach PRUST 2004, mod.).

Abkürzungen: Glc-6-P: Glucose-6-Phosphat, Glycerin-3P-DH: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, GAP-DH: Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase, PGA: Phosphoglycerat.

In Tabelle 45 wurden deshalb die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptionsanalysen mittels Microarray aufgeführt. Diese Daten indizierten, dass beide Enzyme konstitutiv unter allen getesteten Bedingungen transkribiert wurden, dass aber der ORF 0136 bei pH 3,5 oder bei der geringen Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ etwa 2,5 bis 3fach stärker abgelesen wurde.

Tab. 45: *Ratio of medians*-Mittelwerte für die Fructose-Bisphosphat-Aldolase-ORFs 0136 und 2146 unter den in der vorliegenden Arbeit getesteten Bedingungen.

In der Tabelle stehen die Referenzbedingungen, die durch ein ratio > 1 gekennzeichnet sind, in erster Position.

Testbedingung	Fructose-Bisphosphat-Aldolase	
	ERGO 0136	ERGO 2146
Glucose/Mannitol Chemostat	1,61	1,06
Glucose/Sorbitol Chemostat	0,42	1,11
Glucose/Mannitol <i>batch</i>	1,44	1,09
Glucose/Sorbitol <i>batch</i>	2,01	1,66
pH 5,5 / 3,5	0,39	1
Wachstumsrate 0,26 / 0,16	0,91	1,04
Wachstumsrate 0,26 / 0,05	0,33	0,81
pO ₂ 80 % / 2 %	1,1	0,96

Diese Transkriptionsdaten wurden auch durch die Messung der Aldolase-Aktivität untersucht. Dazu wurde zunächst die Zellmembran- und Cytoplasmafraktion von *Gluconobacter* separiert und letztere dem in 2.14.2. beschriebenen Aldolase-Assay unterzogen. Einen Überblick über den Ablauf der gekoppelten Enzymreaktionen dieses Tests, bei dem die Oxidation von NADH gemessen wurde, bietet die Abbildung 23.

Abb. 23: Schema der gekoppelten enzymatischen Reaktionen des Aldolase-Tests.

Der Substratumsatz wurde anhand der NADH-Oxidation photometrisch bestimmt. Gemessen wurde über einen Zeitraum von mind. 10 min. Zur Kontrolle wurde zuvor für jeden Ansatz eine stabile Grundlinie aufgenommen.

Erste Tests wurden außer mit dem Substrat Fructose-1,6-bisphosphat auch mit Fructose-1-phosphat, Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat durchgeführt. Die dabei gemessenen spezifischen Aktivitäten wurden in der Tabelle 46 zusammengestellt.

Tab. 46: Im Zuge des Aldolase-Tests ermittelte spezifische Aktivitäten des Substratumsatzes an der Cytoplasmafraktion aus *G. oxydans* 621H.

Substrat	spez. Aktivität [mU/mg] Cytoplasma
Fructose-1,6-bisphosphat	28
Fructose-1-phosphat	no activity
Glucose-1-phosphat	20
Glucose-6-phosphat	19

Diese ersten Messungen der Aldolase-Aktivität gaben einen Hinweis darauf, dass die im Genom detektierten Enzyme nicht nur transkribiert (vgl. Tab. 45) sondern auch in funktionsfähige Enzyme translatiert wurden. Weitere Untersuchungen, die auch andere Substrate einbeziehen oder durch Inhibieren anderer, möglicherweise für die gemessenen Reaktionen in Frage kommender Enzyme, müssen hier jedoch noch folgen. Da nicht auszuschließen war, dass die gemessenen Aktivitäten auf z.B. andere lösliche Enzyme zurückzuführen ist, sind weiterführende Messungen des Substratspektrums mit gereinigten Enzymen sinnvoll. Weil die Glykolyse in *G. oxydans* aufgrund der fehlenden 6-Phosphofructokinase nicht funktionsfähig ist, die Fructose-bisphosphat-Aldolasen jedoch transkribiert und auch translatiert wurden, scheinen sie demnach eine für den Anabolismus wichtige Funktion auszuüben.

3.4.9. Zusammenfassung der Microarray-basierten Transkriptionsanalysen

Fasst man die mit Hilfe der genomweiten Microarrays zusammengetragenen Daten für die Transkriptions-Vergleiche nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen, bei unterschiedlichen pH-Werten oder Wachstumsraten, sowie bei abweichender Sauerstoffverfügbarkeit kurz zusammen, so ergibt sich im Verbund mit den Resultaten der in 3.4. zusätzlich durchgeführten Untersuchungen (Elektronenmikroskopie und Aldolase-Assay) das folgende Bild. Beim Wachstum von *Gluconobacter oxydans* 621H auf den getesteten C-Quellen Glucose, Mannitol und Sorbitol war kein Unterschied in

der Transkription der zentralen Stoffwechselwege (Pentosephosphat- und KDPG-Weg), der Atmungskettenkomponenten oder der zur Kofaktor-Biogenese benötigten Gene festzustellen. Auch in der Ausstattung mit Oxidoreduktasen veränderte sich beim Wechsel der C-Quelle nichts, mit einer Ausnahme. Diese betraf den ORF einer uncharakterisierten PQQ-haltigen Dehydrogenase (ERGO 0494, NCBI GOX1857), der sowohl auf Mannitol-, als auch auf Sorbitol-haltigem Vollmedium gegenüber der Glucose enthaltenden Referenz mehr als dreifach, und somit signifikant reguliert wurde. Diese Aussagen galten nicht nur für C-Quellen-limitierte Chemostat-Kulturen, sondern stimmten auch mit Daten überein, die nach dem Vergleich der Transkription in unlimitiert gewachsenen Schüttelkulturen erhalten wurden.

Auch nach dem Wachstum bei den pH-Werten von 3,5 als Testbedingung und 5,5 als Referenz in Vollmedium mit 50 mM Glucose im Chemostat waren die Gene der meisten verschiedenen Oxidoreduktasen konstitutiv transkribiert. Gerade die Transkription der Gene des Pentosephosphatweges bei pH 3,5 war interessant, da es Hinweise von OLIJVE und KOK (1979b) darauf gab, dass dieser Stoffwechselweg bei pH-Werten unter 3,5 – 4,0 abgeschaltet wird. Allerdings wurden die von Ihnen veröffentlichten Daten nach Wachstum bei pH 2,5 in Minimalmedium ermittelt und bezogen sich auf physiologische Messungen. Bei diesem pH-Wert gelang jedoch bislang mit dem etablierten Protokoll zur Probenaufbereitung von *G. oxydans* für die Transkriptionsanalyse kein Hybridisierungsexperiment. Zumindest bei pH 3,5 in Vollmedium war der beschriebene Effekt auf transkriptioneller Ebene nicht zu beobachten.

Beim Vergleich der Wachstumsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ mit $0,16 \text{ h}^{-1}$ und $0,05 \text{ h}^{-1}$ waren erneut die Gene des Pentosephosphat- und KDPG-Wegs unabhängig der hier gewählten Wachstumsraten konstitutiv transkribiert. Im Mikroskop konnte bei der geringen Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ eine Veränderung der Morphologie hin zu langgestreckten Zellen beobachtet werden. In dieser Arbeit durchgeführte elektronenmikroskopische Aufnahmen deuteten auf ein Vorhandensein von intracytoplasmatischen Membranen unter dieser Wachstumsbedingung hin. Ein Ausbleiben eines diesbezüglich erkennbaren Effektes in der Transkriptionsanalyse wurde auf die in der Literatur (CLAUS *et al.*, 1975) beschriebene fortgesetzte

Membranbildung nach der aktiven Zellteilungsphase zurückgeführt, die keine abweichende Regulation erfordert.

Das herausragende Merkmal der Microarray-Experimente nach Wachstum bei pO_2 -Werten von 80 % und 2 % war die verstärkte Transkription von Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen bei geringer Sauerstoffverfügbarkeit. Zeitgleich blieben die Oxidoreduktasen sowie der Pentosephosphat- und KDPG-Weg unverändert unter beiden Bedingungen konstitutiv transkribiert. Somit scheint die Oxidationsfähigkeit einer Vielzahl von Substraten erhalten zu bleiben, während das Bakterium durch Ausprägung einer Beweglichkeit bestrebt ist, einen sauerstoffreichen Ort aufzusuchen um die C-Quelle umsetzen und dabei Reduktionsäquivalente auf den terminalen Akzeptor O_2 übertragen zu können.

Die Expression der im Genom von *G. oxydans* vorkommenden Fructose-bisphosphat-Aldolasen konnte mit Hilfe von Transkriptionsanalysen und ersten biochemischen Messungen gezeigt werden. Dabei wurde ersichtlich, dass diese Enzyme offenbar ein breites Substratspektrum aufweisen, wobei einzuschränken ist, dass weitere Untersuchungen dazu noch anzufertigen sind, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass auch andere Enzyme in der Cytoplasmafraktion an der gemessenen Aktivität des Substratumsatzes beteiligt gewesen sein könnten.

Insbesondere für die weitere Untersuchung der Transkription einer Vielzahl von Dehydrogenasen ist wünschenswert, die Chemostat-Kulturen statt in Vollmedium in einem chemisch definierten Medium anzuziehen. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass eine konstitutive Transkription dieser Enzyme auf mögliche Induktormoleküle als Bestandteil des Vollmediums zurückzuführen ist.

3.5. Quantitative *real-time* RT PCR-Experimente zum Verifizieren der mittels Transkriptionsanalysen gefundenen Ergebnisse

Viele Bakterien regulieren die Expression ihrer Proteine aus energetischen Gründen sehr strikt. Eine konstitutive Transkription von einer derart hohen Anzahl von prominenten und auch uncharakterisierten Oxidoreduktasen in *G. oxydans* 621H war

daher sehr erstaunlich, zumal der Wechsel der in dieser Arbeit getesteten Kohlenstoffquellen keine signifikante Regulation erkennen ließ, ebenso wie andere, im vorhergehenden Abschnitt 3.4. beschriebene Wachstumsparameter. Um ein mögliches Artefakt bei der Bestimmung der Transkriptionsdaten mittels Microarray auszuschließen, wurde die amplifizierende und daher sehr sensitive Methode der quantitativen *real-time* RT PCR herangezogen, um die konstitutive Transkription enzymkodierender Gene mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen. Zum Etablieren der hierfür notwendigen, in 2.9. beschriebenen Methode für *Gluconobacter oxydans* wurden zunächst Schüttelkulturen verwendet. Die daraus resultierenden *real-time* RT PCR-Daten werden in Kapitel 3.5.1. präsentiert und im Kapitel 3.5.2. um die Daten von Chemostat-gewachsenen Zellen erweitert. Nach dem Etablieren eines Minimalmediums konnte auch eine bislang nicht auszuschließende Artefaktbildung durch eventuell im Vollmedium enthaltene Transkriptions-Induktoren für Oxidoreduktasen untersucht werden (s. Kapitel 3.5.3.). Letztlich werden die mit der *real-time* RT PCR ermittelten Ergebnisse in Kapitel 3.5.4. noch einmal kurz zusammengefasst.

3.5.1. Untersuchung der Genexpression nach Wachstum auf Vollmedium in *batch*-Kultur mit der quantitativen *real time* RT PCR

Zunächst sollen also in diesem Abschnitt die Ergebnisse der quantitativen *real-time* RT PCR von *batch*-Kulturen vorgestellt werden. Für diese Schüttelkulturen wurden nicht nur die in dieser Arbeit üblichen C-Quellen Glucose, Mannitol und Sorbitol eingesetzt, sondern auch weitere, wie z.B. Arabitol und Glycerol, um den durch Microarray-Analysen gewonnenen Einblick in die konstitutive Transkription von Oxidoreduktasen mit Hilfe der *real-time* RT PCR zu vertiefen. Das Wachstum der Zellen erfolgte dazu in Vollmedium mit den verschiedenen C-Quellen in Schikanekolben, wie dies in Kapitel 2.4. beschrieben wurde. Für die *real-time* RT PCR-Experimente wurden Primer von 24 ORFs von Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen abgeleitet. Hinzu kamen drei vermutlich konstitutiv exprimierte ORFs als Positivkontrollen und pro pipettierter Mikrotiterplatte vier Reaktionen mit gesamt-RNA von *Bacillus licheniformis* als *template* für Negativkontrollen. Die entsprechenden ORF-Nummern, Annotationen und Primer können der Tabelle 47 entnommen werden.

Tab. 47: Auswahl von Genen, die per *real-time* RT PCR auf ihre Transkription unter verschiedenen Bedingungen überprüft wurden.

Angegeben sind die ERGO und NCBI-Bezeichnung, und die dazugehörige Annotation. Grau hinterlegt sind konstitutiv transkribierte Gene

ERGO ORF	NCBI ORF	Enzym
2454	GOX1067	alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit
2455	GOX1068	alcohol dehydrogenase large subunit (membrane-bound, PQQ-linked)
1934	GOX0585	cytochrome c subunit of aldehyde dehydrogenase
1935	GOX0586	membrane-bound aldehyde dehydrogenase, small subunit
1936	GOX0587	membrane-bound aldehyde dehydrogenase, large subunit
2568	GOX1170	putative lactate dehydrogenase (cyt c dependent)
0731	GOX2071	D-lactate dehydrogenase (cytochrome c-dependent)
1549	GOX0265	membrane-bound glucose dehydrogenase (PQQ)
2631	GOX1230	gluconate 2-dehydrogenase, cytochrome c subunit
2632	GOX1231	gluconate 2-dehydrogenase alpha chain
2633	GOX1232	gluconate 2-dehydrogenase gamma chain
3621	GOX0854	D-sorbitol dehydrogenase subunit sldA
2231	GOX0855	D-sorbitol dehydrogenase subunit sldB
0754	GOX2094	sorbitol dehydrogenase cytochrome c subunit
0755	GOX2095	sorbitol dehydrogenase large subunit
0757	GOX2097	sorbitol dehydrogenase small subunit
3500	GOX0516	uncharacterized PQQ-containing oxidoreductase
027	GOX1441	uncharacterized PQQ-containing oxidoreductase
0494	GOX1857	uncharacterized PQQ-containing oxidoreductase
0618	GOX1969	uncharacterized PQQ-containing oxidoreductase
0667	GOX2015	NAD(P)-dependent glucose 1-dehydrogenase
0864	GOX2187	gluconate-5-dehydrogenase (NADP)
0010	GOX1432	NADP-D-sorbitol dehydrogenase
2223	GOX0849	NADPH-dependent L-sorbose reductase
0671	GOX2018	aldehyde dehydrogenase (involved in Pyr degrad.)
1603	GOX0313	putative propanol-preferring alcohol dehydrogenase
1262	GOX0001	Chromosomal replication initiator protein DnaA
1658	GOX0356	DNA-directed RNA polymerase alpha chain
3453	GOX1852	Glutamate synthase [NADPH] large chain

Da *Bacillus licheniformis* Gesamt-RNA für die Negativkontrollen verwendet wurde, war zunächst sicherzustellen, dass hieran keine Anlagerung der für *Gluconobacter oxydans* abgeleiteten und in die Negativkontrollen eingesetzten Primer stattfand. Die aus einer Parallelbestimmung ermittelten *Threshold-Cycle* (C_T)-Werte, also jene errechnete PCR-Zyklenanzahl, bei der durch Interkalieren des SYBR-green-Farbstoffes in entstandene doppelsträngige cDNA eine Fluoreszenzsignal-Signifikanzgrenze überschritten wurde, sind in Tabelle 48 angegeben. Diese Werte boten einen Anhaltspunkt, ab welchem C_T -Wert von einem abgeschalteten Gen einer Dehydrogenase ausgegangen werden konnte.

Tab. 48: C_T -Werte bei Verwendung von *Bacillus licheniformis* gesamt-RNA und *G. oxydans*-spezifischen Primern für die quantitative *real-time* RT PCR.

ERGO	C_T -Wert		gemittelt
	1	2	
1549	27,6	27,8	27,70
1603	24	23,3	23,65
3500	30,1	29,8	29,95
1934	27,1	27,6	27,35
1935	28,3	27,1	27,70
1936	28,9	29,1	29,00
2223	30,8	31,1	30,95
3621	32,7	n.d.	32,70
2231	24	23,7	23,85
2454	29,1	28,8	28,95
2455	32,8	30,3	31,55
2568	31,9	33,3	32,60
2631	30,6	30	30,30
2632	24	23,9	23,95
2633	28,1	28,1	28,10
0010	27,1	26,9	27,00
0027	31,5	31,8	31,65
0494	32,9	29,7	31,30
0618	29	29,5	29,25
0667	35,5	n.d.	35,50
0671	29,9	29,6	29,75
0731	27,5	26,9	27,20
0754	5,5	25,8	25,65
0755	27,3	25,6	26,45

Für einen qualitativen Anhaltspunkt über einen transkribierten- oder nicht transkribierten Zustand eines ORFs unter den jeweiligen getesteten Bedingungen wurde der durchschnittliche C_T -Wert der in o.g. Tabelle 48 angegebenen 24 gemittelten Negativkontrollen errechnet. Dieser lag bei 29,1 Zyklen. Es wurden die vier Primer mit

den ERGO-ORF-Nummern 3500, 0027, 0494 und 0667 ausgewählt, um sie in allen weiteren Messungen als Negativ-Kontrollen einzusetzen.

Die nachfolgende Tabelle 50 enthält eine Übersicht über die C_T -Werte der oben genannten ORFs in Zellen, die in Schüttelkulturen auf Vollmedium wuchsen, das jeweils eines der Substrate Mannitol, Glucose, Sorbitol, Arabitol oder Glycerol enthielt (je 75 mM). Die angegebenen gemittelten Werte basierten für jeden ORF auf drei Einzelmessungen. Zwei Daten entstammten dem ersten biologischen Experiment und dessen experimenteller Wiederholung, die dritte Messung stellte die Wiederholung des biologischen Experimentes dar.

Tab. 49: C_T -Werte bei Verwendung von *G. oxydans* gesamt-RNA und spezifischen Primern für die quantitative *real-time* RT PCR.

Primer ERGO-Nr	C_T -Wert auf folgender C-Quelle:				
	Mannitol	Glucose	Sorbitol	Arabitol	Glycerol
1549	15,4	15,2	14,8	15,5	15,5
1603	14,1	15,0	15,6	13,9	13,9
3500	18,2	16,8	16,3	17,9	17,8
1934	17,2	16,6	16,7	17,0	17,0
1935	17,3	16,4	17,1	17,1	17,1
1936	19,3	18,2	18,3	19,5	19,5
2223	17,6	17,0	17,3	17,5	17,5
3621	10,4	10,5	10,6	10,3	10,3
2231	12,4	12,1	12,5	12,4	12,4
2454	12,9	10,5	13,1	12,8	12,7
2455	9,9	9,1	10,6	9,8	9,8
2568	20,7	19,9	20,2	20,5	20,4
2631	17,6	15,6	16,1	17,6	16,6
2632	14,8	15,2	15,1	14,8	14,7
2633	15,6	15,3	16,7	15,6	15,5
0010	15,7	14,7	15,6	15,7	15,6
0027	22,3	21,9	22,5	22,3	22,7
0494	12,2	14,8	11,4	12,2	11,7
0618	19,0	17,3	18,1	19,0	19,0
0667	15,4	15,5	15,9	15,4	15,3
0671	21,1	20,7	20,2	21,1	21,0
0731	18,6	19,3	19,2	18,6	18,4
0754	22,0	21,5	21,4	22,0	21,7
0755	21,8	20,8	21,7	21,8	21,7
1262	14,9	14,9	15,2	14,9	14,8
1658	12,3	11,7	11,2	12,3	11,6
3453	15,7	15,7	16,6	15,7	15,7

Anhand der in obiger Tabelle aufgeführten C_T -Werte konnte erneut die qualitative Aussage getroffen werden, dass die meisten der ORFs bei allen getesteten C-Quellen deutlich transkribiert worden waren. Setzt man den *cut-off* für eine klar erkennbare Transkription auf einen C_T -Wert von weniger als 20,0 fest, so wurden 80 % der hier untersuchten ORFs abgelesen (von dieser prozentualen Berechnung ausgenommen waren die positiv-Kontrollen, da für diese in jedem Fall eine Transkription erwartet worden war). Diese Aussage bestätigte die bislang per Microarray ermittelten Daten zur konstitutiven Transkription einer Vielzahl von Oxidoreduktasen in *batch*- und Chemostat-Kulturen unter verschiedenen Bedingungen, zu denen eben auch unterschiedliche C-Quellen gehörten. Damit die *real-time* RT PCR-Experimente besser mit den Daten von Microarray-Analysen korreliert werden können, sollten die *real-time* RT PCR-Untersuchungen mit *RNA-template* aus Chemostat-Kulturen wiederholt werden. Die Auswertung der dabei ermittelten Daten wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.5.2. Vergleich der Genexpression zwischen *batch*- und Chemostat-gewachsenen Kulturen

Bedingt durch den hohen zeitlichen Aufwand bis zur Ernte einer Chemostat-Kultur, war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, für alle im vorigen Kapitel beschriebenen Substrate kontinuierliche Kulturen zu ernten. Um für die *real-time* RT PCR vergleichbare Ausgangsbedingungen wie für die Microarray-Experimente zu schaffen, wurden Chemostat-Kulturen geerntet, die auf Glucose, Mannitol oder Sorbitol gewachsen waren. Die für das Zellwachstum eingestellte Wachstumsrate lag bei $0,26 \cdot h^{-1}$, die Temperatur bei 30 °C, der pH-Wert bei 6,0 und der Anteil des gelösten Sauerstoffs bei 80 % des maximal im verwendeten Chemostat erreichbaren Wertes.

In Tabelle 50 sind die C_T -Werte der Chemostat-Kulturen angegeben und den Werten der *batch*-Kulturen gegenübergestellt (Tab. 49).

Tab. 50: C_T-Werte von in Tab. 47 angegebenen ORFs in der *real-time* RT PCR im direkten Vergleich von *batch*- und Chemostat-Kulturen bei Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen.

Primer ERGO-Nr	C _T -Wert auf folgender C-Quelle:					
	Glucose Chem.	Glucose <i>batch</i>	Mannitol Chem.	Mannitol <i>batch</i>	Sorbitol Chem.	Sorbitol <i>batch</i>
1549	12,5	15,2	11,9	15,4	13,2	14,8
1603	15,6	15,0	15,2	14,1	16,6	15,6
3500	14,9	16,8	9,2	18,2	15,1	16,3
1934	16,7	16,6	16,3	17,2	16,7	16,7
1935	16,5	16,4	16,7	17,3	16,7	17,1
1936	16,8	18,2	18,2	19,3	18,6	18,3
2223	16,7	17,0	16,7	17,6	18,0	17,3
3621	10,7	10,5	9,5	10,4	10,5	10,6
2231	12,3	12,1	10,6	12,4	10,5	12,5
2454	12,5	10,5	10,9	12,9	12,0	13,1
2455	10,7	9,1	9,5	9,9	10,3	10,6
2568	18,5	19,9	18,7	20,7	19,1	20,2
2631	15,5	15,6	14,2	17,6	14,7	16,1
2632	15,1	15,2	13,7	14,8	14,2	15,1
2633	15,5	15,3	14,2	15,6	14,9	16,7
0010	15,3	14,7	14,6	15,7	14,9	15,6
0027	23,1	21,9	23,1	22,3	22,0	22,5
0494	13,3	14,8	10,4	12,2	9,2	11,4
0618	15,3	17,3	16,1	19,0	15,3	18,1
0667	15,2	15,5	14,5	15,4	16,7	15,9
0671	19,2	20,7	19,4	21,1	19,6	20,2
0731	17,8	19,3	17,2	18,6	17,3	19,2
0754	21,6	21,5	21,6	22,0	21,5	21,4
0755	21,4	20,8	21,3	21,8	21,4	21,7
1262	13,4	14,9	13,5	14,9	14,2	15,2
1658	9,8	11,7	9,6	12,3	10,3	11,2
3453	14,9	15,7	13,4	15,7	15,3	16,6

Chem = Chemostat-Kultur

In obiger Tabelle aufgeführte Werte der Chemostat-Kulturen zeigten meist ähnliche C_T-Werte wie die für *batch*-Kulturen. Mitgeführte Negativkontrollen lagen im Bereich von 25,8 bis 26,6, so dass bei Werten mit einem C_T von etwa 20 von einer eher schwachen Transkription ausgegangen wurde. Der Vergleich der *real-time* RT PCR-Daten von *batch*- und Chemostat-gewachsenen Kulturen stützte aber weiterhin die zuvor getroffenen Aussagen einer unter allen hier getesteten Bedingungen erfolgenden

Transkription einer Vielzahl von Dehydrogenasen, denn keiner der ORFs lag mit seinem C_T -Wert im engeren Bereich der Negativkontrollen. Zudem lagen die Werte für die Schüttelkultur und für die kontinuierliche Kultur, die neben nicht-konstanten bzw. konstanten Bedingungen auch den C-Quellen-unlimitierten bzw. limitierten Zustand repräsentierten, relativ dicht zusammen. Doch obwohl die ermittelten Daten unabhängiger Experimente mit sehr unterschiedlichen Bedingungen auf eine konstitutive Transkription der Dehydrogenasen schließen ließen, konnte noch immer nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung auf einer Induktion der Gene durch Vollmediumbestandteile beruhte. Daher wurden *real-time* RT PCR-Experimente auf einem Minimalmedium durchgeführt, wie dies in Kapitel 3.5.3. beschrieben ist.

3.5.3. Untersuchung der Genexpression bei Wachstum auf Minimalmedium

Es wäre denkbar, dass die mittels Microarray und *real-time* RT PCR ermittelten Daten, die auf eine konstitutive Transkription einer Vielzahl von Oxidoreduktasen schließen lassen, auf einer Induktion der Gene durch Bestandteile des Vollmediums zurückzuführen sein könnten. Es wurde deshalb in dieser Arbeit versucht, ein Minimalmedium für *G. oxydans* 621H zu etablieren, das eine ausreichende Zelldichte für die hier durchgeführten Experimente ermöglichte. Das Wachstum auf Minimalmedium und die sich daran anschließenden *real-time* RT PCR-Analysen werden in den folgenden zwei Kapiteln beschrieben.

3.5.3.1. Wachstum von *Gluconobacter oxydans* 621H auf Minimalmedium

In der Literatur fanden sich verschiedene Protokolle für Vollmedien, z.B. nach FLICKINGER und PERLMAN (1977), YAMADA (1979) oder für das auch in dieser Arbeit verwendete Medium nach BUCHERT und VIIKARI (1988). Ihnen gemeinsam war die hohe Konzentration komplexer Bestandteile. Von WETHMAR und DECKWER wurde 1999 ein semisynthetisches Medium beschrieben, dessen Anteil komplexer Bestandteile deutlich reduziert war. Doch auch mit diesem Medium wäre die beobachtete gleichzeitige Transkription einer Vielzahl von Dehydrogenasen nicht dahingehend zu überprüfen gewesen, ob dieser Effekt möglicherweise auf induzierend

wirkenden Bestandteilen des Komplexmediums basierte. Die Autoren wiesen darauf hin, dass es in der Literatur keine Beschreibung eines wirklich definierten Mediums gäbe, das gleichzeitig die Bedingung einer nennenswerten Wachstumsrate erfülle. Dies traf in der vorliegenden Arbeit auch auf das von OLIVÉ und KOK (1979b) beschriebene definierte Medium zu. Nicht zufriedenstellend verlief auch der Versuch, das von ASAI (1968) beschriebene definierte Medium nach SCHAMBERGER (1960) für die Zellanzucht von *Gluconobacter oxydans* 621H zu verwenden. Die hiermit erzielten Zelldichten waren mit einer OD von etwa 0,2 nicht ausreichend, um in handhabbaren Maßstäben genug Zellmaterial als Basis für die gesamt-RNA-Isolierung und weitergehende Experimente zu erhalten. Daher wurde in dieser Arbeit das in 2.3.3. beschriebene Minimalmedium etabliert. Mit diesem Medium wurde, nach zwei Minimalmedium-Vorkulturen, in der Hauptkultur auf Mannitol eine OD₆₀₀ von 0,81 und auf Sorbitol eine OD₆₀₀ von 0,54 erreicht. Ein Wachstum auf Glucose erfolgte in diesem Minimalmedium jedoch nicht. Zumindest für die C-Quellen Mannitol und Sorbitol konnten nun Vergleiche der Transkriptionsdaten nach Wachstum der Zellen auf Minimalmedium oder auf Vollmedium durchgeführt werden.

3.5.3.2. Quantitative *real-time* RT PCR von Minimalmedium-Kulturen

Nachdem ein Minimalmedium für *G. oxydans* etabliert werden konnte mit dem es möglich war ausreichend Zellmaterial für die Isolierung von gesamt-RNA und nachfolgende Untersuchungen zu erhalten, wurden *real-time* RT PCR-Experimente durchgeführt, um die daraus resultierenden Transkriptionsdaten mit denen von Vollmedium-Kulturen aus dem Schüttelkolben oder aus dem Chemostat zu vergleichen (Tab.51). Einschränkend ist hier zu erwähnen, dass die Wiederholung des biologischen Experimentes auf Minimalmedium noch aussteht.

Tab. 51: Vergleich der C_T -Werte von Schüttel- und Chemostatkulturen gewachsen in Vollmedium, mit denen von Schüttelkulturen in Minimalmedium.

ERGO	direkter Vergleich der C_T -Werte der verschiedenen Anzucht-Methoden								
	Mannitol			Glucose			Sorbitol		
	batch VM	batch MM	Chemostat VM	batch VM	batch MM	Chemostat VM	batch VM	batch MM	Chemostat VM
1549	15,4	15,8	11,9	15,2	n.d.	12,5	14,8	15,4	13,2
1603	14,1	14,5	15,2	15,0	n.d.	15,6	15,6	13,7	16,6
3500	18,2	15,0	9,2	16,8	n.d.	14,9	16,3	15,8	15,1
1934	17,2	16,7	16,3	16,6	n.d.	16,7	16,7	16,3	16,7
1935	17,3	16,5	16,7	16,4	n.d.	16,5	17,1	16,5	16,7
1936	19,3	18,9	18,2	18,2	n.d.	16,8	18,3	19,1	18,6
2223	17,6	17,4	16,7	17,0	n.d.	16,7	17,3	17,0	18,0
3621	10,4	10,2	9,5	10,5	n.d.	10,7	10,6	10,4	10,5
2231	12,4	12,5	10,6	12,1	n.d.	12,3	12,5	11,0	10,5
2454	12,9	11,2	10,9	10,5	n.d.	12,5	13,1	10,2	12,0
2455	9,9	9,0	9,5	9,1	n.d.	10,7	10,6	8,4	10,3
2568	20,7	19,2	18,7	19,9	n.d.	18,5	20,2	18,5	19,1
2631	17,6	15,8	14,2	15,6	n.d.	15,5	16,1	14,3	14,7
2632	14,8	15,3	13,7	15,2	n.d.	15,1	15,1	14,2	14,2
2633	15,6	11,0	14,2	15,3	n.d.	15,5	16,7	15,4	14,9
0010	15,7	13,8	14,6	14,7	n.d.	15,3	15,6	14,2	14,9
0027	22,3	19,7	23,1	21,9	n.d.	23,1	22,5	20,3	22,0
0494	12,2	13,5	10,4	14,8	n.d.	13,3	11,4	15,3	9,2
0618	19,0	15,8	16,1	17,3	n.d.	15,3	18,1	16,2	15,3
0667	15,4	12,7	14,5	15,5	n.d.	15,2	15,9	11,2	16,7
0671	21,1	19,5	19,4	20,7	n.d.	19,2	20,2	18,2	19,6
0731	18,6	18,1	17,2	19,3	n.d.	17,8	19,2	18,0	17,3
0754	22,0	21,4	21,6	21,5	n.d.	21,6	21,4	21,2	21,5
0755	21,8	19,9	21,3	20,8	n.d.	21,4	21,7	19,9	21,4
1262	14,9	14,4	13,5	14,9	n.d.	13,4	15,2	14,4	14,2
1658	12,3	12,5	9,6	11,7	n.d.	9,8	11,2	12,8	10,3
3453	15,7	15,4	13,4	15,7	n.d.	14,9	16,6	15,8	15,3

Mit Hilfe der in diesem Experiment ermittelten Daten konnte gezeigt werden, dass in Minimalmedium verschiedene, hier untersuchte Dehydrogenasen in Schüttelkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase transkribiert wurden, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Mannitol und Sorbitol als C-Quelle zu verzeichnen waren. Mit diesem Ergebnis konnte nun bestätigt werden, dass sowohl in Schüttelkulturen, als auch im Chemostat mit Vollmedium, ebenso wie in Minimalmedium auf den hier getesteten Kohlenstoffquellen eine Transkription von Oxidoreduktasen stattfand. Eine Transkriptionsinduktion nur aufgrund der Bestandteile des Vollmediums konnte somit

ausgeschlossen werden. Diesbezügliche Untersuchungen im Chemostat sind hieran noch anzuschließen.

3.5.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der *real-time* RT PCR-Experimente

Die vorangegangenen Kapitel über die Untersuchung der Transkription von Dehydrogenasen mittels quantitativer *real-time* RT PCR lassen sich folgendermaßen kurz zusammenfassen. Eine konstitutive Transkription von mindestens 80 % der hier untersuchten Dehydrogenasen/Reduktasen (vgl. Tabelle 47) fand in Schüttelkulturen auf Vollmedium mit verschiedenen C-Quellen, namentlich Glucose, Mannitol, Sorbitol, Arabitol und auch Glycerol, statt. Dasselbe galt für Kulturen in Vollmedium mit Glucose, Mannitol oder Sorbitol im Chemostat. Auch nach dem Wachstum in Schüttelkulturen auf dem in dieser Arbeit etablierten Minimalmedium mit Mannitol oder Sorbitol als C-Quelle konnten mittels quantitativer *real-time* RT PCR die Microarray-Daten zur konstitutiven Expression einer Vielzahl von Enzymen bestätigt werden. Somit kann also vermutet werden, dass die Überlebensstrategie dieses Bakteriums darauf beruht, durch konstitutive Verfügbarkeit z.B. verschiedener Zucker-, Zuckeralkohol-, Polyol- oder Zuckersäure-Dehydrogenasen jederzeit das vorhandene Substrat umsetzen zu können, ohne den Stoffwechsel zunächst entsprechend umstellen und Enzyme neu synthetisieren zu müssen.

3.6. Untersuchung ausgewählter Enzymaktivitäten von *Gluconobacter oxydans* 621H

Bereits in der Einleitung ist das Interesse an dem für biotechnologische Zwecke bedeutsamen Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* 621H erwähnt. Dieses Interesse ist in der Fähigkeit des Bakteriums begründet, ein breites Spektrum von z.B. Zuckern, Zuckersäuren, Zuckeralkoholen oder Polyolen unvollständig zu oxidieren. Von besonderer industrieller Relevanz sind dabei die membrangebundenen Dehydrogenasen. Diese weisen mit ihrem aktiven Zentrum in den periplasmatischen Raum hinein, sodass Substrate nicht in das Cytoplasma transportiert werden müssen. Die Produkte der unvollständigen Oxidationen sind dadurch leicht aus dem Medium zu

extrahieren. Die stereo- und regiospezifische, unvollständige Oxidation außerhalb der Zelle bietet den immensen Vorteil, dass potentiell auch ungewöhnliche Substrate umgesetzt werden können, für die die Zelle keinen Transporter besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurden einerseits durch Bestimmung der Aktivität ausgewählter Enzyme die Ergebnisse der Microarray- und der *real-time* RT PCR-Experimente überprüft. Zudem wurde das Oxidationspotential von *Gluconobacter oxydans* 621H im Hinblick auf den Umsatz azyklischer und zyklischer Alkohole sowie sauerstoff- und stickstoffhaltiger Substrate untersucht. Die Bestimmung dieser Enzymaktivitäten wurde mit Hilfe des optisch-enzymatischen Tests auf aktive Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976, mod.) durchgeführt (siehe 2.14.1.). Anhand der Abnahme der Extinktion des künstlichen Elektronenakzeptors und Redox-Indikators DCPIP (s. Abb. 24) konnte die Enzymaktivität gegenüber dem eingesetzten Substrat errechnet werden.

Abb. 24: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des optisch-enzymatischen Tests auf aktive Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976, mod.).

Die photometrische Bestimmung der DCPIP-Entfärbung im Zuge der Reduktion erfolgte bei 578 nm.

Die zuvor beschriebene konstitutive Expression verschiedener Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H ließ eine Untersuchung des Substratspektrums im Hinblick auf stickstoffhaltige Substrate zu. Analoge Experimente wurden zuvor bereits von KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000) mit dem *G. oxydans* – Stamm 2003 durchgeführt. Es sollte sich nun zeigen, ob *G. oxydans* 621H ein ähnliches Oxidationspotential gegenüber den von KYRIELEIS (1999) synthetisierten Alkoholen aufweist wie der Stamm 2003. Wie in den Experimenten mit dem Stamm 2003 wurden auch in dieser Arbeit mit dem Stamm 621H Membranpräparationen zur Analyse der

Enzymaktivitäten eingesetzt. Ein Wachstum von *G. oxydans* 621H auf Vollmedium, das z.B. N-haltige Heterozyklen als C-Quelle enthielt, war nicht möglich. Dies wurde von KYRIELEIS (1999) auch für den Stamm 2003 beschrieben. Dieser Sachverhalt stimmte mit der Beobachtung von KINAST *et al.* (1981) überein, dass eine Umsetzung von 1-Amino-1-desoxy-D-sorbit zu 6-Amino-6-desoxy-L-sorbose bei der Produktion von 1-Desoxynojirimycin, wichtig für die Herstellung des Antidiabetikums Miglitol, nur mit ruhenden Zellen möglich ist.

Von den von KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000) mit dem *G. oxydans*-Stamm 2003 umgesetzten ‚ungewöhnlichen‘ Substraten wurden zum Vergleich drei Substrate mit Stickstoff-Heteroatom durch die Membranfraktion des *G. oxydans*-Stammes 621H oxidiert. Die spezifischen Aktivitäten beim Umsatz der Substrate 1-Amino-2,3-propandiol, 2-Amino-1,3-propandiol und dem 2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Derivat 1-Carbobenzoxo-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin sind in Tabelle 52 aufgeführt. Die Messungen der Enzymaktivitäten erfolgte nach dem optisch-enzymatischen Test auf aktive Dehydrogenasen (SHINAGAWA *et al.*, 1976, mod.) mit gewaschenen Membranen.

Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Oxidation von azyklischen, stickstoffhaltigen Verbindungen wie 1-Amino-2,3-propandiol und 2-Amino-1,3-propandiol, sowie als Stickstoffheterozyklus ein 2,6-Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Derivat, auch mit Membranen aus dem *G. oxydans* Stamm 621H möglich ist. Im Gegensatz zu WEIß (2000) wurde in dieser Arbeit jedoch nicht das 1-Carboethoxy- ($R = C_2H_5$) sondern das 1-Carbobenzoxo-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin als Substrat verwendet. Ersichtlich wurde, dass die ermittelten spezifischen Aktivitäten deutlich geringer ausfielen als im Stamm 2003, für den auch KYRIELEIS (1999) spezifische Aktivitäten in derselben Größenordnung messen konnte wie WEIß (2000). Nach WEIß handelt es sich bei den Piperidinderivaten um die ersten zyklischen Amine, die durch den *G. oxydans* Stamm 2003 umgesetzt werden konnten. Dieses Oxidationspotential konnte in dieser Arbeit also auch für den vollständig sequenzierten *Gluconobacter oxydans* Stamm 621H nachgewiesen werden.

Tab. 52: Oxidation von stickstoffhaltigen Substraten durch gewaschene Membranen von *G. oxydans* 621H (diese Arbeit) im Vergleich zum Stamm 2003 (WEIß, 2000)

Substrat	spez. Aktivität (U/mg)	
	621H	2003
1-Amino-2,3-propandiol	0,45	1,6
2-Amino-1,3-propandiol	0,41	2,1
2,6-Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-N-carbonsäureester R = CH ₂ -C ₆ H ₅	0,3	2,6

Die in der Tabelle genannten Substrate wurden im Rahmen der Diplomarbeit von O. Kyrieleis und M. Tietze am Institut für Organische Chemie, Universität Göttingen, synthetisiert und von Prof. Dr. U. Deppenmeier freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aufgrund der potentiellen Bedeutung, die eine unvollständige Oxidation eines zyklischen Amins wie z.B. des 2,6-Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Derivats für pharmazeutische Zwecke haben könnte, wurden in der vorliegenden Arbeit Anstrengungen zur Aufreinigung und Identifikation der Piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität unternommen. Die dazu durchgeführten Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.7. Untersuchung einer 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Aktivität aus *G. oxydans*

Zyklische Amine könnten eine Bedeutung in der Wirkstoffpartialsynthese erlangen. So wäre z.B. eine Verwendung des Piperidin-Derivats 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin als Vorläufersubstanz für die Alkaloidsynthese vorstellbar. Von medizinischer Relevanz wäre dabei die Enantioselektivität der unvollständigen Oxidation, da Stereoisomere eines Wirkstoffes fatale Auswirkungen haben können. Auf diese Bedeutung wird in der Diskussion noch genauer eingegangen werden. Der Einsatz von *Gluconobacter oxydans* für die enantioselektive Biokonversion könnte eine aufwendige Schutzgruppenchemie bei der o.g. Synthese medizinisch relevanter Alkaloidanaloge ersetzen. Eine schematische Darstellung des möglichen stereoselektiven Oxidationsverlaufs ist in Abb. 25 gezeigt.

Abb. 25: Möglicher Verlauf der Oxidation eines *meso*-Piperidin-Derivats durch *G. oxydans* (nach WEIß, 2000; mod.)

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, das für die 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin-oxidierende Aktivität verantwortliche Enzym anzureichern. Die dazu durchgeführten säulenchromatographischen Experimente werden in den nächsten Kapiteln beschrieben. Mit Hilfe einer Bestimmung des pH-Optimums der Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Dehydrogenase wurde versucht, ob der Substratumsatz durch Veränderung der Versuchsbedingungen steigerbar ist (s. 3.7.2.). Das angereicherte Enzym konnte dann einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen werden, was Aufschluss über die Identität der in Polyacrylamid-Gelen gefundenen Proteinbanden geben sollte.

3.7.1. Lokalisierung der Bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Aktivität in *G. oxydans*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben dem *G. oxydans* Stamm 2003 auch der Stamm 621H in der Lage war, den Stickstoff-Heterozyklus 1-Carbobenzoxo-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin zu oxidieren. Die dazu im Kapitel 3.6. beschriebenen Experimente wurden in Anlehnung an KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000) mit einer Membranfraktion durchgeführt. Die Herstellung der Membranfraktion ist im Kapitel 2.10. beschrieben. Aufgrund der vollständigen Sequenzierung des Stammes 621H wurden die im folgenden beschriebenen Experimente mit eben diesem Stamm durchgeführt. Da in den vorhergehenden Untersuchungen lediglich die Membranfraktion berücksichtigt wurde, sollte zunächst die Frage nach einer eventuellen Verteilung der Piperidinderivat-oxidierenden Aktivität auf cytoplasmatische- und membrangebundene Enzyme geklärt werden. Dazu wurden nach der Beschreibung in Kapitel 2.10. Membranen und Cytoplasma voneinander getrennt. Um nach den Waschschritten eventuelle Kontaminationen der Membranfraktion mit cytoplasmatischen Proteinen zu vermeiden, wurden die membrangebundenen Enzyme solubilisiert, also mit Detergenz in Micellen gebracht (Kapitel 2.10). In dieser Arbeit wurde die Solubilisierung mit dem Detergenz CHAPS durchgeführt, dessen Konzentration 2 mg Detergenz pro mg Protein betrug. Im Gegensatz zum Triton X-100 stört CHAPS nicht die Proteinkonzentrationsbestimmung nach BRADFORD. Die Effizienz der Solubilisierung der Piperidin-Derivat-Dehydrogenase mit der genannten Konzentration von 2 mg CHAPS pro mg Protein lag bei 68 %. Das heißt, ca. 70% der im Rohextrakt gemessenen ‚Piperidin-Dehydrogenase-Aktivität‘ fanden sich im CHAPS-Solubilisat wieder. Cytoplasmatische- und solubilierte membrangebundene Proteine konnten demnach getrennt mit Hilfe des optisch-enzymatischen Tests auf aktive Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976, mod.) auf ihre oxidierende Aktivität gegenüber 1-Carbobenzoxo-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin untersucht werden (Abb. 26).

Abb. 26: Vergleich der 1-Carbobenzoxy-2,6-bis(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Aktivität von Cytoplasma- und Membranfraktion. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels optisch-enzymatischen Test nach SHINAGAWA *et al.* (1976, mod.). 1) solubilisierte Membranen, 2) Cytoplasmafraktion.

In beiden Testansätzen betrug die Proteinkonzentration 0,6 mg/ml. Abb. 26 zeigt deutlich die fehlende Piperidin-Derivat oxidierende Aktivität im Cytoplasma (2). Der in vorangegangenen Experimenten gestellte Befund, die Membranfraktion sei zur Oxidation des Piperidins in der Lage (*G. oxydans* Stamm 621H s. 3.6. dieser Arbeit, sowie Stamm 2003 s. KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000)), wurde durch dieses Experiment bestätigt (1). Die CHAPS-solubilierten Membranen wiesen hier eine spezifische Aktivität von 0,21 U/mg Protein gegenüber dem 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin auf, was in der selben Größenordnung lag wie die in Abschnitt 3.6. für den Stamm 621H gemessene Aktivität.

3.7.2. pH-Optimum der Bis-(hydroxymethyl)-piperidin Dehydrogenase

Mit CHAPS solubilierte Membranen wurden auch zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes für den Umsatz des Piperidin-Derivats herangezogen. Die nach BRADFORD bestimmte Proteinkonzentration im Solubilisat betrug 7,2 mg/ml. Zur Messung der Enzymaktivität mit dem Test nach SHINAGAWA *et al.* (1976) wurden in den Ansatz jeder getesteten pH-Stufe 20 µl des Solubilisats pipettiert, was einer Proteinmenge von 144 µg Protein entsprach. Im Solubilisat wurde ein pH-Wert von 6,3 gemessen. Die

spezifische Aktivität gegenüber dem 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin lag bei 0,24 U/mg, also erneut im Bereich der zuvor gemessenen spezifischen Aktivitäten (vgl. 3.7.1. und 3.6.). In diesem Versuch wurden pH-Werte von 2,5, 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0 und 9,0 eingestellt. Hierbei stellte sich das Problem, dass sich der im oxidierten Zustand bei neutralem pH-Wert blau gefärbte Redox-Indikator DCPIP beim pH-Wert von kleiner als 6,0 über violett nach rot verfärbte. Um diese negative Beeinflussung des Tests zu umgehen, wurde die Strategie gewählt, das Protein für 30 Minuten beim gewählten pH-Wert zu inkubieren. Das präinkubierte Protein wurde dann in den Testansatz mit Kaliumphosphatpuffer (pH 6) eingebracht und damit sofort die Enzymaktivität bestimmt. Für die bei verschiedenen pH-Werten präinkubierte Piperidin-Derivat Dehydrogenase konnte folgende Aktivitätsverteilung gemessen werden (s. Tabelle 53):

Tab. 53: Spezifische Aktivität der Piperidin-Derivat Dehydrogenase nach Inkubation bei voreingestellten pH-Werten:

pH-Wert	spez. Aktivität (U/mg)
2,5	-
4,0	0,08
5,0	0,15
5,5	0,22
6,0	0,24
6,5	0,26
7,0	0,14
8,0	0,08
9,0	-

Aus der Tabelle 53 ist ersichtlich, dass im Bereich von pH 6,0 bis 6,5 die optimale Oxidation des Carbobenzoxy-bis-(hydroxymethyl)-piperidins stattfand. Die Abb. 27 veranschaulicht diese Aktivitätsverteilung noch einmal graphisch. Da auch der pH-Wert des Solubilisats vor der Präinkubation in diesem Bereich lag, konnte die Membran-Präparationsmethode ohne Optimierung der pH-Bedingungen für weitere Experimente beibehalten werden.

Abb. 27: Spezifische Aktivität der Piperidin-Derivat oxidierenden Dehydrogenase bei verschiedenen pH-Werten.

Die optimale Aktivität fand sich im Bereich von pH 6,0 bis 6,5.

Nach dem Lokalisieren der Carbobenzoxymethyl-bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Aktivität in der Membranfraktion von *G. oxydans* 621H und der Bestimmung des optimalen pH-Wertes für den enzymatischen Umsatz dieses Substrats wurde untersucht, welches Protein für die Dehydrogenaseaktivität verantwortlich ist. Nachfolgende Experimente befassten sich daher mit der säulenchromatographischen Proteinreinigung.

3.7.3. Aufreinigung einer Piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität

Für die weitere Charakterisierung der Piperidin-Derivat umsetzenden Dehydrogenase war eine Fraktionierung der Proteine des CHAPS-Solubilisats notwendig. Diese Aufreinigung sollte, wie nachfolgend beschrieben, mit Hilfe der Flüssigchromatographie (fast performance liquid chromatography, FPLC) erfolgen.

3.7.3.1. Anionen-Austauschchromatographie mittels Q-Sepharose HP (QSHP)

Zur Trennung der Membranproteine mittels QSHP wurden diese zunächst mit 2 mg CHAPS pro mg Protein solubilisiert. Die Gesamtaktivität der 1-Carbobenzoxymethyl-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Aktivität im Rohextrakt lag bei 8,4 U. Nach

dem Solubilisieren wurde eine Gesamtaktivität von 5,7 U errechnet, so dass die Effizienz dieser Solubilisation der Bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Aktivität 68 % betrug. Wie bei der Solubilisation beschrieben (s. 2.10.4.), wurde das Solubilisat 30 min bei 120000 x g abzentrifugiert um große, nicht solubilisierete Partikel zu sedimentieren. Der CHAPS-Überstand, wurde auf die nach Anleitung des Herstellers mit QSHP gepackte XK-16-Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) gepumpt, die zuvor mit 10 Säulenvolumen Puffer äquilibriert worden war. XK-16-FPLC-Säulen zeichnen sich durch ihren Doppelmantel aus, der eine permanente Kühlung während des Säulenlaufs ermöglichte. Das Bettvolumen des QSHP-Materials betrug 20 ml, die Flussrate wurde auf 1,5 ml/min gestellt. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen 1 M NaCl-Gradienten. Dieser Salzgradient führte zu einer Elution der Proteine in Abhängigkeit ihrer negativen Oberflächenladung, und somit ihrer Interaktionsstärke mit dem Säulenmaterial. Ein geringerer Anstieg von 0 bis 0,6 M NaCl in 10 Säulenvolumen diente der Elution schwächer gebundener Proteine, ein steilerer Gradient von 0,6 auf 1 M NaCl in einem Säulenvolumen zum Eluieren der stark an das Material gebundenen Proteine. Die unterschiedlichen Cl⁻-Konzentrationen ließen Proteine also zu verschiedenen Zeitpunkten eluieren. Dieses Eluat wurde fraktioniert in Reagenzgläsern gesammelt. Die Fraktionsgröße zum Auffangen des Durchlaufs betrug 10 ml, das eigentliche Eluat wurde in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Das Elutionsprofil der Proteinfractionierung an QSHP ist in Abb. 28 gezeigt. Aus dieser Abbildung wurde deutlich, dass ein Großteil der solubilisierten Proteine nicht an das Q-Sepharose HP-Material gebunden hatte, sondern es bereits beim Waschen mit Solubilisationspuffer die Säule im sog. Durchlauf verließ. In diesem Durchlauf befand sich auch sehr viel vom Piperidin-Derivat oxidierenden Protein. Wie sich herausstellte hatten nur etwa 18 % dieses Proteins an das Säulenmaterial gebunden, was einer Gesamtaktivität im Eluat von 1,04 U entspricht. Diese konnten im steigenden NaCl-Gradienten bei einer Leitfähigkeit von etwa 38 mS/cm eluiert werden. Der grau dargestellte Pfeil in Abb. 28 deutet auf die Fraktionen 30 bis 32, in denen die Piperidin-Derivat oxidierende Aktivität lokalisiert werden konnte. Lag die spezifische Aktivität im CHAPS-Überstand noch bei 0,19 U/mg, so wurde im Fraktionspool 30-32 eine spezifische Aktivität von 0,43 U/mg gemessen, was einem Anreicherungsfaktor von 2,3 entsprach.

Abb. 28: Elutionsprofil der Membranprotein-Fraktionierung am Anionenaustauscher Q-Sepharose HP. — λ 280 nm = Proteinabsorption, angegeben in relativen Absorptionseinheiten; ---- NaCl-Gradient. Der Pfeil deutet auf die Fraktionen mit Piperidin-Derivat oxidierender Aktivität (Fraktionen 30-32).

3.7.4. Silberfärbung des QSHP-Eluats mit Piperidin-Derivat oxidierender Aktivität

Wie im Abschnitt 3.7.3. beschrieben worden ist, war eine deutliche Anreicherung einer 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin-oxidierenden Aktivität am starken Anionenaustauscher Q-Sepharose HP (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) möglich. Die Effizienz der Proteinbindung lag bei 18 % und konnte durch eine Verwendung anderer Chromatographiematerialien wie Kationenaustauscher, hydrophobe Interaktionschromatographie oder verschiedener Affinitätschromatographiematrices nicht gesteigert werden. Weil das interessierende Enzym bei den anderen getesteten Materialien gemeinsam mit den übrigen Proteinen des Solubilisat-Überstandes bereits im Durchlauf von der Säule gewaschen wurde, wies die an QSHP adsorbierte, und durch einen NaCl-Gradienten eluierte Piperidin-Derivat oxidierende Dehydrogenase auch die höchste Reinheit auf. Dies verdeutlicht das in Abb. 29. dargestellte Foto eines 14 %igen SDS-Polyacrylamidgels.

Abb. 29: Silberfärbung eines 14 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels nach Anreicherung der Piperidin-Derivat oxidierenden Dehydrogenase.

Die molekularen Massen der Standardproteine, angegeben in kDa, stehen links vom Gel; jene der prominenten Banden des angereicherten Enzyms rechts davon. Folgende Proben waren aufgetragen:

Spur 1: LMW Protein-Größenstandard

Spur 2: Fraktionen 30 – 32 (Eluat bei ~38 mS/cm)

Spur 3: Gereinigtes Rohextrakt

Anhand des in Abb. 29 gezeigten Polyacrylamidgels wurde deutlich, dass der Großteil der noch im von großen Zelltrümmern des Aufschlusses befreitem (gereinigten) Rohextrakt vorhandenen Proteine (vgl. Spur 3) abgetrennt werden konnte. In Spur 2 wurde der Fraktionspool 30 – 32 mit einer Proteinmenge von 5 µg Protein aufgetragen. Diese Proteine eluierten durch einen NaCl-Gradienten von der QSHP-Säule im Bereich der Leitfähigkeit von 38 mS/cm (vgl. Abb. 28). Die Proteine wurden mit der sehr sensitiven Silberfärbung (BLUM *et al.*, 1987; mod.) sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze für Proteine ist nach Anfärben mit dem Standardprotokoll von MERRIL (1981) mit etwa 5 ng pro Bande angegeben (REHM, 2000). Während in Spur 3, in der eine Probe des gereinigten Rohextraktes aufgetragen war, noch eine Vielzahl von Proteinen angefärbt wurde, ist im direkten Vergleich dazu ein starker

Aufreinigungseffekt in Spur 2 zu erkennen. In dieser Spur befand sich, wie erwähnt, der Fraktionspool (Fraktionen 30-32) des Q-Sepharose HP-Eluats. Hier dominierten drei prominente Banden, deren molekulare Massen näherungsweise aus der Auftragung ihrer Wanderungsstrecke im Gel (in cm) gegen die Wanderungsstrecke der Markerproteine mit bekannten molekularen Massen bestimmt wurden. Dieser Auftragung konnte entnommen werden, dass die Proteine der prominenten Banden molekulare Massen im Bereich von 74 kDa, 58 kDa und 46 kDa aufwiesen (vgl. Abb. 29). Ein Vergleich der hier ermittelten molekularen Massen der silbergefärbten Proteine mit jenen von Untereinheiten charakterisierter Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien führte zu der Vermutung, es könne sich bei dem angereinigten Piperidin-Derivat oxidierenden Enzym um eine membrangebundene Alkohol-Dehydrogenase handeln. Letztere ist in der Literatur als ein Enzym beschrieben, das aus *G. suboxydans* aufgereinigt wurde und aus drei Untereinheiten der molekularen Massen von 85 kDa, 49 kDa und 14,4 kDa besteht (ADACHI *et al.*, 1978; AMEYAMA und ADACHI, 1982). Zwei der drei Untereinheiten dieses Enzyms lägen also im Bereich ähnlicher Massen. Eine 14,4 kDa große Untereinheit konnte in dieser Arbeit nicht mit aufgereinigt werden. In *Acetobacter polyoxogenes* wurde eine Alkoholdehydrogenase beschrieben, die aus lediglich zwei Untereinheiten besteht. Ihr fehlt die mit 14,4 kDa angegebene Untereinheit III (TAYAMA *et al.*, 1989). Statt 148,4 kDa läge die molekulare Masse dann bei 134 kDa. Ein Blick auf das in Abb. 30 dargestellte native Polyacrylamid-Gradientengel (4 – 20 %) zeigt, dass das in dieser Arbeit an QSHP aufgereinigte Enzym eine apparente Masse von etwa 135 kDa aufwies. Insofern stützte auch das native Polyacrylamid-Gel die Überlegung, die angereicherte Aktivität könnte von der Alkoholdehydrogenase herrühren. Ob das isolierte Protein nun aus zwei, oder aber aus drei Untereinheiten besteht, oder ob es sich hierbei überhaupt um eine der genannten Alkoholdehydrogenasen handelt, galt zu klären. Bislang beruhten diese Annahmen lediglich auf einer theoretischen Ableitung von Hinweisen auf die Enzymidentität über den Vergleich der molekularen Massen. Eine Aufklärung der Proteinidentität sollte mit Hilfe einer nano-ESI-Massenspektroskopie erfolgen.

Abb. 30: Silberfärbung eines nativen Polyacrylamid-Gels nach Anreicherung der Piperidin-Derivat oxidierenden Dehydrogenase an QSHP.

Die molekularen Massen der Standardproteine, angegeben in kDa, stehen rechts vom Gel; links davon die Masse der prominenten Banden des angereicherten Enzyms.

- 1) angereicherte Piperidin-Derivat oxidierende Dehydrogenase
- 2) HMW Protein-Größenstandard

3.7.5. Aufklärung der Proteinidentität durch nano-ESI-MS/MS

Anhand von in der Literatur gefundenen Angaben zu molekularen Massen von Untereinheiten charakterisierter Enzyme wurde vermutet, es könne sich bei dem Piperidin-Derivat oxidierenden Protein um eine Alkoholdehydrogenase handeln. Schließlich lagen zwei der drei Untereinheiten des bei etwa 38 mS/cm von der QSHP-Säule (vgl. 3.7.3.1.) eluierenden Proteins (s. Abb. 28) im Bereich der molekularen Massen anderer membrangebundener Alkoholdehydrogenasen (ADACHI *et al.*, 1978; AMEYAMA und ADACHI, 1982). Es sollte nun die Identität der im Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung sichtbar gemachten Proteinuntereinheiten geklärt werden. Ein

Edman-Abbau zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz kam hierfür nicht in Frage. Dazu müsste das Protein völlig gereinigt vorliegen, um im Ergebnis eine korrekte Sequenz zu erhalten. Zudem ist diese Methode sehr langsam. Das sukzessive chemische Entfernen und Analysieren benötigt pro N-terminaler Aminosäure etwa eine Stunde. Mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden ist es hingegen möglich, innerhalb von zwei Stunden tausende von Peptiden in einer einzigen Analyse zu sequenzieren (PENG und GYGI, 2001). Hinzu kommt, dass die Massenspektrometrie sehr sensitiv ist. So können bei der nano-electrospray Massenspektrometrie Proteinmengen im Femtomol-Bereich ausreichend sein (WILM *et al.*, 1996). Bei der Verwendung eines nano-electrospray Massenspektrometers zur Proteinidentifikation in dieser Arbeit wurde zur sicheren Analyse eine Proteinmenge benötigt, wie sie auch zur Silberfärbung notwendig ist (5 – 50 ng) (MANN *et al.*, 2001). Zudem konnten im mit Silber gefärbten Gel sichtbare Banden aus diesem direkt ausgeschnitten und zur nano-ESI MS/MS verwendet werden. In einer Bande durch co-migration vorliegende verschiedene Proteine störten dabei nicht. Nach dem Ausschneiden der Bande aus dem Gel wurde ein tryptischer Verdau nach der Methode von SHEVCHENKO *et al.* (1996) durchgeführt. Daran schloss sich die genannte nano-ESI-Tandem-Massenspektrometrie an. Die dabei analysierten Fragmente wurden mit dem Datensatz des Genomsequenzierungsprojektes (PRUST, 2004) abgeglichen und zugeordnet. Als Resultat ließ sich festhalten, dass ein Protein mit 478 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 51,2 kDa als eine Cytochrom c Untereinheit der Alkohol-Dehydrogenase (ORF-Nummer ERGO 2454) identifiziert wurde. Auch ein GroEL-Chaperon (ERGO-ORF 0545) mit 543 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 57,49 kDa konnte nachgewiesen werden. Hinzu kam ein Protein, bestehend aus 757 Aminosäuren (82,85 kDa), das dem ERGO-ORF 2455 zugeordnet werden konnte. Der ORF 2455 kodiert die große Untereinheit der membrangebundenen, PQQ abhängigen Alkohol-Dehydrogenase. Das Ergebnis der in dieser Arbeit ermittelten Daten und ein Vergleich zur charakterisierten Alkoholdehydrogenase aus *G. suboxydans* (ADACHI *et al.*, 1978; AMEYAMA und ADACHI, 1982) sind zur besseren Übersicht in Tabelle 54 noch einmal zusammengefasst.

Tab. 54: Ergebnisübersicht von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nano-ESI-MS/MS zur Identifikation der Piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität aus *G. oxydans* 621H (diese Arbeit) und Vergleich zur charakterisierten membrangebundenen Alkohol-Dehydrogenase aus *G. suboxydans*.

Molekulare Massen (SDS-Polyacrylamid-Gel)		Molekulare Massen nano-ESI- MS/MS	ORF-Nummer in <i>G. oxydans</i> 621H und Annotation
Alkohol- Dehydrogenase	Piperidin- Dehydrogenase		
85	74	82,84	ORF 2455: große UE der PQQ abh. mADH
-	58	57,49	ORF 0545: GroEL- Chaperon
49	46	51,2	ORF 2454: Cyt. c UE der mADH
14,4	-	-	ORF 2124: 15 kDa UE der mADH

Somit konnte mit Hilfe der nano-ESI-MS/MS die Vermutung bestätigt werden, es könne sich bei den im SDS-Polyacrylamid-Gel angefärbten Proteinbanden um Untereinheiten einer membrangebundenen Alkoholdehydrogenase (mADH) handeln, die in *G. suboxydans* charakterisiert wurde. Eine 14,4 kDa Untereinheit konnte in dieser Arbeit jedoch nicht angereichert werden. Die Summe der molekularen Massen der Untereinheiten der Alkoholdehydrogenase beträgt für das charakterisierte Enzym 148,4 kDa (im SDS-Gel ermittelt), für das in dieser Arbeit aufgereinigte Enzym 120 kDa (SDS-Gel) bzw. 134,04 kDa (nano-ESI-MS/MS). Vergleicht man die Daten mit der aus 2 Untereinheiten bestehenden mADH aus *A. polyoxogenes*, bzw. zieht man von der Gesamtmasse des Enzyms aus *G. suboxydans* die 14,4 kDa der aus *G. oxydans* nicht angereicherten Untereinheit ab, so stimmen die molekularen Massen des charakterisierten Enzyms und der per Massenspektrometrie bestimmten Dehydrogenase sehr gut überein. Der geringe Unterschied der beiden per SDS-Gelelektrophorese ermittelten Massen von 134 kDa zu 120 kDa liegt wahrscheinlich in der relativen Ungenauigkeit der Ableitung von Massen aus dem Laufverhalten von Proteinen im Gel begründet. Abschließend sollte nun die Aktivität der gereinigten Dehydrogenase gegenüber Ethanol als Substrat getestet werden.

3.7.6. Messung einer Ethanol-oxidierenden Aktivität

Aufgrund der bislang gefundenen Ergebnisse der Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie handelt es sich bei der angereicherten 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin-oxidierenden Aktivität um eine membrangebundene Alkoholdehydrogenase. Somit wäre die Piperidin-Derivat-Oxidation als Nebenaktivität dieses Enzyms anzusehen. Darüber, ob das angereinigte Enzym über die Fähigkeit zum Umsatz von Ethanol verfügt, sollte der bereits in vorangegangenen Experimenten beschriebene Enzymtest auf aktive Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976; mod.) Aufschluss geben. Als Substrat wurde in diesem Zusammenhang reiner Ethanol verwendet; das Protein entstammte einem Q-Sepharose HP-Eluat. Der Reaktionsverlauf bei der Oxidation des Alkohols ist in Abb. 31 wiedergegeben (Kurve 1). Zum direkten Vergleich ist der Reaktionsverlauf der Piperidin-Derivat Oxidation (Kurve 2) im gleichen Reaktionsprofil dargestellt.

Abb. 31: Vergleich der Aktivität der angereicherten Alkoholdehydrogenase gegenüber Ethanol (1) und 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin (2).

Der mit (1) gekennzeichnete Reaktionsverlauf beschreibt die Oxidation des Ethanols, der in den Enzymtest als Substrat eingesetzt worden ist. Nach etwa drei Minuten war dieses Substrat vollständig umgesetzt. Durch nochmalige Zugabe von Ethanol startete die Reaktion erneut. Dies zeigt, dass hier das Substrat der limitierende Faktor gewesen war. Alle weiteren Komponenten des Tests lagen in ausreichender Konzentration vor, um die Reaktion wiederholt ablaufen lassen zu können. Die spezifische Aktivität des Enzyms gegenüber dem Ethanol lag bei 1,23 U/mg. Damit lag sie etwa dreimal höher

als die spezifische Aktivität gegenüber dem Piperidinderivat (vgl. Abb. 31, Kurve 2). Diese wurde mit 0,45 U/mg gemessen. Diese Messungen bestärkten die Überlegung, die Piperidin-Derivat Oxidation sei eine Nebenaktivität der bekannten membrangebundenen Alkohol-Dehydrogenase.

3.7.7. Zusammenfassung der Untersuchung einer Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität

Zunächst konnte für *Gluconobacter oxydans* 621H festgestellt werden, dass dieser Stamm zur Oxidation des Piperidin-Derivats 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin in der Lage ist. Piperidin-Derivate könnten eine wertvolle Basis für eine Partialsynthese bei der Herstellung von Alkaloidanaloga darstellen, die medizinische Relevanz besitzen. Die höchste Aktivität des Enzyms konnte im pH-Bereich von 6 bis 6,5 gemessen werden. Bei der Aufreinigung des Enzyms wurde mit dem starken Anionenaustauscher Q-Sepharose HP der größte Erfolg erzielt. Das im NaCl-Gradienten eluierte Protein mit Bis-(hydroxymethyl)-Piperidin oxidierender Aktivität zeigte nach Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels drei prominente Banden. Zwei der drei Banden wiesen ähnliche molekulare Massen auf wie eine in der Literatur beschriebene membrangebundene Alkoholdehydrogenase. Durch nano-ESI-MS/MS konnte mit Hilfe des Genomdatensatzes von *G. oxydans* 621H die Identität dieser Banden bestimmt werden. Demnach gehörten tatsächlich zwei der drei Banden zu der genannten Alkoholdehydrogenase. Die dritte Bande beruhte auf einem co-eluierten Protein, das als GroEL-Chaperonin erkannt wurde. Eine Überprüfung im nativen Polyacrylamidgel bestätigte die angenommene molekulare Masse von etwa 140 kDa eines aus zwei Untereinheiten zusammengesetzten Enzyms. Nach den erhaltenen Hinweisen auf die Aufreinigung einer membrangebundenen Alkoholdehydrogenase wurde dessen Funktion durch den enzymatischen Test auf aktive Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976; mod.) überprüft. Hierbei wurde die Oxidation von Ethanol bestätigt, was die zuvor gesammelten Befunde weiter unterstützte. Die Alkoholorxidation verlief etwa dreimal schneller als die Oxidation des Piperidin-Derivats. Das ließ darauf schließen, dass die Piperidin-Derivat Oxidation eine Nebenaktivität der Alkoholdehydrogenase darstellte. Demnach ist es gelungen, die für die Oxidation des Piperidin-Derivats verantwortliche Dehydrogenase zu identifizieren.

Zusammen mit den in den Transkriptionsanalyse-Experimenten ermittelten Daten könnten hiermit interessante Eckpunkte für eine mögliche Anwendung in der regio- und stereoselektiven Oxidation von Piperidinderivaten für weitere Produktionsprozesse generiert worden sein. Dabei bleibt festzuhalten, dass der von KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000) untersuchte Stamm 2003 eine deutlich höhere spezifische Aktivität gegenüber Piperidinderivaten aufwies. Zudem stünde in weiteren Experimenten eine genaue Produktanalyse aus, in denen eine Oxidation der mehrfach vorhandenen Hydroxygruppen zum korrespondierenden Aldehyd, zum Keton oder zur Carboxylsäure nachgewiesen wird.

Zum Abschluss soll nun noch die Piperidin-Derivat oxidierende Dehydrogenase im Hinblick auf die Transkription ihrer Untereinheiten betrachtet werden. Als Grundlage für die in Tabelle 55 präsentierten Daten dienen die Gesamtgenom-Microarray-Experimente, die mit Chemostat-gewachsenen Kulturen durchgeführt wurden. Im Genom fanden sich die Untereinheiten der in der Literatur (s.o.) beschriebenen drei-Komponenten Alkohol-Dehydrogenase mit den ERGO-ORF-Nummern 2124 (15 kDa Untereinheit), 2454 (Cytochrom c Untereinheit) und 2455 (große, membrangebundene Untereinheit). Unter allen hier betrachteten Bedingungen wurden diese drei ORFs transkribiert. Dabei zeigte das Microarray keine signifikante Regulation beim Vergleich der verschiedenen Anzuchtbedingungen.

Tab. 55: Microarray-Analyse von ORFs, die für Untereinheiten der Piperidin-Derivat oxidierenden Alkoholdehydrogenase kodieren. Die Tabelle enthält die Daten der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Chemostat-Experimente.

Testbedingung	ERGO 2124	ERGO 2454	ERGO 2455
Glucose/Mannitol	1,05	1,07	1,07
Glucose/Sorbitol	0,89	0,88	0,96
pH 5,5 / 3,5	0,79	0,65	0,70
Wachstumsrate 0,26 / 0,16	1,08	0,88	1,03
Wachstumsrate 0,26 / 0,05	0,80	0,89	0,88
pO ₂ 80 % / 2 %	0,96	0,86	1,18

Das vorliegende Ergebnis einer zusammen mit vielen anderen Dehydrogenasen / Reduktasen erfolgenden Transkription der hier aufgereinigten Bis-hydroxymethyl-Piperidin-Derivat oxidierenden Dehydrogenase wurde auch durch die in Kapitel 3.5.

beschriebene unabhängige Methode der quantitativen *real-time* RT PCR bestätigt. Diese für biotechnologische Anwendungen wichtige Erkenntnis der unter verschiedenen Bedingungen konstitutiv transkribierten Enzyme wird auch Gegenstand der sich anschließenden Diskussion sein.

4. Diskussion

4.1. Allgemeine Eigenschaften von *G. oxydans* 621H

Das Gram-negative Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* wird bereits seit geraumer Zeit biotechnologisch zur Produktion verschiedener Substanzen, wie z.B. Dihydroxyaceton, Gluconat oder Ketogluconaten eingesetzt (DEPPENMEIER *et al.*, 2002). Über einen langen Zeitraum wurden immer wieder neue Enzyme zur Oxidation verschiedener Substrate in *Gluconobacter* entdeckt. Dazu gehören beispielsweise allein drei membrangebundene D-Sorbitol-Dehydrogenasen (HOSHINO *et al.*, 2003), die membrangebundene Glycerol-Dehydrogenase (AMEYAMA *et al.*, 1985), die membrangebundene D-Arabitol-Dehydrogenase (ADACHI *et al.*, 2001) oder die im Cytoplasma lokalisierte NADP-abhängige Mannitol-Dehydrogenase (ADACHI *et al.*, 1999). Vermutet wurde deshalb, dass das Oxidationspotential dieses Organismus deutlich höher sei als bislang bekannt. Dies war ein Grund dafür, dass von der Gruppe um Prof. Deppenmeier das Genom von *G. oxydans* 621H sequenziert wurde (PRUST, 2005). Wie das stark an zuckerreiche Habitate angepasste α -Proteobakterium *Zymomonas mobilis* mit einer Genomgröße von 2,06 Mbp, gehört auch *G. oxydans* zu den Organismen mit einem eher kleinen Genom (2,9 Mbp). Im Vergleich dazu seien z.B. *Escherichia coli* (4,64 Mbp), *Pseudomonas aeruginosa* (6,26 Mbp) oder *Bacillus licheniformis* (4,22 Mbp) genannt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). Dennoch konnte in der Sequenz eine große Anzahl von Dehydrogenasen identifiziert werden. Neben den o.g. charakterisierten Enzymen konnten anhand von Datenbank-Abgleichen der Sequenz insgesamt 2664 proteinkodierende ORFs zugeordnet werden. Dabei wurde auch zu mehr als 70 Genen die Funktion einer uncharakterisierten Dehydrogenase oder Reduktase (PRUST *et al.*, 2005) zugewiesen. Hierunter befanden sich sowohl membrangebundene wie auch cytoplasmatische Enzyme. Bislang war jedoch unbekannt, wie in dem hier untersuchten Organismus die Expression dieser Vielzahl von Enzymen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen reguliert wird. Zur Beantwortung dieser zentralen Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde ein Gesamtgenom-Microarray konstruiert. Von sehr großer Bedeutung bei einem solchen Microarray ist, dass grundsätzlich die Transkriptionsregulation tausender Gene eines Organismus in einem einzigen Experiment untersucht werden kann (HEDGE *et al.*, 2000; BERNSTEIN *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit war es daher möglich,

neben den Oxidoreduktasen auch die bislang unbekannte Regulation des Zentralstoffwechsels oder der Atmungskettenkomponenten zu untersuchen, um nur zwei Beispiele zu nennen. Im folgenden soll aber auch eine Erweiterung des Oxidationspotentials des Stammes 621H diskutiert werden, die eine äußerst interessante Basis für den Einsatz von *Gluconobacter* bei der Wirkstoffpartialsynthese in der Pharmaindustrie darstellen könnte.

4.2. Regulation des Zentralstoffwechsels

Obwohl für *Gluconobacter* gerade die direkte, unvollständige Oxidation unterschiedlicher Substrate, wie z.B. verschiedener Zucker, Alkohole oder Polyole, durch membrangebundene Dehydrogenasen charakteristisch ist (MATSUSHITA *et al.*, 1994), soll hier dennoch mit der Betrachtung des Zentralstoffwechsels und der Regulation der in diesem Organismus vorhandenen Wege begonnen werden.

Wie STOUTHAMER bereits 1959 veröffentlichte, ist eine vollständige Glykolyse in *Gluconobacter* nicht vorhanden. Diese Aussage konnte von PRUST (2004) nach der Sequenzierung nun auch auf genetischer Ebene bestätigt werden. Wie sich dabei herausstellte, fehlte das Gen des Schlüsselenzyms der Glykolyse, der 6-Phosphofructokinase. STOUTHAMER (1959) wies auf einen ebenfalls unvollständigen Zitronensäurezyklus in diesem Organismus hin. GREENFIELD und CLAUS (1972) konnten nachweisen, dass auf enzymatischer Ebene eine Aktivität der Succinat-Dehydrogenase fehlte. Bei der Sequenzierung stellte sich heraus, dass neben dem Gen für die Succinat-Dehydrogenase auch das Gen für die Succinat-Thiokinase im Genom nicht identifiziert werden konnte (PRUST, 2004). Dies deutete darauf hin, dass der Zitronensäurezyklus hier offenbar lediglich der Bereitstellung von Intermediaten für den Anabolismus dient, und eine Kopplung mit der Atmungskette aufgrund der fehlenden Succinat-Dehydrogenase nicht stattfindet.

Nach radiorespiratorischen Untersuchungen durch KITOS *et al.* (1958) wurde der Pentosephosphatweg als der wichtigste Weg des cytoplasmatischen Abbaus von Zuckern und Polyolen zu CO₂ in diesem Organismus angesehen, was bereits nach der Veröffentlichung von HAUGE *et al.* (1954) vermutet worden war. Gleichzeitig wird

hierüber der reduzierte Kofaktor (NADPH) bereitgestellt, der für den Anabolismus benötigt wird. Anhand der vollständigen Genomsequenz konnte ein Vorliegen der Gene aller für den Pentosephosphatweg notwendigen Enzyme festgestellt werden (vgl. Abb. 16). Weitergehende Bedeutung erlangt der Pentosephosphatweg bei der Synthese von Stoffwechsel-Intermediaten. So wird z.B. entstehendes Ribose-5-phosphat zur Histidin-Biosynthese benötigt, das durch die reversiblen Transaldolase/Transketolase-Reaktionen entstehende Erythrose-4-phosphat zur Synthese aromatischer Aminosäuren, und aus dem ebenfalls im Pentosephosphatweg entstehenden Glycerinaldehyd-3-phosphat kann, wie in der Glykolyse, über Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat gelangt werden. Pyruvat dient dann wiederum selbst als Ausgangssubstanz für die Synthese der Aminosäuren Alanin, Leucin und Valin, aber auch für die Pyruvat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion zum Acetyl-CoA.

Neben dem Pentosephosphatweg liegt in *Gluconobacter* auch ein zweiter zentraler Stoffwechselweg vor. Bereits 1955 wurde von KOVACHEVICH und WOOD das Vorliegen der für den 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg (Entner-Doudoroff-Weg) charakteristischen Enzyme Phosphogluconat-Dehydratase und KDPG-Aldolase beschrieben. Die ersten Schritte des KDPG-Weges gleichen denen des Pentosephosphatweges (vgl. Abb. 16 und 17 in Kapitel 3.4.1.2.). Glucose wird zunächst unter ATP-Verbrauch durch die Aktivität der Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Nach der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysierten 6-P-Gluconolacton-Bildung bei gleichzeitiger NADP-Reduktion entsteht im Zuge einer Lactonase-Aktivität 6-Phosphogluconat. Nach SCHLEGEL (1992) ist der KDPG-Weg bei Bakterien weit verbreitet und für die Verwertung von Gluconat von essentieller Bedeutung, welches phosphoryliert in diesen Abbauweg eingeschleust wird. Hierauf folgen die o.g. KDPG-Weg typischen Reaktionen der Phosphogluconat-Dehydratase zum namensgebenden Produkt 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat und dessen Spaltung durch die KDPG-Aldolase in Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Das Glycerinaldehydphosphat wird dann in einer Reaktionsfolge, die den Reaktionen der Glykolyse gleicht, zu Pyruvat oxidiert, wobei zwei ATP und ein NADH₂ entstehen. Die Reaktion der KDPG-Aldolase ist demnach als ein Äquivalent für die nicht vorhandene 6-Phosphofructokinase anzusehen. PRUST (2004) konnte auf Basis der Genomsequenz ein Vorliegen aller an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzyme postulieren.

Es kann also zusammengefasst werden, dass bereits vor Jahrzehnten die enzymatischen Reaktionen des Pentosephosphatweges und des KDPG-Weges nachgewiesen, und das Vorliegen der entsprechenden Gene mit Hilfe der Sequenzierung von *G. oxydans* 621H durch PRUST (2004) bestätigt wurde. Unbekannt blieb jedoch, wie diese zentralen Hexoseabbauwege auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Gesamtgenom-Microarray Experimente mit Chemostat-gewachsenen sowie aus der Schüttelkultur stammenden Zellen durchgeführt. Untersucht wurde dabei unter anderem die Transkriptionsregulation beim Wachstum im Vollmedium auf den Kohlenstoffquellen Mannitol oder Sorbitol im Vergleich zum Wachstum auf Glucose als Referenz (s. Kapitel 3.4.1.). Dabei wurde festgestellt, dass die hier getesteten Kohlenstoffquellen die Regulation der Hexoseabbauwege nicht beeinflussten. Die für diese Wege benötigten Gene wiesen ein Fluoreszenzintensitäts-Verhältnis von etwa 1 auf, was für eine konstitutive Transkription unter den verglichenen Bedingungen spricht. Die hier vorgestellten Regulationswerte (*ratio of medians*) geben lediglich das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Bedingung A zu Bedingung B an, über die Stärke der Transkription sagen sie per se jedoch nichts aus. Allerdings kann als Hinweis auf das tatsächliche Vorliegen einer Transkription gelten, dass in die Auswertung der Microarrays nur jene Daten einbezogen wurden, deren Fluoreszenzsignale bei 635 nm und 532 nm, abzüglich der *background*-Intensitäten, einen Wert größer als null aufwiesen. Um neben dem Verhältnis der Regulation aber auch die Transkription selbst nachzuweisen, wurden exemplarisch für den Vergleich ausgewählter Gene, nach Zellwachstum auf Glucose- oder Mannitol-Vollmedium im Chemostat (s. 3.4.1.), Gesamt-Fluoreszenzintensitäten, auch bezeichnet als Produktintensitäten (QUACKENBUSCH, 2002), berechnet. Dies galt für prominente sowie uncharakterisierte Dehydrogenasen/Reduktasen (s. Kapitel 4.6.), als auch für die Enzyme des hier betrachteten Zentralstoffwechsels (KDPG und Pentosephosphat-Weg). Nach Abzug der Produktintensität der Negativkontrolle der *scorecard* konnte in dieser Arbeit die Transkription der zugehörigen Gene aller bereits bei der Berechnung des Transkriptionsverhältnisses auswertbaren *features* nachgewiesen werden. Die Produktintensitäten ($\log_{10}(\text{rotes Fluoreszenzsignal} * \text{grünes Fluoreszenzsignal})$) lagen für den Pentosephosphat-Weg im Bereich von 0,90 bis 3,52, wobei das arithmetische Mittel einen Wert von 2,14 aufwies. Die Werte für Gene des KDPG-Wegs lagen zwischen 1,15 und 3,36, mit einem arithmetischen Mittel von 2,13. Die arithmetisch

gemittelten Werte der Produktintensitäten beider Stoffwechselwege lagen also sehr dicht beieinander. Insofern konnte hier, neben der deutlichen Transkription, im Zusammenhang mit den Regulationsverhältnissen eine offenbar konstitutive Expression nachgewiesen werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Transkriptionsregulationsverhältnisse unter den anderen in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen, z.B. des Wachstums auf Glucose und Sorbitol im Vergleich, wurde die tatsächliche Transkription auch für die in jenen Experimenten untersuchten Gene angenommen.

Neben der Betrachtung der Transkriptionsregulation im Vergleich von Glucose- und Mannitol-Vollmediumkulturen wurde auch die Transkription nach Wachstum auf Glucose und Sorbitol als C-Quelle im Vollmedium untersucht. Diese Experimente zeigten, dass die berechneten Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisse (*ratio of medians*) dem Ergebnis des Glucose/Mannitol-Experimentes entsprachen. Demnach erfolgte in Abhängigkeit der in dieser Arbeit verwendeten C-Quellen offensichtlich keine Regulation des KDPG- oder Pentosephosphatweges. Dieses Resultat wurde auch durch unabhängig durchgeführte Schüttelkulturen bestätigt, bei denen ebenfalls Glucose als Referenz gegen auf Mannitol oder Sorbitol gewachsene Zellen getestet wurde. Während das Wachstum der Zellen im Chemostat C-Quellen limitiert erfolgte, gelten Schüttelkulturen in der Phase des logarithmischen Wachstums als unlimitiert. Neben der Aussage einer offenbar C-Quellen-unabhängigen Regulation und konstitutiven Expression des KDPG- und Pentosephosphatweges unter Kohlenstofflimitierung konnte anhand der Schüttelkulturen gezeigt werden, dass dieses Resultat auch auf unlimitiertes Wachstum übertragbar war. Dies stand im Gegensatz zur Regulation in *Escherichia coli*, von dem bekannt ist, dass die Glykolyse sowie der Pentosephosphatweg konstitutiv exprimiert werden und als dritter Weg des Zuckerabbaus der induzierbare KDPG-Weg vorliegt (FRAENKEL, 1987). Das anaerob wachsende Gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis* nutzt hingegen lediglich den Entner-Doudoroff-Weg um Zucker wie Glucose, Fructose oder Sucrose zu CO₂ und Ethanol abzubauen. *Zymomonas* gehört zu den wenigen Anaerobiern die den KDPG-Weg nutzen, der hauptsächlich in strikt aeroben Bakterien vorkommt (SWINGS und DE LEY, 1977), zu denen *G. oxydans* gehört. Auch *Zymomonas* ist ein stark an zuckerreiche Substrate angepasster Organismus, der zu *Gluconobacter* einige Gemeinsamkeiten aufweist. Neben dem Vorkommen in sehr

zuckerreichen Habitaten gleichen sich die optimale Wachstumstemperatur von etwa 30 °C, die Säuretoleranz bis pH 3,5, aber auch weitere Eigenschaften des Zentralstoffwechsels. So fehlt auch *Zymomonas* das Schlüsselenzym der Glykolyse, die 6-Phosphofructokinase. Der Zitronensäurezyklus ist in diesem Organismus ebenfalls unterbrochen. Allerdings fehlen hier nicht die Succinat-Thiokinase und die Succinat-Dehydrogenase, wie in *Gluconobacter oxydans* 621H, sondern der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und die Malat-Dehydrogenase (SEO *et al.*, 2005).

Für *Gluconobacter*-Schüttelkulturen ist beschrieben, dass der Kohlenstoff-Fluss durch den Pentosephosphat-Weg vom pH-Wert und der Glucose-Konzentration im Medium abhängt (OLIJE und KOK, 1979a). Demnach waren pH-Werte unterhalb von 3,5 – 4,0 in Minimalmedium dafür verantwortlich, dass der cytoplasmatische Glucoseabbau vollständig inhibiert wurde. In Komplexmedium, das Glucose als C-Quelle enthielt, konnte hingegen ein Wachstum beobachtet werden. Ihre Versuche wiederholten OLIJE und KOK mit kontinuierlich gewachsenen Kulturen, da der Chemostat im Gegensatz zur Schüttelkultur konstante Wachstumsbedingungen erlaubt. Es wurden die Bedingungen pH 2,5 und 5,5 miteinander verglichen, indem die prozentualen Verhältnisse von Gluconat zu Glucose oder Ketogluconat zu Glucose im Medium bestimmt wurden, wodurch auf den Kohlenstoffeinbau in die Biomasse geschlossen werden konnte. Beim pH-Wert von 2,5 und einer Verdünnungsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ konnten 101,4 % des als C-Quelle eingesetzten Kohlenstoffs im Medium nachgewiesen werden, bei einem pH-Wert von 5,5 jedoch nur 21,5 % (OLIJE und KOK, 1979b). Ein Wachstum auf Hefeextrakt ohne zusätzliche C-Quelle war nicht möglich, was den Schluss zulässt, dass Glucose bei pH 2,5 lediglich als Elektronenquelle, nicht jedoch als Substrat für den Anabolismus dient.

Ein Abschalten des Pentosephosphatweges bei einem tiefen pH-Wert wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der DNA-Microarray Transkriptionsanalyse untersucht. Allerdings gelang eine RNA-Präparation aus Zellen, die bei einem so tiefen pH-Wert gewachsen waren, nicht. Wurde die automatische pH-Regulation des Chemostats abgeschaltet, so stellte sich der pH-Wert der Kultur auf etwa 3,5 ein, was auf den Umsatz der Glucose zur Zucker- bzw. Keto-Zuckersäure Gluconat bzw. Ketogluconat zurückgeführt werden kann. Mit RNA, die aus bei pH 3,5 mit 50 mM Glucose in Vollmedium gewachsenen Zellen präpariert wurde, gelangen die

Hybridisierungsexperimente. Als Referenz diente, wie in der Veröffentlichung von OLIJVE und KOK (1979b), RNA einer Kultur, die bei pH 5,5 gewachsen war. Ein Abschalten der Gene des Pentosephosphatweges bei pH 3,5 konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch eine Regulation, die die Transkription des Pentosephosphat- oder KDPG-Weges verändert, wurde nicht detektiert. Die Gene beider Wege wurden unter den getesteten Bedingungen im gleichen Maße transkribiert. Da die Experimente von OLIJVE und KOK (1979b) bei pH 2,5 durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass ein für diese Bedingungen optimiertes Protokoll der RNA-Präparation zu Microarray-Daten führen könnte, die ihren Befund bestätigen würden. Darüber hinaus wäre aber auch denkbar, dass hier eine Regulation auf anderer Ebene stattfindet.

Beim Vergleich von Kulturen die bei pO_2 -Werten von 80% oder 2% des im Medium gelösten Luftsauerstoffanteils wuchsen, zeigte sich in der Transkriptionsanalyse das selbe Bild wie bereits zuvor für den Wechsel der C-Quellen oder für die Veränderung des pH-Wertes. Die Gene des KDPG- oder des Pentosephosphatweges wurden erneut konstitutiv transkribiert.

Auch ein Einfluss der Wachstumsrate auf die Transkription der Wege des zentralen Kohlenstoffmetabolismus erfolgte nicht. Dennoch wurde von OLIJVE und KOK (1979b) beobachtet, dass etwa 50 % des ins Medium eingetragenen Kohlenstoffs bei einer Verdünnungsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ zu CO_2 umgesetzt werden, während es bei einer Verdünnungsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ lediglich 1,3 % waren. Daher wurde an dieser Stelle vermutet, dass der von OLIJVE und KOK (1979b) beobachtete Effekt unterschiedlicher Wachstumsraten auf den Pentosephosphatweg eher auf enzymatischer Ebene denn auf transkriptioneller Ebene zu suchen wäre.

Vor dem Hintergrund der Bedeutung des Pentosephosphatweges für die Bereitstellung von Intermediaten des Anabolismus im ansonsten im Zentralstoffwechsel eingeschränkten *G. oxydans* ist fraglich, inwieweit eine nicht-konstitutive Expression dieses Weges für ein wachsendes Bakterium überhaupt denkbar wäre (vgl. Abb. 32).

Abb. 32: Bedeutung von Intermediaten des Pentosephosphatweges bei der Bereitstellung von Molekülen für Biosynthesen.

Abkürzungen: arom. = aromatisch; As = Aminosäure; -P = Phosphat

Der oben gezeigten Abb. 32 ist zu entnehmen, dass das im Zentralstoffwechsel entstehende Glycerinaldehyd-3-Phosphat sowie das Dihydroxyaceton-Phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat umgesetzt werden kann. Der Weg der Gluconeogenese ist von entscheidender Bedeutung für die Synthese von z.B. Aminosuktern. *G. oxydans* 621H verfügt über zwei ORFs für Fructosebisphosphat-Aldolasen (0136 und 2146). Datenbankabgleiche zeigten, dass der ORF 0136 eine hohe Homologie zu einer Typ I-Aldolase aufweist, der ORF 2146 hingegen zu einer Aldolase des Typs II. Typ I-

Enzyme kommen vorwiegend in Tieren und Pflanzen vor, während Typ II-Aldolasen zumeist in Pilzen oder Bakterien vorliegen. Die Enzyme dieser zwei Klassen unterscheiden sich in ihrem Reaktionsmechanismus der Aldolkondensation. Typ I-Aldolasen bilden dazu ein Schiff'sches Basenintermediat im aktiven Zentrum mit dem Donor-Substrat, welches dann auf den Akzeptor übertragen wird. Typ II-Aldolasen verwenden einen Zn^{2+} Kofaktor der im aktiven Zentrum als Lewis-Säure dient (TAKAYAMA *et al.*, 1997).

Die Expression der im Genom von *G. oxydans* 621H vorkommenden Fructosebisphosphat-Aldolasen konnte mit Hilfe von Transkriptionsanalysen und ersten biochemischen Messungen gezeigt werden. Dabei wurde ersichtlich, dass diese Enzyme nicht nur Fructose-1,6-bisphosphat, sondern auch Glucose-1-Phosphat und Glucose-6-Phosphat als Substrate akzeptieren. Hier bleibt jedoch einschränkend zu sagen, dass weitere Untersuchungen nötig sind, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch andere Enzyme in der Cytoplasmafraktion an der gemessenen Aktivität des Substratumsatzes beteiligt sein könnten.

4.3. Einfluss der Wachstumsrate auf eine Ausbildung intracytoplasmatischer Membranen

Von OLIVÉ und KOK (1979b) wurde beschrieben, dass *Gluconobacter*-Zellen, die im Chemostat Glucose-limitiert gewachsen waren, die geringe Affinität gegenüber Glucose ($K_s = 13 \text{ mM}$, OLIVÉ und KOK, 1979a) durch die Synthese einer großen Zahl von Glucose-oxidierenden Enzymen kompensieren. Dies wurde von ihnen für Bedingungen beobachtet, unter denen die extrazelluläre Glucosekonzentration gering war. Von CLAUS *et al.* wurde bereits 1975 beschrieben, dass *G. oxydans*-Zellen am Übergang zur stationären Phase beginnen, sich zu differenzieren. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Dünnschnitten wurden in den polaren Regionen dieser Zellen Ansammlungen intracytoplasmatischer Membranen und Ribosomen gefunden. Nach der Präparation von Membranen aus auf 5 % Glycerolgewachsenen Zellen der stationären Phase wurde eine 100fach erhöhte Aktivität des Glycerol-Umsatzes gemessen. Sie führten dies auf eine fortgesetzte Cytoplasmamembran-Synthese am Ende der aktiven Zellteilung zurück. Bereits im Jahre 1973 zeigten BATZING und CLAUS, dass die polare Akkumulation von

Ribosomen und Membranmaterial umso stärker auftrat, je länger die Zellen in der stationären Phase waren. Sie schrieben ferner, dass sie diese Beobachtung bei Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase nur selten machen konnten. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass einige bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ im Chemostat gewachsene *G. oxydans*-Zellen ihre Morphologie ändern. Ausgehend von ellipsoidalen Zellen bildeten sich langgestreckte Zellen aus. Nach Hinweisen aus den o.g. Literaturquellen wurden daher Zellen in Lowicryl-Harz eingebettet und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet (s. 2.15.). Im Ultradünnschnitt konnten starke Hinweise auf intracytoplasmatische Membranen gefunden werden. In Übereinstimmung mit CLAUS *et al.* (1975) wurden keine morphologisch veränderten, intracytoplasmatische Membranen enthaltenden Zellen bei einer Verdünnungsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ gefunden.

Dieser auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen basierende Befund könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass, wie die fortgesetzte Synthese von Cytoplasmamembranmaterial, auch die Transkription der Gene für z.B. die in dieser Arbeit untersuchten Dehydrogenasen/Reduktasen nicht wachstumsratenabhängig reguliert wird, wie dies die mittels Microarray (s. 4.5.) erhaltenen Daten ebenfalls zeigten. Die Betrachtung der Regulation von Genen ribosomaler Proteine führte zu der Erkenntnis einer lediglich etwa zweifach erhöhten Transkription bei Wachstum mit einer Wachstumsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$ gegenüber einer Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$. Eine fortgesetzte Synthese von Ribosomen in der stationären Phase, wie von BATZING und CLAUS 1973 beschrieben, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, scheint aber aufgrund der übereinstimmenden Beobachtungen möglich. Offenbar liegt die Verdünnungsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$ im Bereich einer beginnenden Zelldifferenzierung. Wie für den Umsatz von Glycerol (CLAUS *et al.*, 1975), so wäre es auch für den biotechnologischen Umsatz eines Substrats an membrangebundenen Enzymen interessant zu untersuchen, ob dieser aufgrund einer fortgesetzten Synthese von Membranmaterial, Ribosomen und Enzymen in der stationären Phase möglicherweise zu steigern ist.

4.4. Betrachtung der Transkriptionsregulation von Komponenten des Energiestoffwechsels und der Kofaktor-Biogenese

Nach der Betrachtung der Transkription von Genen des KDPG- und Pentosephosphatweges unter verschiedenen Wachstumsbedingungen soll der Fokus nun auf Komponenten des Energiestoffwechsels und der Kofaktor-Biogenese gerichtet werden. Eine Transkription dieser Bestandteile der Zelle ist mitentscheidend für die Effizienz der Energiekonservierung. Um Energie konservieren zu können, muss ein elektrochemisches Membranpotential im Zuge einer Protonentranslokation aufgebaut werden. Nach der Analyse der Genomsequenz wurde deutlich, dass die Möglichkeiten Protonen aus dem Cytoplasma zu pumpen in *G. oxydans* sehr begrenzt sind. Eine NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, die in Mitochondrien den Komplex I der Atmungskette darstellt, fehlt in *G. oxydans* ebenso wie der sog. Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase des Zitronensäurezyklus. Auch eine Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), ebenfalls ein Membranprotein das die Energie des Elektronentransfers und der Sauerstoff-Reduktion nutzt, um Protonen über die Membran zu pumpen (MILLS und FERGUSON-MILLER, 2003), fehlt. Zusammen mit den im nächsten Kapitel diskutierten Dehydrogenasen bilden die in *Gluconobacter* identifizierten terminalen Oxidasen wesentliche Bestandteile der Atmungskette, die eine solche Protonentranslokation über die Membran bewirken können. Die Protonen fließen dann, ihrem Gradienten folgend, über eine ATP-Synthase zurück, wobei Energie in Form von ATP gespeichert wird. Im allgemeinen besitzen aerobe Bakterien verschiedene terminale Oxidasen. Ihre Atmungsketten können zunächst in zwei Klassen unterteilt werden. Die Klasse I besteht aus Cytochrom *c* Oxidasen, die die Elektronen von Ferricytochrom *c* beziehen und molekularen Sauerstoff zu Wasser reduzieren. Die Klasse I kann ferner in zwei Unterklassen geteilt werden. Klasse IA Enzyme enthalten Häm *a* und Cu^{2+} , während Klasse IB Enzyme Häm *b* oder *o* und Cu^{2+} enthalten. Die terminalen Oxidasen der Klasse II werden speziell in Bakterien gefunden. Diese Chinol-Oxidasen erhalten ihre Elektronen von Ubichinol oder Menachinol und transferieren diese ebenfalls auf molekularen Sauerstoff. Häm *a* kommt bei diesen Enzymen nicht vor. Stattdessen werden sie in die Häm *b*, *o* und Cu^{2+} enthaltende Klasse IIA und die Häm *b* und *d* enthaltende Klasse IIB unterteilt (ANRAKU, 1988). Klasse I terminale Oxidasen kommen in ‚Oxidase-positiven‘ Bakterien, wie *Paracoccus*, *Pseudomonas* oder *Azotobacter* vor, während Klasse II

Enzyme in ‚Oxidase-negativen‘ Organismen wie z.B. *E. coli* oder Essigsäurebakterien zu finden sind (MATSUSHITA, *et al.*, 1994). Anhand der von PRUST (2004) analysierten Genomsequenz wurden die Cytochrome *b561*, *c*, *d* und *o* identifiziert.

Im folgenden sollen nun die mit den einzelnen Cytochromen assoziierten Proteine genauer betrachtet werden, wobei mit dem Cytochrom *c* begonnen werden soll. Obwohl in *G. oxydans* ein Cytochrom *c* nachgewiesen wurde, konnte eine terminale Cytochrom *c* Oxidase nicht gefunden werden. Das Fehlen eines solchen Enzyms wurde bereits durch MATSUSHITA *et al.* (1994) beschrieben. Redoxanalysen im Zweistrahlspektrometer deuteten ebenfalls darauf hin, dass das in *G. oxydans* vorliegende Cytochrom *c* nicht einer terminalen Oxidase zugeordnet werden kann, da in diesem Fall ein geringerer prozentualer Anteil an reduziertem Cytochrom *c* erwartet worden wäre. Dennoch wurde eine Reduktion von Cytochrom *c* gemessen (DANIEL, 1970). Ein Blick in die Genomdaten zeigt eine aus drei Untereinheiten bestehende Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase in *G. oxydans* 621H. Nach PRUST (2004) wurde dieses ORF-Cluster (ERGO 1914–1916) eindeutig einem Cytochrom *bc*₁-Komplex zugeordnet. Dies stimmte mit der Aussage von YANG und TRUMPOWER (1988) überein, dass im Gegensatz zu den vielen Untereinheiten des *bc*₁-Komplexes in Mitochondrien, für die Atmung und die Energieweiterleitung lediglich die Cytochrome *b*, *c*₁ und ein RIESKE Eisen-Schwefel-Protein notwendig sind. Dieser Proteinkomplex katalysiert den Elektronentransfer von Ubichinol zum Cytochrom *c* über einen Protonengradienten erzeugenden sog. Q-Zyklus (HUNTE *et al.*, 2003).

Die tiefgestellten Buchstaben n und p kennzeichnen die negative, bzw. positive Seite der Membran. Pro zwei transferierten Protonen werden hierbei also vier Protonen transloziert. Insofern stellt der Q-Zyklus einen sehr bedeutenden Mechanismus zellulärer Energietransduktion dar.

Erstaunlicherweise konnte in dieser Arbeit eine konstitutive Expression der Cytochrom *c*-Typ Reduktase-Untereinheiten (Cytochrom *bc*₁-Komplex) unter allen untersuchten Bedingungen (verschiedene C-Quellen in Chemostat- und Schüttelkultur, verschiedene Wachstumsraten, pH-Werte oder Sauerstoffpartialdrücke) festgestellt

werden. Erstaunlich deshalb, weil, wie oben beschrieben, eine bekannte Cytochrom *c* Oxidase in diesem Organismus nicht vorhanden ist. Welche Funktion das reduzierte Cytochrom *c* in *Gluconobacter* hat, ist bislang nicht bekannt. Von PRUST (2004) wurde spekuliert, dass möglicherweise Cytochrom-abhängige Dehydrogenasen unter bestimmten Umweltbedingungen, wie z.B. bei tiefen pH-Werten oder Substratmangel, reduziertes Cytochrom *c* nutzen, um Säuren wieder in Aldehyde bzw. Alkohole umzuwandeln. Diese angenommene Reaktion veranschaulicht die Abbildung 33.

Abb. 33: Hypothetisches Modell einer möglichen Funktion des Cytochrom *bc*₁-Komplexes (UQH:Cyt *c*-Oxidoreduktase) in *G. oxydans* 621H.

Lässt man ungeklärte energetische Aspekte außer acht, so wäre vorstellbar, dass hierbei Elektronen transloziert würden, was den elektrochemischen Protonengradienten aufrecht erhalten würde. Möglicherweise steht diese Spekulation auch im Einklang mit den Beobachtungen einer fortgesetzten Membran- und Proteinsynthese am Übergang von der logarithmischen Wachstumsphase zur stationären Phase.

Neben der konstitutiven Transkription der Untereinheiten der Cytochrom *c* Reduktase (Cytochrom *bc*₁-Komplex) konnte bei einer Wachstumsrate von $0,26 \cdot \text{h}^{-1}$ eine mehr als 2,5fach erhöhte Transkription von Cytochrom *c*-Typ Biogeneseproteinen gegenüber einer Wachstumsrate von $0,05 \cdot \text{h}^{-1}$ festgestellt werden. Eine Regulation der Transkription dieser Gene im Vergleich der Wachstumsraten von $0,26 \cdot \text{h}^{-1}$ und $0,16 \cdot \text{h}^{-1}$ konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerspricht der zuvor angestellten Spekulation nicht, sofern weiter angenommen werden würde, dass das Cytochrom *c* als Energiespeicher der Zelle dient. Eine energieaufwendige Cytochrom *c*-Biogenese würde nach den in dieser Arbeit ausgewerteten Daten bei

ausreichender Substratverfügbarkeit stattfinden, da hier genügend Protonen zur nachfolgenden ATP-Synthese transloziert werden können. Sinkt jedoch die Wachstumsrate unter einen noch näher zu definierenden Schwellenwert, so wird die energieaufwendige Synthese des Cytochrom *c* eingeschränkt. Da eine pH- oder pO_2 -abhängige Regulation der Cytochrom *c*-Biogeneseproteine nicht zu beobachten war, scheint die Wachstumsrate ein Signal für die Substratverfügbarkeit zu sein. Die verstärkte Transkription von Cytochrom *c*-Biogeneseproteinen bei ausreichend vorhandenem Substrat würde also nach obigem Modell den Zweck erfüllen, für kurze Zeit unter Substratmangel überleben zu können, solange in Reduktionsrichtung arbeitende Enzyme das Membranpotential aufrecht erhalten. Allerdings wäre diese Spekulation noch durch geeignete Experimente zu überprüfen.

Betrachtet man nun die in *G. oxydans* enthaltenen Gene der Cytochrom *d*- bzw. *o*-Typ Ubichinol Oxidase, so fällt folgendes auf: Während die *o*-Typ terminale Oxidase konstitutiv transkribiert wird, erfolgt die Transkription der *d*-Typ-Untereinheiten (ORFs 1563 und 1564) in Abhängigkeit der Wachstumsrate. Wie zuvor für die Untereinheiten der Cytochrom *c*-Biogeneseproteine beschrieben, so führt eine geringe Wachstumsrate von $0,05 \cdot h^{-1}$ auch zu einer verstärkten Transkription der Untereinheiten der Ubichinol:Cytochrom *d*-Oxidoreduktase. Im Vergleich zu *G. oxydans* liegt auch in *E. coli* eine auf Höhe der terminalen Oxidasen einfach verzweigte Atmungskette vor, die ebenfalls aus einer *bd*-Typ und einer *bo₃*-Typ Chinol-Oxidase besteht. Während der Cytochrom *o*-Komplex in *E. coli* bei hohen Sauerstoffkonzentrationen exprimiert wird, liegt der Cytochrom *b*-Komplex bei geringer Belüftung einer Kultur vor (AU *et al.*, 1984). Dies geht damit einher, dass der Cytochrom *bd*-Komplex in *E. coli* eine sehr hohe Sauerstoffaffinität besitzt. Demgegenüber ist die Affinität des *bd*-Komplexes im obligat aeroben, Stickstofffixierenden Bakterium *Azotobacter vinelandii* sehr gering (WU *et al.*, 2000). Unter der oben diskutierten Annahme, dass eine geringe Wachstumsrate in *G. oxydans* ein generelles Signal für sich verschlechternde Wachstumsbedingungen darstellt, könnte aufgrund der verstärkten Transkription des Cytochrom *bd*-Komplexes bei einer Wachstumsrate von $0,05 \cdot h^{-1}$ vermutet werden, dass dieser Komplex, wie in *E. coli*, eine hohe Sauerstoff-Affinität besitzt. Auch hierzu müssten geeignete Experimente durchgeführt werden, die diese Vermutung untersuchen.

Interessanterweise erfolgte eine konstitutive Transkription der Cytochrome *b*, *d* und *o* trotz Variation des im Medium gelösten Luftsauerstoffanteils. In diesem Experiment wurden zwei Kulturen miteinander verglichen, die bei entweder 80 % oder aber bei 2 % pO₂ gewachsen waren. Stattdessen reagierten die Zellen bei verschlechterter Sauerstoffversorgung mit einer verstärkten Expression von Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen. Zeitgleich blieb die Transkription des Pentosephosphat- und KDPG-Wegs, sowie der im nächsten Kapitel beschriebenen Oxidoreduktasen unter beiden Bedingungen konstitutiv. Somit scheint grundsätzlich die Fähigkeit zur Oxidation einer Vielzahl von Substraten in *G. oxydans* bei verschlechterter O₂-Versorgung erhalten zu bleiben, während das Bakterium durch Ausprägung einer Beweglichkeit bestrebt ist, einen sauerstoffreichen Ort aufzusuchen. Da *G. oxydans* ein strikt aerobes Bakterium ist, scheint dies eine Anpassung an die zuckerreichen Habitate zu sein, um sich mit einer hohen respiratorischen Aktivität gegen andere Organismen, wie z.B. Hefen oder den ebenfalls an sehr zuckerreiche Habitate angepassten anaeroben Organismus *Zymomonas mobilis* durchzusetzen. Dazu verfügt *G. oxydans* über eine Vielzahl von Dehydrogenasen, deren Transkription im folgenden Abschnitt diskutiert werden soll.

4.5. Analyse der Transkriptionsregulation von Dehydrogenasen

Der in dieser Arbeit untersuchte Mikroorganismus *Gluconobacter oxydans* 621H gehört zu einer Gruppe von Gram-negativen, strikt aeroben unvollständigen Oxidierern, die seit Jahrzehnten aufgrund ihrer metabolischen Fähigkeiten in der biotechnologischen Industrie eingesetzt werden. Die Grundlage dieser Verwendungsmöglichkeit liegt in der Fähigkeit zur Oxidation einer Vielzahl von Substraten. Generell existieren zum Abbau eines Substrats in *G. oxydans* zwei mögliche Wege (ASAI, 1968, DE LEY *et al.*, 1984). Diese zwei Enzymsysteme unterscheiden sich in ihrer Lokalisierung und Funktion innerhalb der Bakterienzelle (MACAULEY *et al.*, 2001). Zum einen können Gram-negative Bakterien über ein einzigartig entwickeltes periplasmatisches Oxidationssystem verfügen, das an die Atmungskette gekoppelt vorliegt (YAMADA *et al.*, 2003). Diese membrangebundenen Dehydrogenasen von *G. oxydans*, deren aktives Zentrum in den periplasmatischen Raum hineinragt, sind verantwortlich für eine unvollständige

Oxidation verschiedener Substrate. Zu den Substraten gehören z.B. verschiedene Zucker, Polyole, aliphatische oder auch zyklische Alkohole, die direkt, d. h. ohne vorherige Phosphorylierung und Transport in das Cytoplasma, nahezu quantitativ aber unvollständig oxidiert werden (DEPPENMEIER *et al.*, 2002). Die Reaktionsprodukte gelangen dann über Porine der äußeren Membran des Gram-negativen Bakteriums in das umgebende Medium. Die bei der Dehydrogenierungsreaktion durch die membrangebundenen Enzyme freigesetzten Elektronen fließen über den Ubichinonpool in die Atmungskette ein.

Während die membrangebundenen Oxidationsprozesse also der Energiegewinnung dienen, liegt in *G. oxydans* ein zweites Enzymsystem vor, das vermutlich Intermediate für den Anabolismus bereitstellt (KULHANEK, 1989). Hierfür werden verschiedene Substrate, wie z.B. Zucker, Zuckeralkohole oder Zuckersäuren, in die Zelle aufgenommen und von NAD(P)^+ -abhängigen cytoplasmatischen Dehydrogenasen oxidiert. Die phosphorylierten Reaktionsprodukte werden dann in den Pentosephosphat- oder in den KDPG-Weg eingeschleust. In *Gluconobacter* existieren einige cytoplasmatische Dehydrogenasen, die das gleiche Substrat umsetzen wie ein ebenfalls vorhandenes membrangebundenes Enzym. Dazu gehören z.B. die Glucose-Dehydrogenase, die Gluconat-Dehydrogenase oder auch die Sorbitol-Dehydrogenase. Dies verdeutlicht auch die Abb. 15 im Kapitel 3.4.1.1.

Im Abschnitt der Experimente und Ergebnisse dieser Arbeit ist über die interessanterweise konstitutive Transkription einer Vielzahl von prominenten- sowie uncharakterisierten Dehydrogenasen berichtet worden. Dies galt für den Vergleich der Transkriptionen nach Wachstum der Zellen auf den C-Quellen Glucose, Mannitol oder Sorbitol ebenso, wie für das Wachstum bei verschiedenen pH- oder pO_2 -Werten. Auch nach Einstellen unterschiedlicher Wachstumsraten war eine konstitutive Transkription der Mehrzahl von Dehydrogenasen festzustellen. Eine Ausnahme dazu bildete der ORF mit der ERGO-Bezeichnung 0494. Diese uncharakterisierte, den Kofaktor Pyrrolochinolinchinon (PQQ) enthaltende Dehydrogenase wurde auf den Substraten Mannitol und Sorbitol verstärkt transkribiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym bei einem pH-Wert von 5,5 in Glucose-Vollmedium etwa elfmal stärker transkribiert wurde als bei einem pH-Wert von 3,5. Auch der ORF einer weiteren uncharakterisierten, PQQ-haltigen Dehydrogenase (0618) wurde bei pH 5,5 stärker transkribiert als bei pH 3,5. Im Gegensatz dazu erfolgte eine etwa dreimal stärkere Transkription einer putativen Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase (ORF 3589)

bei tieferem pH-Wert des Mediums. Durch exemplarische Berechnung der Gesamt-Fluoreszenzintensitäten für alle hier untersuchten ORFs beim Vergleich des Wachstums der Zellen auf Vollmedium mit Glucose oder Mannitol als C-Quelle wurde überprüft, dass die Berechnung der Regulationswerte auf Daten beruhte, die nach Abzug des Hintergrundsignals und dessen Standardabweichung, sowie abzüglich der Gesamt-Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle größer als Null waren. Die daraus resultierenden Werte des dekadischen Logarithmus der Gesamt-Fluoreszenzintensität gaben somit einen Hinweis darauf, dass die untersuchten ORFs auch tatsächlich transkribiert wurden und nicht fälschlicherweise ein Hintergrundsignal in die Berechnung der Regulationsverhältnisse einbezogen wurde. Die Tatsache, dass es sich bei den regulierten Dehydrogenasen ausschließlich um uncharakterisierte Dehydrogenasen handelt macht deutlich, dass offenbar einiges über den Stoffwechsel dieses Bakteriums noch nicht bekannt ist. Welche Funktion diese Enzyme erfüllen wäre nun zu untersuchen. Das Resultat der hier durchgeführten Transkriptionsanalysen ist daher eine gute Basis für weitergehende Untersuchungen. Vorstellbar wäre z.B., Primer für diese Gene abzuleiten, heterolog zu exprimieren und die überproduzierten Enzyme in aufgereinigter Form zu charakterisieren.

Weil es aufgrund des hohen energetischen Aufwandes einer Zelle zunächst sehr ungewöhnlich schien, dass derart viele Dehydrogenasen konstitutiv transkribiert werden, wurde das Resultat der Transkriptionsanalyse mittels Gesamtgenom-Microarray mit Hilfe einer zweiten Methode überprüft. Eine Auswahl von 24 ORFs von Dehydrogenasen wurde dazu mit der quantitativen *real-time* RT PCR untersucht. Primer dieser Gene wurden zusammen mit Gesamt-RNA aus Zellen die in Schüttelkultur oder auch im Chemostat auf unterschiedlichen C-Quellen gewachsen waren (Glucose, Mannitol, Sorbitol, Arabitol oder Glycerol) in die *real-time* RT PCR eingebracht. Diesen Sachverhalt soll die für Glucose-gewachsene Kulturen angefertigte Abbildung 34 an dieser Stelle noch einmal exemplarisch veranschaulichen.

Abb. 34: Darstellung der Transkription von Dehydrogenase-ORFs bei Wachstum in Vollmedium mit Glucose als C-Quelle. Die auf der Ordinate aufgetragenen C_T-Werte wurden per quantitativer *real-time* RT PCR ermittelt. Jede Säule repräsentiert das arithmetische Mittel von vier Untersuchungen an mindestens zwei unabhängig voneinander gewachsenen Kulturen. Säule 1, 2: PQQ abhängige Alkohol-Dehydrogenase; 3, 4, 5: membrangebundene Acetaldehyd-Dehydrogenase; 6: membrangeb. Lactat-Dehydrogenase; 7: membrangeb. Lactat-Dehydrogenase; 8: membrangeb. Glucose-Dehydrogenase; 9, 10, 11: membrangeb. Gluconat-Dehydrogenase; 12, 13: Glycerol/Sorbitol-Dehydrogenase; 14, 15, 16: Sorbitol-Dehydrogenase; 17: uncharakt. PQQ-abhängige Oxidoreduktase; 18: uncharakt. PQQ-abhängige Oxidoreduktase; 19: uncharakt. PQQ-abhängige Oxidoreduktase; 20: cytoplasmatische Glucose-Dehydrogenase; 21: cytoplasmatische Sorbitol-Dehydrogenase; 22: cytoplasmatische L-Sorbose-Dehydrogenase; 23: cytoplasmatische Acetaldehyd-Dehydrogenase; 24: cytoplasmatische Ethanol-Dehydrogenase; Positivkontrollen: 25: Glutamat-Synthase; 26: RNA-Polymerase; 27: DnaA; 28 – 31: Negativkontrollen

Das Resultat dieser Untersuchung bestätigte die tatsächliche Genexpression einer Vielzahl von Dehydrogenasen *in vivo*, wie es bereits mittels Microarrayanalyse ermittelt worden war. Betrachtet man die Abbildung 34, so fällt im Vergleich zum unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalierenden SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoff (Säulen 28-31) auf, dass alle der hier untersuchten ORFs von Dehydrogenase-Proteinen transkribiert wurden. Der auf der Ordinate angegebene C_T-

Wert ist ein Anhaltspunkt für die Menge an Transkript eines Gens in der zu untersuchenden Probe. Je mehr Transkript in dieser vorlag, desto schneller entstehen im Zuge der hier durchgeführten PCR-Reaktion große Mengen doppelsträngiger cDNA, in die der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert. Der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz einen Schwellenwert übersteigt wird als sogenannter C_T -Wert (*Threshold Cycle*) festgehalten. Die meisten C_T -Werte der hier untersuchten ORFs lagen im Bereich der Positivkontrollen, d.h., laut Microarrayanalyse konstitutiv transkribierter, proteinkodierender Gene (Säulen 25-27). Dies war auch für das Wachstum auf den anderen o.g. C-Quellen der Fall.

Bezüglich des konstitutiven Vorliegens von Dehydrogenasen lässt sich spekulieren, dass es für *G. oxydans* im natürlichen, zuckerreichen Habitat, z.B. eines Blütennektars oder einer Frucht, von Vorteil ist, wenn verschiedene Enzyme mit einer hohen Aktivität zunächst häufig verfügbare Substrate umwandeln. Diese Substrate, wie z.B. Glucose, werden auch von vielen anderen Organismen (z.B. *Zymomonas* oder Hefen) genutzt. Die Fähigkeit zur schnellen Umwandlung verschiedener C-Quellen in z.B. Zuckersäuren oder Zucker-Ketosäuren, die von wenigen anderen Organismen ebenfalls verwertet werden können, scheint hier die Überlebensstrategie des Essigsäurebakteriums zu sein. Gleichzeitig sinkt bei der Umwandlung eines Zuckers in die korrespondierende Zuckersäure der pH-Wert des Habitats ab, was dem säuretoleranten Organismus einen weiteren Vorteil gegenüber weniger pH-resistenten Mikroorganismen verschafft. Zudem würde eine konstitutive Transkription vieler membrangebundener Dehydrogenasen dafür sorgen, dass verschiedene im Habitat vorkommende Substrate zeitgleich oxidiert werden können, ohne dafür den Stoffwechsel immer wieder umstellen zu müssen. Organismen, die ihre Substrate sequentiell umsetzen, gelangen dadurch in einen Nachteil. Da die Energiegewinnung in *G. oxydans* hauptsächlich über die membrangebundenen Enzyme verläuft, und die Cytoplasmamembran daher stark mit Proteinen durchsetzt ist, könnte ein häufiger Austausch von Membranproteinen zudem ein Problem für die Membranintegrität darstellen. Anstatt die Dehydrogenasen auf transkriptioneller Ebene abzuschalten, zeigte die Transkriptionsanalyse mittels Microarray beim Vergleich von 80 % zu 2 % des gelösten Sauerstoffanteils, dass *Gluconobacter* offenbar eher bestrebt ist, durch das Anschalten von Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen bessere Umweltbedingungen aufzusuchen, unter denen eine höhere Atmungsaktivität möglich ist.

Doch nicht nur membrangebundene sondern auch cytoplasmatische Dehydrogenasen wurden konstitutiv transkribiert. Für diese Enzyme, die eine weitaus geringere Aktivität besitzen als ihr membrangebundenes Pendant (PRONK *et al.*, 1989), wird angenommen, dass sie Intermediate für den Anabolismus zur Verfügung stellen.

Neben der Bedeutung einer konstitutiven Dehydrogenasetranskription im natürlichen Habitat, sind die hier präsentierten Ergebnisse auch für biotechnologische Anwendungen von Bedeutung. Denn auch wenn beispielsweise der pH-Wert oder die Substratkonzentration im Medium für die Umsetzung eines Substrats optimiert werden kann, so zeigt bereits ein einfacher Test, ob ein Substratumsatz grundsätzlich mit *G. oxydans* möglich ist oder nicht.

Die Eigenschaft von *Gluconobacter*, viele Substrate im periplasmatischen Raum oxidieren zu können, macht man sich seit geraumer Zeit bei einer Reihe von biotechnologischen Verfahren zu nutze. Im folgenden sollen drei bedeutende Beispiele dafür diskutiert werden.

4.6. Verwendung von *G. oxydans* in der Biotechnologie

In der Regel werden Substrate durch Mikroorganismen vollständig zu CO₂ und Wasser oxidiert. Dies dient der Zelle zur Gewinnung von Energie und Intermediaten für den Anabolismus. *G. oxydans* hingegen oxidiert die Substrate nur unvollständig, was einen Einsatz als Biokatalysator in Produktionsprozessen begünstigt. Dazu verfügt dieser Organismus über eine Vielzahl membrangebundener und löslicher Dehydrogenasen, die den Umsatz eines breiten Substratspektrums ermöglichen. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von *G. oxydans* als Biokatalysator ist eine hohe Stoffwechselaktivität, die auch bei hohen Substratkonzentrationen nicht beeinträchtigt wird (WILLIAMS und RAINBOW, 1964). Dennoch ist die Produktion von Biomasse gering und die im Periplasma entstandenen Reaktionsprodukte gelangen über Porine der äußeren Membran dieses Gram-negativen Organismus in das umgebende Medium (MATSUSHITA *et al.*, 1994), von wo sie leicht aufgereinigt werden können. Ein beachtlicher ökonomischer Vorteil bei der Verwendung von *G. oxydans* liegt auch

darin, dass hier ganze Zellen eingesetzt werden können, was eine Zugabe von Kofaktoren und deren Regenerierung unnötig macht.

4.6.1. Herstellung von Vitamin C

Von sehr großer Bedeutung ist der Einsatz von *G. oxydans* bei der Synthese von Vitamin C. Da der Mensch nicht in der Lage ist, Vitamin C selbst zu synthetisieren, muss er es mit der Nahrung zuführen. Ein Mangel an diesem Vitamin führt zu Skorbut. Im Produktionsverfahren katalysiert *G. oxydans* die Schlüsselreaktion der Oxidation von D-Sorbit zur L-Sorbose in dem bereits 1935 von REICHSTEIN und GRÜSSNER entwickelten Verfahren. Nur das L-Isomer der Ascorbinsäure ist biologisch aktiv. Aus diesem Grund ist die stereoselektive Oxidation durch *Gluconobacter* auch bei der Vitamin C-Herstellung von großer Wichtigkeit. Durch den Einsatz dieses Bakteriums als Biokatalysator kann bei diesem Produktionsschritt eine aufwendige und somit teure Schutzgruppenchemie entfallen. Vitamin C wird in großtechnischem Maßstab hergestellt. Die weltweite Jahresproduktion beläuft sich auf etwa 110.000 t. L-Ascorbinsäure gilt als toxikologisch unbedenklich und wird als Antioxidationsmittel in der Lebensmittelindustrie häufig verwendet (HANCOCK und VIOLA, 2002). Von DE WULF *et al.* wurde über eine optimierte L-Sorbose-Synthese berichtet. Durch Verwendung eines mutagenisierten *G. oxydans*-Stammes konnte bei der regiospezifischen Dehydrogenierung von D-Sorbitol ein maximaler Produktionsertrag von 100 % erreicht werden. Dabei wurden 200 g Sorbitol pro Liter Kultur eingesetzt. In *G. oxydans* liegen verschiedene Isoenzyme zum Umsatz von D-Sorbitol vor. SHINAGAWA *et al.* beschrieben 1982 einen aus drei Komponenten bestehenden, membrangebundenen, Cytochrom *c* abhängigen Flavoproteinkomplex. CHOI *et al.* (1995) berichteten über einen ebenfalls aus drei Komponenten bestehenden Enzymkomplex. Allerdings handelte es sich dabei um ein PQQ-abhängiges Enzym. Auch die von AMEYAMA *et al.* (1985) beschriebene Glycerol-Dehydrogenase kann unter anderem Sorbitol umsetzen. Es wird diskutiert, dass das letztere Enzym identisch mit der Mannitol-Dehydrogenase ist, die für *G. suboxydans* beschrieben worden ist. Doch auch die anderen zwei zuvor beschriebenen Dehydrogenase-Proteinkomplexe sind dazu in der Lage, Mannitol umzusetzen. Dies spiegelt eine offenbar weitere Eigenschaft der Enzyme von *G. oxydans* wider, nämlich

die einer breiten Substratspezifität vieler Dehydrogenasen. HOSHINO *et al.* beschrieben 2003 eine weitere, wahrscheinlich PQQ-abhängige Sorbitol-Dehydrogenase. Daneben liegt in diesem Organismus aber auch eine cytoplasmatische, NADP-abhängige Dehydrogenase vor, die aber vermutlich keine Rolle bei der Produktion von L-Sorbose spielt.

4.6.2. Produktion von Dihydroxyaceton

Als ein zweites Beispiel aus einer Reihe weiterer Verwendungsmöglichkeiten von *G. oxydans* in der Biotechnologie wird hier die Produktion von Dihydroxyaceton kurz vorgestellt. PRUST schreibt 2004, der Jahresumsatz von Selbstbräunungsprodukten liege laut Angaben des Verbandes der Vertriebsfirmen kosmetischer Erzeugnisse (Wiesbaden) bei ca. 25 Millionen Euro. Dihydroxyaceton ist einer der Hauptbestandteile von Selbstbräunern. Es bewirkt eine selektive Oxydation der Aminosäuren Histidin und Tryptophan, wodurch es innerhalb einiger Stunden zu einer Verfärbung der Haut kommt. Diese Reaktion ist jedoch nicht mit dem natürlichen Schutzmechanismus der Haut gegen UV-Strahlung zu vergleichen, bei der es zur verstärkten Ausbildung von Melanin in den Melanocyten und zu einer Verdickung der Hornschicht kommt. Zur Herstellung des Dihydroxyacetons wird mit Hilfe von *G. oxydans* Glycerin umgesetzt (PERLMAN, 1979). Nach CLARET *et al.* (1994) ist dafür die 1985 von AMEYAMA *et al.* beschriebene Glycerin-Dehydrogenase verantwortlich. Als ein großes Problem bei diesem Herstellungsprozess stellte sich eine Feedback-Inhibierung durch das entstehende Dihydroxyaceton heraus, welches eine weitere Produktion dieser Substanz hemmt. Nach OHREM und VOSS (1995) inhibieren hohe Konzentrationen dieses Moleküls die Enzyme des Pentosephosphatweges. CLARET *et al.* fügten 1992 hinzu, dass auch die Glycerin-Dehydrogenase und ein Facilitator-Protein inhibiert werden.

4.6.3. Herstellung des Antidiabetikums Miglitol

Das hier präsentierte Beispiel der Produktion des Antidiabetikums Miglitol wurde nicht nur ausgewählt weil es eine medizinische Relevanz besitzt, sondern auch

deshalb, weil es hier um den Umsatz eines Aminosubstrates geht. Zur Herstellung des Antidiabetikums wird zunächst D-Glucose in einem chemischen Verfahren zu 1-Amino-1-desoxy-D-Sorbitol reduktiv aminiert. Darauf folgt die Schlüsselreaktion der stereo- und regioselektiv mit Hilfe von *G. oxydans* erfolgenden Oxidation zur 6-Amino-6-desoxy-L-Sorbose (SCHEDEL, 2000). Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Sorbitol-Dehydrogenase, die bereits bei der Herstellung des Vitamin C beschrieben worden ist. Miglitol ist das 1-N-Hydroxyethyl-1-desoxynojirimycin Derivat des 1-Desoxynojirimycins (SCOTT und TATTERSALL, 1988). Als solches stellt es ein Polyhydroxypiperidin-Derivat dar, das zur Behandlung des nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus dient (CAMPBELL *et al.*, 2000). Die pharmazeutische Wirkung des Miglitols als Antidiabetikum besteht darin, dass es eine Strukturähnlichkeit und die gleiche Stereochemie wie die D-Glucose besitzt. Deshalb bindet es mit hoher Affinität an α -Glucosidasen des Intestinaltraktes und hemmt diese reversibel-kompetitiv (KYRIELEIS, 1999). 1-Desoxynojirimycin selbst ist die Vorstufe des Miglitols und unterscheidet sich von diesem lediglich durch das Fehlen einer 2-Hydroxyethyl-Gruppe am Stickstoff-Atom. Im Molekül des 1-Desoxynojirimycins ist ein C-Atom durch ein Stickstoff-Atom ausgetauscht. In diesem Herstellungsprozess wird also ein aliphatisches, stickstoffhaltiges Substrat von *G. oxydans* oxidiert. Im nächsten Abschnitt wird beschrieben, ob auch andere stickstoffhaltige Substrate von diesem Organismus umgesetzt werden können.

4.7. Analyse des Oxidationspotentials von *G. oxydans* 621H

Eine Besonderheit von *Gluconobacter oxydans* ist die umfangreiche Ausstattung mit membrangebundenen Dehydrogenasen, die mit ihrem katalytisch aktiven Zentrum in den periplasmatischen Raum hineinragen. Damit ist dieser Organismus in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Substrate umzusetzen (DEPPENMEIER *et al.*, 2002). Neben Zuckern, Zuckeralkoholen oder Zuckersäuren, werden azyklische Polyole und verwandte Substanzen nach der Bertrand-Hudson-Regel oxidiert (Abb. 34). Diese Regel besagt, dass der Substratumsatz regioselektiv erfolgen kann, wenn die zu oxidierende Verbindung über ein D-erythro-Strukturelement verfügt (KERSTERS *et al.*, 1965).

Abb. 34: Oxidation von Substraten mit cis-Anordnung zweier sekundärer Hydroxylgruppen in D-Konfiguration zur benachbarten primären Alkohol-Gruppe nach der Bertrand-Hudson-Regel.

Interessanterweise erfolgt die Oxidation eines racemischen Gemisches von (R,R)- und (S,S)-Cyclohexandiol in Abhängigkeit vom pH-Wert auch stereoselektiv. ADLERCREUTZ beschrieb 1989, dass *Gluconobacter* bei pH 3,5 lediglich das (R,R)-Enantiomer quantitativ zu (R)-2-Hydroxycyclohexanon umsetzt, bei pH 8,0 hingegen das (S,S)-Enantiomer, wobei bei Letzterem nur eine Ausbeute von 25 –30 % erhalten wurde. Diese Experimente stellen das bislang einzige Beispiel für eine Racematspaltung mit Hilfe von *Gluconobacter oxydans* dar, das in der Literatur beschrieben ist. Eine solche Racematspaltung wäre insbesondere für eine Wirkstoffpartialsynthese in der Pharmaindustrie von Interesse. Sind die beiden Stereoisomere einer Wirksubstanz in einem Medikament enthalten, so kann dies fatale Auswirkungen haben, wie es das Beispiel des *Contergans* zeigte. Um das *Contergan* gab es in den frühen 60er Jahren einen großen Arzneimittelskandal. Dieses Präparat enthielt den Wirkstoff Thalidomid (±)-N-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)phthalimid und wurde als Sedativum und Schlafmittel sowie zur Bekämpfung morgendlicher Übelkeit bei Schwangeren eingesetzt. Es kam jedoch nach der Einnahme dieses Medikaments während der Schwangerschaft zu Missbildungen an der Wirbelsäule und den Gliedmaßen von Embryos. Thalidomid, ist ein chirales Phthalimidoglutarimid, welches im Medikament als racemisches Gemisch vorlag. Wie sich herausstellte, besaß lediglich das (R)-Enantiomer eine beruhigende Wirkung, während das (S)-Enantiomer für die teratogene Wirkung verantwortlich war.

Thalidomid enthält ein Piperidyl-Derivat. Für den *G. oxydans* Stamm 2003 wurde bereits von KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000) gezeigt, dass dieser in der Lage ist, neben meso-2,6-Bis(hydroxymethyl)-piperidin-Derivaten auch weitere stickstoff- und

sauerstoffhaltige Heterozyklen umzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob der von PRUST (2004) sequenzierte *G. oxydans*-Stamm 621H ebenfalls ein Oxidationspotential für den Umsatz solcher Substrate aufweist. Allerdings wurden hier lediglich die stickstoffhaltigen Substrate 1-Amino-2,3-propandiol, 2-Amino-1,3-Propandiol und ein 2,6-Bis-(hydroxymethyl)-piperidin-N-carbonsäureester mit Benzylrest getestet. Tatsächlich konnten auch vom Stamm 621H diese drei Substrate umgesetzt werden, wobei aber mit spezifischen Aktivitäten von 0,3 – 0,45 U/mg eine drei- bis vierfach geringere Aktivität im Vergleich zum von KYRIELEIS (1999) und WEIß (2000) verwendeten Stamm 2003 gemessen wurde. Diese Autoren beschrieben bereits, dass das Piperidin-Derivat das erste zyklische Amin sei, das durch *G. oxydans* umgesetzt werden konnte, und dies den Zugang zu einer Reihe von unterschiedlich substituierten und enantiomerenreinen Piperidinen darstellt. Weil Piperidin-Derivate eine wertvolle Basis für eine Partialsynthese von Alkaloidanaloga mit medizinischer Relevanz darstellen könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, das für die Oxidation des 2,6-Bis-(hydroxymethyl)-Piperidinderivats verantwortliche Enzym aufzureinigen und zu charakterisieren.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die 1-Carbobenzoxo-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierende Aktivität ausschließlich in der Membranfraktion von *G. oxydans* 621H lokalisiert ist. Dies bewies erneut den großen Vorteil der mit ihrem aktiven Zentrum in den periplasmatischen Raum hineinragenden Dehydrogenasen in diesem Organismus für potentielle biotechnologische Anwendungen. Ein Transporter zur Aufnahme eines solchen Aminosubstrates liegt vermutlich nicht vor. In der Literatur ist beschrieben, dass Aminosubstrate das Wachstum von *G. oxydans* hemmen können, und eine Umsetzung dann nur mit einer Zellpaste, bestehend aus ruhenden Zellen, erfolgen kann (KINAST und SCHEDEL, 1981). Wie von KYRIELEIS (1999) gezeigt wurde, war ein Wachstum auf dem hier untersuchten Piperidinderivat ebenfalls nicht möglich.

Mit dem Detergenz CHAPS solubilisierte Membranen wiesen im pH-Bereich von 6,0 bis 6,5 die höchste Enzymaktivität der 2,6-bis-(hydroxymethyl)-Piperidin-Derivat-Oxidation auf. Insgesamt war eine solche Enzymaktivität über einen pH-Bereich von 4,0 bis 8,0 nachweisbar, was möglicherweise bei einer potentiellen Racematspaltung, wie oben beschrieben, von Bedeutung wäre.

Wie von HEMMERLING (1995) bei der Aufreinigung der membrangebundenen Gluconat-Dehydrogenase aus *G. oxydans*, so wurde auch in dieser Arbeit bei der Aufreinigung der Bis-(hydroxymethyl)-Piperidin-Derivat oxidierenden Dehydrogenase ein guter Erfolg mit einem Anionenaustauscher erzielt. Allerdings nicht mit dem schwachen Anionenaustauscher DEAE, sondern mit dem starken Austauschermaterial Q-Sepharose HP. In einer mit NaCl eluierten Fraktion mit Bis-(hydroxymethyl)-Piperidin-Derivat oxidierender Aktivität konnten mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung drei prominente Banden der apparenten molekularen Massen von 74, 58 und 46 kDa nachgewiesen werden. Zwei dieser Banden wiesen ähnliche molekulare Massen auf wie eine in der Literatur beschriebene membrangebundene Alkoholdehydrogenase (KONDO und HORINOUCI, 1997). Diese bestand aus einer 72 kDa Dehydrogenase-Untereinheit, einer 44 kDa Cytochrom c-Untereinheit und einem 15 kDa Protein mit bislang unbekannter Funktion. Daraufhin wurde eine nano-ESI-MS/MS durchgeführt, um die Identität der Banden zu bestimmen. Diese Analyse zeigte, dass tatsächlich zwei der drei Banden zu der genannten Alkohol-Dehydrogenase gehörten. Dies waren die Alkohol-Dehydrogenase Untereinheit des Enzyms und die Cytochrom c-Untereinheit. In der dritten Bande des Gels wurde ein offensichtlich co-eluiertes GroEL-Chaperonin identifiziert. Eine von KONDO und HORINOUCI 1997 postulierte dritte Untereinheit dieser membrangebundenen Alkohol-Dehydrogenase, mit einer molekularen Masse von 15 kDa, konnte in dieser Arbeit nicht detektiert werden. In dem Essigsäurebakterium *Acetobacter*, das bei der Herstellung von Essig eine große Rolle spielt, werden zwei Klassen von Alkohol-Dehydrogenasen unterschieden. Zum einen ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Enzym, zum anderen eine aus drei Untereinheiten zusammengesetzte Alkohol-Dehydrogenase. Die aus zwei Untereinheiten bestehende Alkohol-Dehydrogenase wurde für *Acetobacter polyoxogenes* beschrieben (TAYAMA *et al.*, 1989). Diese besteht aus einer 72 – 78 kDa großen Dehydrogenase-Untereinheit und einer 44 – 48 kDa Cytochrom c Untereinheit. Die aus drei Komponenten bestehende Alkohol-Dehydrogenase in *Acetobacter aceti* besitzt noch eine 14,4 bis 20 kDa Untereinheit (MATSUSHITA *et al.*, 1992; TAKEMURA *et al.*, 1993). Der Literatur war zu entnehmen, dass die Gene für die Untereinheiten beider Typen von Alkohol-Dehydrogenasen in *Acetobacter* kloniert wurden. Anschließende Untersuchungen ergaben, dass alle Komponenten der zwei- und drei-Untereinheiten Alkohol-Dehydrogenasen für eine Funktion notwendig

sind (TAMAKI *et al.*, 1991; KONDO *et al.*, 1995). Experimente mit der Alkohol-Dehydrogenase aus *Gluconobacter* zeigten, dass hier sehr wohl eine Funktion nachzuweisen war, wenn das Enzym aus nur zwei Untereinheiten bestand, dass die Aktivität aber deutlich geringer war als im nativen, 3-Untereinheiten-Zustand (MATSUSHITA, 1996). Daraus wurde geschlossen, dass die kleine, 15 kDa-Untereinheit für die Enzymfunktion nicht essentiell ist, dass sie aber vermutlich für eine korrekte Interaktion der zwei größeren Untereinheiten von Bedeutung ist, was einen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes und auf den Elektronentransportweg in dem Proteinkomplex hat (KONDO und HORINOUCI, 1997). Der in dieser Arbeit aufgereinigte Komplex bestand aus der Dehydrogenase- und Cytochrom c-Untereinheit, was neben der nano-ESI MS/MS auch durch eine Überprüfung im nativen Polyacrylamidgel bestätigt wurde. Die apparente molekulare Masse von etwa 135 kDa in diesem Gel entsprach der erwarteten molekularen Masse eines aus diesen zwei Untereinheiten zusammengesetzten Enzyms.

Da nach den bisherigen Ergebnissen offenbar eine bereits charakterisierte membrangebundene Alkohol-Dehydrogenase für den Umsatz des 2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin-Derivats verantwortlich ist, wurde auch der Umsatz des Hauptsubstrates Ethanol durch den enzymatischen Test auf aktive Dehydrogenasen nach SHINAGAWA *et al.* (1976, mod.) überprüft. Hierbei wurde die Oxidation von Ethanol bestätigt, was die zuvor gesammelten Befunde weiter unterstützte. Dabei war die spezifische Aktivität des Enzyms gegenüber Ethanol als Substrat etwa dreimal so hoch wie bei der Oxidation des Piperidin-Derivats. Das ließ darauf schließen, dass die Piperidin-Derivat Oxidation eine Nebenaktivität der Alkohol-Dehydrogenase darstellte. Demnach ist es gelungen, die für die Oxidation des Piperidin-Derivats verantwortliche Dehydrogenase zu identifizieren. Darüber hinaus konnte anhand des in dieser Arbeit konstruierten Gesamtgenom-Microarrays festgestellt werden, dass diese Alkohol-Dehydrogenase unter allen getesteten Bedingungen, also auf verschiedenen C-Quellen, nach C-limitiertem und C-unlimitiertem Wachstum, bei pH 3,5 und 5,5, bei verschiedenen Wachstumsraten und bei verschiedenen pO_2 -Werten, konstitutiv transkribiert wurde. Zudem wurde eine Transkription auch mit der quantitativen *real-time* RT PCR bei Wachstum auf den Substraten Glucose, Mannitol, Sorbitol, Arabitol und Glycerol nachgewiesen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente sind ein Beispiel für die Verknüpfung von Ergebnissen der biochemischen Analyse des Oxidationspotentials von *G. oxydans* 621H gegenüber organisch-chemisch synthetisierten Substraten mit einer auf der Genomsequenz dieses Organismus aufbauenden Gesamtgenom-Microarray-Transkriptionsanalyse. Nach der Anreicherung des 1-Carbobenzoxy-2,6-bis-(hydroxymethyl)-piperidin oxidierenden Enzyms mittels Flüssigchromatographie wurde per nano-ESI MS/MS die Identität der mit der Aktivität korrelierenden Proteine bestimmt. Somit war es möglich, deren Transkriptionsregulation beim Wachstum unter verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu Referenzkulturen zu untersuchen und mit Hilfe einer zweiten Methode, wie der quantitativen *real-time* RT-PCR, zu überprüfen.

Der so erhaltene Befund einer konstitutiven Transkription von Untereinheiten der hier betrachteten Alkohol-Dehydrogenase bietet somit eine interessante Basis für weitergehende Untersuchungen und für eine potentielle Anwendung in der regio- und stereoselektiven Oxidation von Piperidinderivaten in biotechnologischen Produktionsprozessen. In weiteren Experimenten stünde jedoch zunächst eine genaue Produktanalyse aus, in denen eine Oxidation der mehrfach vorhandenen Hydroxygruppen zum korrespondierenden Aldehyd, zum Keton oder zur Carboxylsäure nachgewiesen wird.

Würde diese stereo- und regiospezifische Oxidation nachgewiesen, so wäre ein neuer Weg zur Darstellung von unterschiedlich substituierten, enantiomerenreinen Indolalkaloid-Analoga geschaffen. Diese neuartige Synthese von Indolalkaloiden mit Tacaman-Gerüst (z.B. Tacamonin, Tacamin) könnte die bislang bekannten, vielstufigen Totalsynthesen ersetzen. Tacamonin, bzw. Tacamin, besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zum Vincamin. Dies wiederum ist ein Alkaloid aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide, die bereits zur Behandlung cerebraler Durchblutungsstörungen eingesetzt werden (LOUNASMAA *et al.*, 1994), da sie eine vasodilatorische Wirkung besitzen.

4.8. Ausblick

Insbesondere für die weitere Untersuchung der Transkription einer Vielzahl von Dehydrogenasen wäre es wünschenswert, die Chemostat-Kulturen statt in

Vollmedium in einem chemisch definierten Medium anzuziehen. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass eine konstitutive Transkription dieser Enzyme auf mögliche Induktormoleküle als Bestandteil des Vollmediums zurückzuführen ist. Erste Untersuchungen an Gesamt-RNA aus Zellen, die in einem chemisch definierten Medium mit den C-Quellen Mannitol oder Sorbitol in Schüttelkultur gewachsen waren, zeigten jedoch in der *real-time* RT-PCR das selbe Ergebnis einer weitgehend konstitutiven Transkription von Genen für Dehydrogenasen. Für die Untersuchung Chemostat-gewachsener Zellen würde sich anbieten die Kulturen nun Stickstoff-limitiert anzuziehen, um einen Effekt, z.B. auf Gene der Aminosäurebiosynthese, zu untersuchen. Auch die Variation der Wachstumstemperatur wäre ein sehr interessantes Feld für weitere Untersuchungen. Im Fokus einer solchen Betrachtung könnte beispielsweise die Hitzestress-Antwort in der Zelle sein. Auch die Messung des Kohlenstoff-Flusses im Stoffwechsel von *Gluconobacter* wäre äußerst interessant. Da die Gene vieler Dehydrogenasen offenbar nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert werden, könnte hierdurch erfasst werden, inwieweit die Aktivität der verschiedenen transkribierten Dehydrogenasen in *Gluconobacter* reguliert wird.

5. Zusammenfassung

- (1) Vorausgegangene Arbeiten zur Genomsequenzierung des biotechnologisch sehr bedeutsamen Essigsäurebakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H bildeten die Grundlage für die Konstruktion eines Gesamt-Genom-Microarrays zur Transkriptionsanalyse. In der vorliegenden Arbeit wurden für 94 % aller ORFs PCR-Produkte generiert und auf das Microarray gespottet.
- (2) Zur Transkriptionsanalyse mittels DNA-Microarray wurde RNA zumeist kontinuierlich gewachsener, C-limitierter Chemostat-Kulturen verwendet. Die Untersuchung der Transkription ausgewählter Gene beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Mannitol oder Sorbitol als C-Quelle in Komplexmedium ergab, dass eine Vielzahl prominenter und auch uncharakterisierter Oxidoreduktasen unabhängig von der getesteten C-Quelle konstitutiv exprimiert wurden. Dies galt auch für unlimitiert gewachsene Schüttelkulturen. *Real-time* RT PCR-Experimente bestätigten dieses Ergebnis für 24 ausgewählte Dehydrogenasen, worunter sich auch die in dieser Arbeit angereicherte Piperidin-Derivat oxidierende Alkohol-Dehydrogenase befand.
- (3) Die Auswertung der Fluoreszenzintensität ausgewählter ORFs des Microarrays Chemostat-gewachsener Kulturen (Glucose/Mannitol-Vollmedium) zeigte eine deutliche Transkription der Gene prominenter- und uncharakterisierter Dehydrogenasen sowie des KDPG- und Pentosephosphatwegs.
- (4) Aus der Transkriptionsanalyse konnte geschlossen werden, dass sowohl die Gene des KDPG- wie auch des Pentosephosphatwegs unabhängig von der getesteten C-Quelle gleichzeitig in der Zelle transkribiert wurden. Gleiches galt für Komponenten der Atmungskette und der Kofaktor-Biogenese. Signifikant reguliert wurde hingegen das Gen einer uncharakterisierten PQQ-haltigen Dehydrogenase in Vollmedium, das Mannitol oder Sorbitol als C-Quelle enthielt.
- (5) Ein Vergleich der Transkriptionsregulation beim Zellwachstum bei pH 5,5 gegenüber pH 3,5 führte zu der Erkenntnis, dass die Gene einer Vielzahl von Oxidoreduktasen, aber auch von jenen des KDPG- und Pentosephosphatweges unter diesen Bedingungen konstitutiv exprimiert wurden.

- (6) Beim Wachstum im Chemostat wurde die Transkription von Genen der vielen Oxidoreduktasen, sowie des Pentosephosphat- und des KDPG-Weges nicht in Abhängigkeit von der Wachstumsrate reguliert. Bei geringer Wachstumsrate konnten hingegen Zellen mit veränderter Morphologie beobachtet werden. Angefertigte elektronenmikroskopische Aufnahmen deuteten stark auf das Vorhandensein intracytoplasmatischer Membranen hin.
- (7) Nach Verringerung des pO_2 -Wertes von 80 % auf 2 % des im Medium gelösten Sauerstoffs wurde per Transkriptionsanalyse ein verstärktes Ablesen von Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen beobachtet, was mit einem mikroskopischen Bild schnell beweglicher Zellen übereinstimmte. Die Regulation von Genen der Vielzahl von Oxidoreduktasen, des KDPG- sowie des Pentosephosphatweges blieb hingegen unverändert.
- (8) Enzymatische Messungen zeigten, dass *G. oxydans* 621H die stickstoffhaltigen Substrate 1-Amino-2,3-propandiol, 2-Amino-1,3-propandiol und Carbobenzoxy-2,6-Bis(hydroxymethyl)-piperidin umzusetzen vermag. Letzteres könnte für die Synthese medizinisch relevanter Alkaloid-Analoga von Bedeutung sein.
- (9) Ein mit der Piperidin-Derivat-Oxidation korrelierendes Enzym wurde in der Membranfraktion lokalisiert. Die optimale Aktivität lag im Bereich von pH 6,0 bis 6,5. Nach Anreicherung der Piperidin-Derivat oxidierenden Aktivität wurde mittels nano-ESI-MS/MS die Proteinidentität dreier prominenter Banden eines SDS-Polyacrylamidgels bestimmt. Zwei Banden wurden Untereinheiten einer charakterisierten membrangebundenen, PQQ-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase zugeordnet. Die dritte Bande wurde als GroEL-Chaperon identifiziert. Im nativen Polyacrylamid-Gel wurde eine molekulare Masse von 135 kDa ermittelt.
- (10) Das angereicherte Enzym besaß gegenüber Ethanol als Substrat eine dreifach höhere spezifische Aktivität als gegenüber dem Piperidin-Derivat. Dies ließ den Schluss zu, dass es sich tatsächlich um die beschriebene membrangebundene Alkohol-Dehydrogenase handelt.

Literaturverzeichnis

Adachi, O., Fujii, Y., Ghaly, M. F., Toyama, H., Shinagawa, E., Matsushita, K., 2001: Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2755 – 2762.

Adachi, O., Toyama, H., Matsushita, K., 1999: Crystalline NADP-Dependent D-Mannitol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 402 – 407.

Adlercreutz, P., 1989: Oxidation of *trans*- and *cis*-1,2-cyclohexandiol by *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 257 – 263.

Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., 1985: Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1001 – 1010.

Anraku, Y., 1988: Bacterial Electron Transport Chains. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 101 – 132.

Anthony, C., 1992: The c-type cytochromes of methylotrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1099, 1 – 15.

Anthony, C., Ghosh, M., Blake, C. C. F., 1994: The structure and function of methanol dehydrogenase and related PQQ-containing quinoproteins. *J. Biochem.* 304, 665-674.

Asai, T., 1968: Basal growth medium for *A. suboxydans* (after Schamberger, thesis, Oregon State Univ., Corvallis, 1960). In: *Acetic Acid Bacteria*. Tokyo: University of Tokyo Press, p. 119.

- Au, D. C., Green, G. N., Gennis, R. B.**, 1984: Role of Quinones in the Branch of the *Escherichia coli* Respiratory Chain that Terminates in Cytochrome *o*. J. Bacteriol. 157, 122 – 125.
- Bachmann, B. J.**, 1990: Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. Microbiol. Rev. 54, 130 – 197.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S.**, 1979: Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43, 260 – 296.
- Baldwin, S. A., Perham, R. N.**, 1978: Novel Kinetic and Structural Properties of the Class-I D-Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase from *Escherichia coli* (Crookes' Strain). Biochem. J., 169, 643 – 652.
- Batzing, B. L., Claus, G. W.**, 1972: Fine Structural Changes of *Acetobacter suboxydans* During Growth in a Defined Medium. J. Bact. 113, 1455 – 1461.
- Belly, R. T., Claus, G. W.**, 1972: Effect of amino acids in the growth of *Acetobacter suboxydans*. Arch. Microbiol. 83, 237 – 245.
- Bernstein, J. A., Khodursky, A. B., Lin, P. H., Chao, S. L., Cohen, S. N.**, 2002: Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. Proc. Nat. Acad. Sci.. 99, 9697 – 9702.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.**, 1987: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93 – 99.
- Bradford, M. M.**, 1976: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248 – 254.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.** (eds), 1974: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edition. Baltimore, Williams and Wilkins.

- Buchert, J., Viikari, L.**, 1988: Oxidative D-Xylose metabolism of *G. oxydans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 375 – 379.
- Campbell, L. K., Baker, D. E., Campbell, R. K.**, 2000: Miglitol: assessment of its role in the treatment of patients with diabetes mellitus. Ann. Pharmacother. 34, 1291 – 1301.
- Choi, E. S., Lee, E. H., Rhee, S. K.**, 1995: Purification of a membrane-bound sorbitol-dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. FEMS Microbiol. Lett. 125, 45 – 50.
- Claret, C., Bories, A., Soucaille, P.**, 1992: Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. Curr. Microbiol. 25, 149 – 155.
- Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C., Bories, A.**, 1994: Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 359 – 365.
- Claus, G. W., Batzing, B. L., Baker, C. A., Goebbel, E. M.**, 1975: Intracytoplasmic Membrane Formation and Increased Oxidation of Glycerol During Growth of *Gluconobacter oxydans*. J. Bact. 123, 1169 – 1183.
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Fayet, O., Van de Putte, P.**, 1990: Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. J. Bacteriol. 172, 6308 – 6315.
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Wenzel, T. J., van de Putte, P.**, 1988: Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. J. Bacteriol. 170, 2121 – 2125.
- Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., Sanford, K.**, 2000: The commercial production of chemicals using pathway engineering. Biochim. Biophys. Acta 1543, 434 – 455.

- Daniel, R. M.**, 1970: The electron transport system of *Acetobacter suboxydans* with particular reference to Cytochrome *o*. Biochim. Biophys. Acta. 216, 328 – 341.
- Dax, C., Coinçon, M., Sygusch, J., Blonski, C.**, 2005: Hydroxynaphthaldehyde Phosphate Derivatives as Potent Covalent Schiff Base Inhibitors of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase. Biochem. 44, 5430 – 5443.
- De Beer, R., Duine, J. A., Frank, J., Westerling, J.**, 1983: The role of pyrroloquinoline semiquinone forms in the mechanism of action of methanol dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 130, 105 – 109.
- De Ley, J., Swings, J., Gossele, F.**, 1984: The genus *Gluconobacter*. In: Krieg, N. R. & Holt, J. G. (Ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 267 – 278.
- De Wulf, P., Soetart, W., Vandamme, E. J.**, 2000: Optimized synthesis of L-sorbose by C(5)-dehydrogenation of D-sorbitol with *Gluconobacter oxydans*. Biotechnol. Bioeng. 69, 339 – 343.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C.**, 2002: Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 1513 – 1533.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., Trent, J. M.**, 1996: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nat. Genet. 14, 457 – 460.
- Drysdale, G. S., Fleet, G. H.**, 1988: Acetic acid bacteria in winemaking: a review. Am. J. Enol. Viticulture 39, 143 – 154.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J. M.**, 1999: Expression profiling using cDNA microarrays. Nature Genet. 21, 10 – 14.

- Elias, M. D., Tanaka, M., Sakai, M., Toyama, H., Matsushita, K., Adachi, O., Yamada, M.**, 2001: C-terminal periplasmic domain of *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase transfers electrons to ubiquinone. *J. Biol. Chem.* 276, 48356-48361.
- Fraenkel, D. G.**, 1987: Glycolysis. In: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. 2. Aufl. Vol. 1, 189 – 198.
- Ghosh, M., Anthony, C., Harlos, K., Goodwin, M. G., Blake, C. C. F.**, 1995: The *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.
- Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., Pauwels, P., de Ley, J.**, 1983: Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophorogram of a wide variety of *Acetobacter* strains. Proposals for the improvement of the taxonomy of the genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 338 – 368.
- Greenfield, S., Claus, G. W.**, 1972: Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J. Bacteriol.* 112, 1295 – 1301.
- Greenshields, R. N.**, 1978: Acetic Acid: Vinegar. In: Rose, A. H. (ed.): *Economic Microbiology*, vol. 2. Academic Press, New York, 121 – 186.
- Groen, B. W., Frank, J., Duine, J. A.**, 1984: Quinoprotein alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* 223, 921 – 924.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., Kumar, A.**, 2001: *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 445 – 456.

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

Hancock, R. D., Viola, R., 2005: Improving the Nutritional Value of Crops through Enhancement of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) Content: Rationale and Biotechnological Opportunities. J. Agric. Food Chem. 53, 5248 – 5257.

Hann, R. M., Tilden, E. B., Hudson, C. S., 1938: The Oxidation of Sugar Alcohols by *Acetobacter suboxydans*. 60, 1201 – 1203.

Harden, A., 1911: Alcoholic Fermentation. Longmans, London.

Hauge, J. G., King, T. E., Cheldelin, V. H., 1954: Oxidation of Dihydroxyacetone via the Pentose Cycle in *Acetobacter suboxydans*. J. Biol. Chem. 214, 11 – 26.

Hedge, P., Qi, K., Abernathy, K., Gay, C., Dharab, R., Gaspard, R., Hughes, J. E., Snesrud, E., Lee, N., Quackenbusch, J., 2000: A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis. BioTechniques 29, 548 – 562.

Hemmerling, C., 1995: Isolierung einer membrangebundenen Gluconat-Dehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans* und Untersuchungen zur Induktion. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

Herrmann, U., Merfort, M., Jeude, M., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., 2004: Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 86 – 90.

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. Biochem. Biophys. Acta. 1647, 278 – 288.

Hunte, C., Palsdottir, H., Trumpower, B. L., 2003: Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc₁ complex. FEBS Lett. 545, 39 – 46.

- Keitel, T., Diehl, A., Knaute, T., Stezowski, J. J., Hohne, W., Görisch, H., 2000:** X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity, *J. Mol. Biol.* 297, 961 – 974.
- Kerstens, K., Wood, W. A., De Ley, J., 1965:** Polyol Dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *J. Biol. Chem.* 240, 965 – 974.
- Kinast, G., Schedel, M., 1981:** Vierstufige 1-Desoxynojirimycin-Synthese mit einer Biotransformation als zentralem Reaktionsschritt. *Angew. Chem.* 93, 799 – 800.
- Kitos, P. A., Wang, C. H., Mohler, B. A., King, T. E., Cheldelin, V. H., 1958:** Glucose and Gluconate Dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* 233, 1295 – 1298.
- Kobayashi R., Fang, V. S., 1976:** Studies on cyclic GMP-dependent protein kinase properties by blue dextran-sepharose chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 1080 – 1087.
- Kondo, K., Beppu, T., Horinouchi, S., 1995:** Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding the smallest subunit of the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter pasteurianus*. *J. Bacteriol.* 177, 5048 – 5055.
- Kondo, K., Horinouchi, S., 1997:** Characterization of the Genes Encoding the Three-Component Membrane-Bound Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and Their Expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1131 – 1138.
- Kovachevich, R., Wood, W. A., 1955:** Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. *J. Biol. Chem.* 213, 757 – 767.
- Kulhanek. M., 1989:** Microbial Dehydrogenations of Monosaccharides. *Adv. Appl. Microbiol.* 34, 141 – 182.

Küster, F. W., Thiel, A., 1985: Rechentafeln für die Chemische Analytik. 103. Aufl. Walter de Gruyter. Berlin, New York.

Kyrieleis, O., 1999: Untersuchungen zur selektiven Oxidation ausgewählter Alkohole mit membrangebundenen Dehydrogenasen von *Gluconobacter*-Stämmen. Diplomarbeit, Göttingen.

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

Lamkin, G. E., King, E. E., 1976: Blue Sepharose: a reusable affinity chromatography medium for purification of alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 560 – 565.

Leisinger, T. H., 1965: Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien. *Zentralbl. Bakteriol. II Abt.* 119, 329 – 376.

Lewis, D. J., Lowe, G., 1977: Inhibition of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from Rabbit Muscle and *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 80, 119 – 133.

Lichtenthaler, F. W., 2002: Unsaturated O- and N-heterocycles from carbohydrate feedstocks. *Acc. Chem. Res.* 35, 728 – 737.

Lounasmaa, M., Belle, D. D., Tolvanen, A., 1994: Total synthesis of the indole alkaloid ($\pm$)-tacamine. *Tetrahedron Lett.* 35, 6151 – 6154.

Macauley, S., McNeil, B., Harvey, L. M., 2001: The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 21, 1 – 25.

Mann, M., Hendrickson, R. C., Pandey, A., 2001: Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 437 – 473.

Marmur, J., 1961: Determination of DNA by formamide. *Biochim. Biophys. Acta.* 51, 32 – 36.

Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T., Adachi, O., 2003: 5-Keto-D-Gluconate Production Is Catalyzed by a Quinoprotein Glycerol Dehydrogenase, Major Polyol Dehydrogenase, in *Gluconobacter* Species. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1959 – 1969.

Matsushita, K. Y., Takaki, E., Shinagawa, M., Ameyama, M., Adachi, O., 1992: Ethanol oxydase respiratory chain of acetic acid bacteria: reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenases purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter suboxydans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56, 304 – 310.

Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O., 1994: Respiratory chain and bioenergetics of acetic acid bacteria. Adv. Microb. Physiol. 36, 247 – 301.

Matsushita, K., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O., 2002: Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 13 – 22.

Matsushita, K., Yakushi, T., Toyama, H., Shinagawa, E., Adachi, O., 1996: Function of multiple heme c moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*. J. Biol. Chem. 271, 4850 – 4857.

McNeil, B., Harvey, L., 2005: Energy well spent on a prokaryotic genome. Nat. Biotechnol. 23, 186 – 187.

Merril, C. R., Goldmann, D., Sedman, S. A., Ebert, M. H., 1981: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science, 211, 1437 – 1438.

Mills, D. A., Ferguson-Miller, S., 2003: Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome c oxidase: lessons from other proteins. FEBS Lett. 545, 47 – 51.

Miyazaki, T., Tomiyama, N., Shinjoh, M., Hoshino, T., 2002: Molecular cloning and functional expression of D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 which requires Pyrroloquinoline quinone and hydrophobic protein SldB for the activity development in *E. coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 262 - 270.

Ohrem, H. L., Voß, H., 1995. Inhibitory effects of dihydroxyacetone on *Gluconobacter* cultures. Biotechnol. Lett. 17, 981 – 984.

Okazaki, H., Kanzaki, T., Isono, M., Yoshino, H., Nakanishi, I., Motizuki, K., Nara, K., Sasajima, K., 1966: Method for producing 2-keto-l-gulonic acid. U.S. Pat. 3234105.

Olijve, W., Kok, J. J., 1979a: Analysis of Growth of *Gluconobacter oxydans* in Glucose Containing Media. Arch. Microbiol. 121, 283 – 290.

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

Oubrie, A., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Olsthoorn, A. J. J., Duine, J. A., Dijkstra, B. W., 1999: Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. EMBO J. 18, 5187 - 5194.

Peng, J., Gygi, S. P., 2001: Proteomics: the move to mixtures. J. Mass. Spectrom. 36, 1083 – 1091.

Perlman, D., 1979: Microbial Technology. Pepplars, H. J. and Perlman, D., (Eds) 2nd Ed., Vol. II, Academic Press ISBN: 0-12-551502-2.

Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., Brown, P. O., 1999: Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. Nat. Genet. 23, 41-46.

Pronk, J. T., Levering, P. R., Olijve, W., van Dijken, J. P., 1989: Role of NADP-dependent and Quinoprotein glucose dehydrogenases in Gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microbial Technol.* 11, 160 – 164.

Prust, C., 2004: Entschlüsselung des Genoms von *Gluconobacter oxydans* 621H – einem Bakterium von industriellem Interesse. Doktorarbeit, 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 Biotechnol.* 23, 195 – 200.

Quackenbusch, J., 2002: Microarray data normalization and transformation. *Nature gen.* 32, 496 – 501.

Rehm, H., 2000: Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 3. Aufl., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.

Reichstein, T., Grüssner, A., 1934: Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv. Chim. Acta.* 17, 311 – 328.

Salusjärvi, T., Povelainen, M., Hvorslev, N., Eneyskaya, E. V., Kulminkaya, A. A., Shabalin, K. A., Neustroev, K. N., Kalkkinen, N., Miasnikov, A. N., 2004: Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 306 – 314.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.; Hrsg., 1989: Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schedel, M., 2000: Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, a key reaction in the industrial synthesis of 1-deoxynojirimycin. In: Kelly, D. R. (Ed) *Biotechnology, Vol. 8b. Biotransformations I.* Wiley-VCH, Weinheim, 296 – 308.

- Schlegel, H. G.**, 1992: Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme, Stuttgart, New York. 7. Aufl.
- Schmidt, V.**, 2005: Untersuchungen zur Regulation des Glyoxylatzklus in *Bacillus licheniformis* DSM13. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- Scott, A. R., Tattersall, R. B.**, 1988: Alpha glucosidase inhibition in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 15, 42 – 46.
- Seo, J. S., Chong, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Jung, C., Kim, J. J., Hong, J. H., Kil, J. I., Park, C. J., Oh, H. M., Lee, J. S., Jin, S. J., Um, H. W., Lee, H. J., Oh, S. J., Kim, J. Y., Kang, H. L., Lee, S. Y., Lee, K. J., Kang, H. S.**, 2005: The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature biotech.* 23, 63 – 68.
- Shalon, D., Smith, S. J., Brown, P. O.**, 1996: A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescentprobe hybridization. *Genome Res.* 6, 639 – 645.
- Shena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O.**, 1995: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467 – 470.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M.**, 1996: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68, 850 – 858.
- 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. *Agr. Biol. Chem.* 40, 475 – 483.
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M.**, 1982: Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from Membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. alpha. *Agric. Biol. Chem.* 46, 135 – 141.

- Shinjo, M., Tomiyama, N., Asakura, A., Hoshino, T.**, 1995: Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 413 – 420.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. (ed)**, 1980: Approved Lists of Bacterial Names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 225 – 420.
- Stouthamer, A. H.**, 1959. Oxidative possibilities in the catalase-positive *Acetobacter* species. Antonie van Leeuwenhoek, 26: 241 – 246.
- Swings, J., De Ley, J.**, 1977: The Biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 41, 1 – 46.
- Takayama, S., McGarvey, G. J., Wong, C. H.**, 1997: Microbial Aldolases and Transketolases. New Biocatalytic approaches to simple and complex sugars. Annu. Rev. Microbiol. 51, 285 – 310.
- Takemura, H. K., Kondo, K., Horinouchi, S., Beppu, T.**, 1993: Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. J. Bacteriol. 175, 6857 – 6866.
- Tamaki, T. M., Fukaya, H., Takemura, K., Tayama, H., Okumura, Y., Kawamura, M., Nishiyama, S., Horinouchi, S., Beppu, T.**, 1991: Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol-dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. Biochim. Biophys. Acta. 1088, 292 – 300.
- Tayama, K., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y., Beppu, T.**, 1989: Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov.. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 181 – 185.
- Thompson, S. T., Cass, K. H., Stellwagen, E.**, 1975: Blue dextran-sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 361 – 365.

- Tschech, A., Pfennig, N.**, 1984: Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch. Microbiol. 137, 163 – 167.
- Uhlig, H., Karbaum, K., Steudel, A.**, 1986: *Acetobacter methanolicus* sp. nov., an acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 317 – 322.
- Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komagata, K.**, 1989: *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 50 – 55.
- Veith, B.**, 2004: Genom- und Transkriptionsanalyse von *Bacillus licheniformis* DSM13 – einem Organismus mit großem industriellem Potential. Doktorarbeit, Universität Göttingen.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Basset, D. E. J., Hieter, B., Vogelstein, B., Kinzler, K. W.**, 1997: Characterization of the yeast transcriptome. Cell 88, 243 – 251.
- Weiß, K.**, 2000: Expressionsstudien mit dem verkürzten *gdh*-Gen aus *Gluconobacter oxydans* 621H und Charakterisierung der rekombinanten, modifizierten Glucose Dehydrogenase. Doktorarbeit, Göttingen.
- Wethmar, M., Deckwer, W. D.**, 1999: Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. Biotechnol. Tech. 13, 283 – 287.
- Williams, P. J. B., Rainbow, C.**, 1964: Enzymes of the tricarboxylic acid cycle in acetic acid bacteria. J. Gen. Microbiol. 35, 237 – 247.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M.**, 1996: Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature. 379, 466 – 469.

- Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G., Poole, K., 2000:** Regulation of Cytochrome *bd* Expression in the Obligate Aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). J. Biol. Chem. 275, 4679 – 4686.
- Xia, Z. X., Dai, W. W., Xiong, J. P., Hao, Z. P., Davidson, V. L., White, S., Matthews, F. S., 1992:** The three-dimensional structures of methanol dehydrogenase from two methylotrophic bacteria at 2.61 °Å resolution. J. Biol. Chem. 267, 22289 – 22297.
- Xia, Z. X., Dai, W., Zhang, Y., White, S. A., Boyd, G. D., Matthews, F. S., 1996:** Determination of the gene sequence and the three-dimensional structure at 2 angstrom resolution of methanol dehydrogenase from *Methylophilus* W3A1. J. Mol. Biol. 259, 480 – 501.
- YANG, X., Trumpower, B. L., 1988:** Protonmotive Q Cycle Pathway of Electron Transfer and Energy Transduction in the Three-subunit Ubiquinol-Cytochrome *c* Oxidoreductase Complex of *Paracoccus denitrificans*.
- Yamada, M., Asaoka, S., Saier Jr., M. H., Yamada, Y., 1993:** Characterization of the *gcd* gene from *Escherichia coli* K-12 W3110 and regulation of its expression. J. Bacteriol. 175, 568 – 571.
- Yamada, M., Elias, M. D., Matsushita, K., Migita, C. T., Adachi, O., 2003:** *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. Biochim. Biophys. Acta 1647, 185 – 192.
- 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 generic level. Biosci. Biotech. Biochem. 61, 1244 – 1251.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Wada, M., Chibata, I., 1979:** Fermentative production of dihydroxyacetone by *Gluconobacter suboxydans* ATCC 621. J. Ferment. Technol. 57, 215 – 220.

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. J. Biol. Chem. 268, 12812 – 12817.

Zhi-wei, C., Baruch, P., Mathews, F. S., Matsushita, K., Yamashita, T., Toyama, H., Adachi, O., 1999: Crystallisation and preliminary diffraction studies of two quinoprotein alcohol dehydrogenases (ADHs): a soluble monomeric ADH from *Pseudomonas putida* HK5 (ADH-IIB) and a heterotrimeric membrane-bound ADH from *Gluconobacter suboxydans* (ADH-GS). Acta Crystallogr. D55, 1933 – 1936.

Allgemeine Hinweise zu den Daten des Anhangs:

Im Anhang dieser Dissertation über die ‚Untersuchungen zur Physiologie des Essigsäurebakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H‘ befindet sich eine EXCEL-Tabelle. Diese enthält Informationen aller proteinkodierenden ORFs aus *G. oxydans* 621H. Damit ist eine Übersetzung der in dieser, und in der Arbeit von PRUST (2004) verwendeten ERGO-Bezeichnungen in die ORF-Nummerierung der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) möglich. Beiden Nummerierungen ist die Annotation des entsprechenden ORFs zugeordnet. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den von PRUST (2004) veröffentlichten Daten wurde in dieser Arbeit das Buchstabenkürzel RGOX vor den Ziffern der ORF-Bezeichnung z.T. nicht genannt. Zum Beispiel ist der ORF ‚ERGO 0494‘ identisch mit dem ORF ‚RGOX0494‘ bzw. nach GenBank Nummerierung mit dem ORF ‚GOX1857‘.

Weitere Informationen über die Sequenzen der ORFs des *G. oxydans*-Chromosoms, sowie über die auf den Plasmiden kodierten Gene, sind im Internet über den Link (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=13325) abrufbar.

ORFID	GeneID	function	replikon	start	stop
RGOX1262	GOX0001	Chromosomal replication initiator protein DnaA	chromosome	155	1591
RGOX1263	GOX0002	DNA polymerase III, beta chain (EC 2.7.7.7)	chromosome	1685	2806
RGOX1264	GOX0003	DNA replication and repair protein RecF	chromosome	2823	3923
RGOX1265	GOX0004	DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3)	chromosome	4012	6453
RGOX1266	GOX0005	Hypothetical protein	chromosome	6488	7279
RGOX1267	GOX0006	Bifunctional GlmU prot [Incl.: UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23)]	chromosome	7343	8674
RGOX1268	GOX0007	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	chromosome	8677	10500
RGOX1269	GOX0008	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	10950	13388
RGOX1270	GOX0009	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase (EC 2.5.1.3)	chromosome	13647	14264
RGOX3471	GOX0010	Putative Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	chromosome	14317	16890
RGOX3472	GOX0011	Di-/tripeptide transporter	chromosome	18317	16893
RGOX1275	GOX0012	Hypothetical protein	chromosome	18704	18327
RGOX1276	GOX0013	Hypothetical protein	chromosome	19142	20521
RGOX1277	GOX0014	PhnP protein	chromosome	21430	20636
RGOX1278	GOX0015	Sec-independent protein translocase protein TatD	chromosome	22212	21430
RGOX1279	GOX0016	Methionyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.10)	chromosome	23759	22212
RGOX1280	GOX0017	DNA polymerase III delta prime subunit DnaC (EC 2.7.7.7)	chromosome	24617	23778
RGOX1282	GOX0018	Thymidylate kinase (EC 2.7.4.9)	chromosome	25339	24698
RGOX1284	GOX0019	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (EC 3.4.16.4)	chromosome	26618	25347
RGOX1288	GOX0020	Rare lipoprotein A	chromosome	27463	26618
RGOX1289	GOX0021	Membrane-bound lytic murein transglycosylase	chromosome	28445	27453
RGOX1290	GOX0022	Hypothetical protein	chromosome	28474	30261
RGOX1291	GOX0023	Mce related protein	chromosome	30750	30289
RGOX1292	GOX0024	Putative undecaprenol kinase (EC 2.7.1.66)	chromosome	30934	31773
RGOX3473	GOX0025	Amino acid permease	chromosome	31815	33353
RGOX1294	GOX0026	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	34553	33351
RGOX3574	GOX0028	Hypothetical protein	chromosome	34907	35773
RGOX1297	GOX0029	Hypothetical protein	chromosome	36288	35839
RGOX1298	GOX0030	HemK family protein	chromosome	37407	36562
RGOX1299	GOX0031	Hypothetical protein	chromosome	37435	37902
RGOX1300	GOX0032	Bacterial Peptide Chain Release Factor 1 (RF-1)	chromosome	38970	37912
RGOX1301	GOX0033	Histidyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.21)	chromosome	40222	38978
RGOX1302	GOX0034	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase	chromosome	41367	40225
RGOX1303	GOX0035	Hypothetical protein	chromosome	42730	41462
RGOX1304	GOX0036	Enoyl[acyl-carrier-protein] reductase (EC 1.3.1.9)	chromosome	43788	42748
RGOX1305	GOX0037	Aspartate kinase (EC 2.7.2.4)	chromosome	45179	43788
RGOX1306	GOX0038	3-Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase (EC 2.1.1.64)	chromosome	45285	46037
RGOX1307	GOX0039	Putative carboxy-cis,cis-muconate cyclase (EC 5.5.1.5)	chromosome	47375	46107
RGOX1308	GOX0040	Hypothetical protein	chromosome	47959	47474
RGOX1309	GOX0041	Glutaredoxin	chromosome	48217	47963
RGOX1310	GOX0042	Competence protein F	chromosome	48911	48228
RGOX3253	GOX0043	Hypothetical protein	chromosome	49180	48995
RGOX1311	GOX0044	Phosphomannomutase(EC 5.4.2.8)/P-glucomut.(EC 5.4.2.2)-UDPG pyrophosphorylase	chromosome	51505	49220
RGOX1313	GOX0046	Lipoate-protein ligase B	chromosome	51862	52560
RGOX1312	GOX0047	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	chromosome	53137	52547
RGOX1314	GOX0048	BolA protein	chromosome	53448	53137
RGOX1316	GOX0049	DnaJ family protein	chromosome	53518	54135
RGOX1318	GOX0050	Cobalt insertion protein CobS	chromosome	54224	55237
RGOX3474	GOX0051	Cobalamin biosynthesis protein CobT	chromosome	55173	57116
RGOX1320	GOX0052	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	chromosome	58500	57076
RGOX1322	GOX0053	Hypothetical protein	chromosome	59399	58581
RGOX1324	GOX0054	Hypothetical protein	chromosome	59501	60361
RGOX3475	GOX0055	Transcription-repair coupling factor	chromosome	63874	60356
RGOX3476	GOX0056	ATP-dependent DNA helicase RecG (EC 3.6.1.-)	chromosome	63947	66094
RGOX1328	GOX0057	Sensory box/GGDEF family protein	chromosome	66176	67873
RGOX1331	GOX0058	Hypothetical protein	chromosome	68469	69203
RGOX1332	GOX0059	Putative transcriptional regulator cold shock protein	chromosome	69211	69894
RGOX1333	GOX0060	SsrA-binding protein	chromosome	70539	70048
RGOX1334	GOX0061	Dihydropicolinate synthase (EC 4.2.1.52)	chromosome	71459	70551
RGOX1335	GOX0062	Chorismate mutase/prephenate dehydratase (EC 4.2.1.51)	chromosome	72313	71483
RGOX1336	GOX0063	3-Deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase (EC 2.7.7.38)	chromosome	73080	72316
RGOX3254	GOX0064	Inositol-1-monophosphatase (EC 3.1.3.25)	chromosome	73114	73899
RGOX1337	GOX0065	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	chromosome	74043	75290
RGOX1338	GOX0066	Competence protein ComM	chromosome	75344	76843
RGOX1339	GOX0067	Cystathionine beta-lyase (EC 4.4.1.8)	chromosome	78067	76853
RGOX1340	GOX0068	Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1)	chromosome	78900	78067
RGOX1341	GOX0069	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	79030	80106
RGOX1342	GOX0070	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	80106	80729
RGOX1343	GOX0071	Cardiolipin synthetase (EC 2.7.8.-)	chromosome	82150	80741
RGOX1344	GOX0072	Arginine-tRNA-protein transferase (EC 2.3.2.8)	chromosome	82306	83025
RGOX1345	GOX0073	Topoisomerase IV subunit A (EC 5.99.1.-)	chromosome	85257	83050
RGOX1347	GOX0074	Protein Translation Elongation Factor Ts (EF-Ts)	chromosome	87512	86607
RGOX1348	GOX0075	SSU ribosomal protein S2P	chromosome	88411	87617
RGOX1349	GOX0076	DNA polymerase III alpha subunit (EC 2.7.7.7)	chromosome	92026	88607
RGOX1350	GOX0077	Lipoprotein releasing system ATP-binding protein	chromosome	92789	92097
RGOX1351	GOX0078	Lipoprotein releasing system transmembrane protein	chromosome	94032	92785
RGOX1352	GOX0079	Prolyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.15)	chromosome	95348	94035
RGOX1353	GOX0080	Metal-dependent hydrolase	chromosome	97018	95363

RGOX1354	GOX0081	Transcriptional activator, putative, Baf family	chromosome	97871	97062
RGOX1355	GOX0082	Biotin operon repressor/biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] synthetase (EC 6.3.4.15)	chromosome	98619	97891
RGOX1357	GOX0084	DNA-binding protein HU	chromosome	99073	98792
RGOX1358	GOX0085	ATP-dependent protease La (EC 3.4.21.53)	chromosome	101779	99218
RGOX13615	GOX0086	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	chromosome	103197	101935
RGOX1361	GOX0087	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)	chromosome	104041	103397
RGOX1362	GOX0088	Trigger factor	chromosome	105507	104179
RGOX1363	GOX0090	Putative sugar kinase	chromosome	107217	105724
RGOX1365	GOX0091	Hypothetical protein	chromosome	107398	107847
RGOX13477	GOX0092	ATP-dependent RNA helicase	chromosome	107974	110352
RGOX1368	GOX0093	tRNA (Uracil-5-) -methyltransferase (EC 2.1.1.35)	chromosome	110348	111670
RGOX1369	GOX0094	Phenylacetic acid degradation protein PaaD	chromosome	112359	111994
RGOX1370	GOX0095	NifS-like aminotransferase	chromosome	113597	112359
RGOX1371	GOX0096	ABC transporter permease protein	chromosome	114772	113597
RGOX1372	GOX0097	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	115557	114790
RGOX13478	GOX0098	ABC transporter subunit	chromosome	117040	115562
RGOX1374	GOX0099	Putative transcriptional regulator	chromosome	117535	117056
RGOX1375	GOX0100	Putative membrane-spanning protein	chromosome	117805	117659
RGOX1376	GOX0101	Putative membrane-spanning protein	chromosome	118944	117892
RGOX13479	GOX0102	Putative phosphoenolpyruvate carboxylase	chromosome	119013	121847
RGOX1379	GOX0103	Carboxypeptidase-related protein	chromosome	121940	123520
RGOX1380	GOX0104	Hypothetical protein	chromosome	123956	123585
RGOX1381	GOX0105	Protein Translation Elongation Factor G (EF-G)	chromosome	126141	124042
RGOX1382	GOX0106	LSU ribosomal protein L28P	chromosome	126614	126315
RGOX1383	GOX0107	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	127204	126689
RGOX1384	GOX0108	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	128580	127318
RGOX1385	GOX0109	Putative thiamin pyrophosphokinase (EC 2.7.6.2)	chromosome	128823	129428
RGOX1386	GOX0110	Hypothetical protein	chromosome	129428	129871
RGOX1387	GOX0111	Putative permease	chromosome	129997	131118
RGOX1388	GOX0113	Hypothetical protein	chromosome	132148	131285
RGOX1389	GOX0114	Integration host factor alpha-subunit	chromosome	132464	132141
RGOX1390	GOX0115	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (EC 2.3.1.41)	chromosome	133513	132542
RGOX1391	GOX0116	Fatty acid/phospholipid synthesis protein PlsX	chromosome	134628	133522
RGOX1392	GOX0117	LSU ribosomal protein L32P	chromosome	134913	134704
RGOX1393	GOX0118	Hypothetical protein	chromosome	135648	135070
RGOX1395	GOX0119	Hypothetical protein	chromosome	135756	136325
RGOX1396	GOX0120	Osmolarity sensor protein envZ (EC 2.7.3.-)	chromosome	137726	136338
RGOX1397	GOX0121	Transcriptional regulator similar to PetR	chromosome	138402	137707
RGOX1398	GOX0122	Transcriptional regulator similar to PetP	chromosome	138872	138402
RGOX1399	GOX0123	Polypeptide deformylase (EC 3.5.1.31)	chromosome	139396	138887
RGOX1401	GOX0124	SSU ribosomal protein S21P	chromosome	139585	139785
RGOX1402	GOX0125	Prolyl-oligopeptidase	chromosome	142026	139912
RGOX1403	GOX0126	Chemotaxis MotA protein	chromosome	142945	142082
RGOX1404	GOX0127	Chemotaxis MotB protein	chromosome	143907	142975
RGOX1405	GOX0128	Hypothetical protein	chromosome	145451	143961
RGOX1406	GOX0129	Dolichol-phosphate mannosyltransferase (EC 2.4.1.83)	chromosome	146469	145366
RGOX1407	GOX0130	Transcriptional regulator, AsnC family	chromosome	146963	146484
RGOX1408	GOX0131	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5)	chromosome	147062	148033
RGOX1409	GOX0132	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	148104	149051
RGOX1410	GOX0133	Integration host factor beta-subunit	chromosome	149815	149513
RGOX1411	GOX0134	Protease IV	chromosome	150692	149859
RGOX1413	GOX0135	Transcriptional regulator	chromosome	151358	150894
RGOX13480	GOX0136	DNA polymerase related protein (EC 2.7.7.7)	chromosome	151555	152817
RGOX1416	GOX0137	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	152848	155088
RGOX1417	GOX0139	LSU ribosomal protein L21P	chromosome	155497	155808
RGOX1418	GOX0140	LSU ribosomal protein L27P	chromosome	155845	156108
RGOX1419	GOX0141	GTP-binding protein	chromosome	156170	157219
RGOX1420	GOX0142	Glutamate 5-kinase (EC 2.7.2.11)	chromosome	157219	158352
RGOX1421	GOX0143	Hypothetical protein	chromosome	158976	158383
RGOX1422	GOX0144	Hypothetical protein	chromosome	159312	159049
RGOX1424	GOX0145	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	chromosome	159594	161060
RGOX1425	GOX0146	Hypothetical protein	chromosome	161070	161537
RGOX1426	GOX0147	Putative lipase	chromosome	162560	161568
RGOX1427	GOX0148	Hypothetical protein	chromosome	162877	162548
RGOX1428	GOX0149	MraZ protein	chromosome	163345	163836
RGOX1429	GOX0150	SAM-dependent methyltransferase (EC 2.1.1.-)	chromosome	163836	164804
RGOX13481	GOX0151	Hypothetical protein	chromosome	164804	165592
RGOX1431	GOX0152	Penicillin-binding transmembrane protein	chromosome	165677	167659
RGOX1433	GOX0153	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	chromosome	167671	169128
RGOX1435	GOX0154	UDP-N-Ac.muramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopim.-D-alanyl-D-alanyl lig.(EC 6.3.2.15)	chromosome	169379	170497
RGOX13482	GOX0155	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase (EC 2.7.8.13)	chromosome	170500	171588
RGOX1437	GOX0156	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase (EC 6.3.2.9)	chromosome	171504	172931
RGOX1438	GOX0157	Cell division protein FtsW	chromosome	172939	174129
RGOX1439	GOX0158	UDP-N-Ac.glucosamine-N-Ac.muramyl-(pentapept.)PP-undecaprenol-N-Ac.glucamine transf.	chromosome	174129	175223
RGOX1440	GOX0159	UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase (EC 6.3.2.8)	chromosome	175266	176696
RGOX1441	GOX0160	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase (EC 1.1.1.158)	chromosome	176696	177613
RGOX1442	GOX0161	D-alanine--D-alanine ligase (EC 6.3.2.4)	chromosome	177613	178521
RGOX1443	GOX0162	Cell division protein FtsQ	chromosome	178524	179456
RGOX1444	GOX0163	Cell division protein FtsA	chromosome	179456	180850

RGOX1445	GOX0164	Cell division protein FtsZ	chromosome	180911	182440
RGOX3483	GOX0165	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	chromosome	182560	183588
RGOX1447	GOX0166	Hypothetical lipoprotein	chromosome	183660	184556
RGOX3484	GOX0167	DNA repair protein RecN	chromosome	184605	186323
RGOX1450	GOX0168	NAD-dependent DNA ligase (EC 6.5.1.2)	chromosome	186323	188371
RGOX1451	GOX0169	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	188445	189791
RGOX1452	GOX0170	Pyrazinamidase/nicotinamidase	chromosome	189831	190400
RGOX1453	GOX0171	Hypothetical protein	chromosome	190415	190822
RGOX1454	GOX0174	Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.22)	chromosome	191593	191090
RGOX1456	GOX0175	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	191664	192887
RGOX1458	GOX0177	Ribonuclease H (EC 3.1.26.4)	chromosome	193598	193149
RGOX1459	GOX0178	Homoserine kinase (EC 2.7.1.39)	chromosome	194541	193594
RGOX1460	GOX0179	LytB protein involved in terpenoid biosynthesis	chromosome	195558	194551
RGOX1461	GOX0180	Hypothetical protein	chromosome	195661	196251
RGOX1462	GOX0181	Oligopeptide transporter	chromosome	196324	198267
RGOX1463	GOX0182	Hypothetical protein	chromosome	198851	198297
RGOX1464	GOX0183	Adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase gamma subunit (EC 4.2.1.28)	chromosome	199640	199071
RGOX1465	GOX0184	Hypothetical protein	chromosome	200247	199660
RGOX1466	GOX0185	Hypothetical protein	chromosome	200364	200792
RGOX1467	GOX0186	Hypothetical protein	chromosome	201134	200805
RGOX1469	GOX0187	Putative protein disulfide isomerase	chromosome	201209	201745
RGOX1470	GOX0188	Oligoendopeptidase F (EC 3.4.24.-)	chromosome	203514	201793
RGOX1471	GOX0189	Aspartate aminotransferase A (EC 2.6.1.1)	chromosome	204729	203584
RGOX1472	GOX0190	Aspartate aminotransferase A (EC 2.6.1.1)	chromosome	205946	204729
RGOX1473	GOX0191	3-Isopropylmalate dehydrogenase (EC 1.1.1.85)	chromosome	207189	206083
RGOX1474	GOX0192	3-Isopropylmalate dehydratase, small subunit (EC 4.2.1.33)	chromosome	207812	207189
RGOX1475	GOX0193	3-Isopropylmalate dehydratase large subunit (EC 4.2.1.33)	chromosome	209239	207815
RGOX1478	GOX0194	LSU ribosomal protein L19P	chromosome	209653	209264
RGOX1479	GOX0195	tRNA (Guanine-N(1)-)-methyltransferase (EC 2.1.1.31)	chromosome	210382	209681
RGOX1481	GOX0196	SSU ribosomal protein S16P	chromosome	211297	210953
RGOX1482	GOX0197	Signal recognition particle protein	chromosome	212765	211341
RGOX1483	GOX0198	Hypothetical protein	chromosome	213424	212897
RGOX1484	GOX0200	ATP-dependent RNA helicase	chromosome	215166	213874
RGOX1485	GOX0201	NAD(P)H-flavin oxidoreductase, nitroreductase family	chromosome	216074	215469
RGOX1486	GOX0202	MetW protein, involved in methionine biosynthesis	chromosome	216808	216146
RGOX1487	GOX0203	Homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	chromosome	217998	216811
RGOX1488	GOX0204	Hypothetical protein	chromosome	218147	221926
RGOX1489	GOX0205	Transposase (class I)	chromosome	222946	221990
RGOX1490	GOX0206	Transcriptional regulator	chromosome	224018	223071
RGOX1491	GOX0207	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	224226	226730
RGOX3487	GOX0208	Putative glucarate/galactarate transporter	chromosome	226761	228011
RGOX1494	GOX0209	Hypothetical protein	chromosome	228011	228649
RGOX1496	GOX0210	Putative carboxylase	chromosome	228649	229617
RGOX1497	GOX0211	Lactam utilization protein LamB	chromosome	229660	230421
RGOX1498	GOX0212	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	chromosome	230450	230890
RGOX1499	GOX0213	Biotin carboxylase (EC 6.3.4.14)	chromosome	230886	232238
RGOX1500	GOX0214	Hypothetical protein	chromosome	232238	232624
RGOX1501	GOX0215	Hypothetical protein	chromosome	233201	232641
RGOX3488	GOX0216	N-methylhydantoinase A (EC 3.5.2.14)	chromosome	233280	235367
RGOX3634	GOX0217	N-methylhydantoinase B (EC 3.5.2.14)	chromosome	235370	236935
RGOX1507	GOX0218	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	chromosome	237931	236990
RGOX1508	GOX0225	Hypothetical protein	chromosome	244618	243806
RGOX1509	GOX0226	5-Formyltetrahydrofolate cyclo-ligase (EC 6.3.3.2)	chromosome	245209	244625
RGOX1510	GOX0227	Hypothetical protein	chromosome	245746	245405
RGOX3265	GOX0228	Hypothetical protein	chromosome	246016	246447
RGOX1514	GOX0229	Hypothetical protein	chromosome	246437	247012
RGOX1513	GOX0230	Hypothetical protein	chromosome	247501	246989
RGOX3266	GOX0231	Hypothetical protein	chromosome	248304	247831
RGOX1515	GOX0232	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6)	chromosome	248720	248364
RGOX1516	GOX0233	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6)	chromosome	249355	248720
RGOX1517	GOX0234	Lysine 2,3-aminomutase (EC 5.4.3.2)	chromosome	249409	250476
RGOX1518	GOX0235	Hypothetical protein	chromosome	250813	250508
RGOX1521	GOX0236	Protein Translation Elongation Factor P (EF-P)	chromosome	251029	251592
RGOX1522	GOX0237	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase (EC 3.1.3.25)	chromosome	251602	252426
RGOX1523	GOX0238	Hypothetical protein	chromosome	252490	253254
RGOX1524	GOX0239	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	chromosome	253279	254412
RGOX1525	GOX0240	Flagellar motor protein	chromosome	254419	255417
RGOX1526	GOX0241	GTP-binding elongation factor LepA	chromosome	255457	257304
RGOX1528	GOX0242	Hypothetical protein	chromosome	257318	258721
RGOX1527	GOX0243	Hypothetical protein	chromosome	259272	258718
RGOX1529	GOX0244	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	259386	261539
RGOX1530	GOX0245	Putative membrane transport protein	chromosome	261625	262956
RGOX1531	GOX0246	Hypothetical protein	chromosome	263018	263791
RGOX1532	GOX0247	Hypothetical protein	chromosome	264400	263924
RGOX1533	GOX0248	Hypothetical protein	chromosome	264754	264413
RGOX3267	GOX0249	Hypothetical protein	chromosome	264924	265175
RGOX1535	GOX0250	Exodeoxyribonuclease VII small subunit (EC 3.1.11.6)	chromosome	265276	265524
RGOX1536	GOX0251	Dimethylallyltransferase (EC 2.5.1.1) /Geranyltransferase (EC 2.5.1.10)	chromosome	265524	266426
RGOX1537	GOX0252	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (EC 4.1.3.37)	chromosome	266407	268413

RGOX3528	GOX0253	Hemolysin HlyA	chromosome	268424	269182
RGOX1538	GOX0254	Putative Fe-S-cluster redox enzyme	chromosome	269266	270486
RGOX1539	GOX0255	Argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5)	chromosome	270567	271796
RGOX1540	GOX0256	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	chromosome	271826	272323
RGOX1541	GOX0257	Thymidine kinase (EC 2.7.1.21)	chromosome	272894	272355
RGOX1542	GOX0258	Putative cytochrome c-552	chromosome	273040	273471
RGOX1543	GOX0259	Tryptophanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.2)	chromosome	273620	274510
RGOX1544	GOX0260	Lipid-A-disaccharide synthase (EC 2.4.1.182)	chromosome	275765	274521
RGOX1545	GOX0261	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (EC 6.1.1.20)	chromosome	278230	275765
RGOX1546	GOX0262	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain (EC 6.1.1.20)	chromosome	279302	278235
RGOX1547	GOX0263	LSU ribosomal protein L20P	chromosome	279756	279403
RGOX1548	GOX0264	LSU ribosomal protein L35P	chromosome	279973	279773
RGOX1549	GOX0265	Membrane-bound glucose dehydrogenase (PQQ) (EC 1.1.99.17)	chromosome	280284	282707
RGOX1550	GOX0266	Hypothetical protein	chromosome	282746	283495
RGOX3269	GOX0267	Hypothetical protein	chromosome	283606	283833
RGOX1551	GOX0268	SufE protein probably involved in Fe-S center assembly	chromosome	284332	283901
RGOX1552	GOX0269	Sensory Transduction Protein Kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	286393	284393
RGOX1554	GOX0270	Sensory Transduction Protein Kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	288102	286327
RGOX1555	GOX0271	Hypothetical protein	chromosome	288261	288668
RGOX1556	GOX0272	Hypothetical protein	chromosome	289172	288687
RGOX1557	GOX0273	Cell division ATP-binding protein FtsE	chromosome	289296	289994
RGOX1559	GOX0274	Putative cell division protein FtsX	chromosome	289969	290898
RGOX1560	GOX0275	Hypothetical protein	chromosome	290772	291488
RGOX1561	GOX0276	1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (EC 2.3.1.51)	chromosome	291534	292283
RGOX1562	GOX0277	Hypothetical protein	chromosome	292536	293597
RGOX1563	GOX0278	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)	chromosome	293820	295244
RGOX1564	GOX0279	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II (EC 1.10.3.-)	chromosome	295253	296275
RGOX3490	GOX0280	Hydroxyacylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.6) (GlyoxalaseII)	chromosome	297286	296510
RGOX1567	GOX0281	Putative methyltransferase (EC 2.1.1.-)	chromosome	297264	297992
RGOX1569	GOX0282	Phosphatidylserine decarboxylase (EC 4.1.1.65)	chromosome	298085	298759
RGOX1570	GOX0283	Phosphatidylserine synthase (EC 2.7.8.8)	chromosome	298777	299655
RGOX1571	GOX0284	Putative sugar kinase/putative transcriptional regulator	chromosome	300666	299734
RGOX1572	GOX0285	Hypothetical protein (similar to formate hydrogenlyase subunit 7)	chromosome	301317	300835
RGOX1573	GOX0286	Hypothetical protein (similar to formate hydrogenlyase subunit 5)	chromosome	302753	301317
RGOX1574	GOX0287	Hypothetical protein	chromosome	303940	302753
RGOX1577	GOX0288	Hypothetical protein	chromosome	305225	304359
RGOX1578	GOX0289	Hypothetical protein	chromosome	306577	305228
RGOX1579	GOX0290	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	307435	306593
RGOX1580	GOX0291	Putative ferredoxin subunit of ring-hydroxylating dioxygenases	chromosome	308581	307460
RGOX1581	GOX0292	DNA polymerase III, chi subunit (EC 2.7.7.7)	chromosome	309109	308669
RGOX1582	GOX0293	Cytosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	chromosome	310598	309129
RGOX1583	GOX0294	Hypothetical protein	chromosome	310684	311328
RGOX1584	GOX0295	Exopolysaccharide production protein	chromosome	311382	312176
RGOX1585	GOX0296	Hypothetical protein	chromosome	312176	313186
RGOX1586	GOX0297	Hypothetical protein	chromosome	313192	313671
RGOX1587	GOX0298	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	313732	314901
RGOX1588	GOX0299	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	314901	316088
RGOX1589	GOX0300	Organic solvent tolerance protein	chromosome	316157	318412
RGOX1590	GOX0301	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	chromosome	318629	319789
RGOX1591	GOX0302	Putative dimethyladenosine transferase (16S rRNA dimethylase)	chromosome	319701	320609
RGOX1592	GOX0303	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (EC 2.1.1.79)	chromosome	321839	320622
RGOX1593	GOX0304	LSU ribosomal protein L9P	chromosome	322570	321983
RGOX1594	GOX0305	SSU ribosomal protein S18P	chromosome	322871	322584
RGOX1595	GOX0306	SSU ribosomal protein S6P	chromosome	323359	322880
RGOX1597	GOX0307	Putative acetyltransferase (EC 2.3.1.-)	chromosome	324094	323522
RGOX1598	GOX0308	RNA polymerase sigma factor RpoD	chromosome	326076	324121
RGOX1599	GOX0309	DNA primase (EC 2.7.7.-)	chromosome	328089	326245
RGOX1600	GOX0310	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha (EC 1.6.1.2)	chromosome	328433	329656
RGOX1601	GOX0311	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha (EC 1.6.1.2)	chromosome	329656	329982
RGOX1602	GOX0312	NAD(P) transhydrogenase subunit beta (EC 1.6.1.2)	chromosome	329982	331400
RGOX1603	GOX0313	Putative propanol-preferring alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	chromosome	331428	332456
RGOX1604	GOX0314	Probable alcohol dehydrogenase-like oxidoreductase protein	chromosome	332485	333465
RGOX1605	GOX0315	Sensory transduction histidine kinase	chromosome	333593	334969
RGOX1606	GOX0316	Hypothetical protein	chromosome	334988	335437
RGOX1607	GOX0317	Cation efflux system protein	chromosome	336464	335505
RGOX1608	GOX0318	Hypothetical protein	chromosome	336948	336538
RGOX1609	GOX0319	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	337839	336961
RGOX1610	GOX0320	Transcriptional regulator, AraC family	chromosome	337969	338745
RGOX3491	GOX0321	Carbamoyl-phosphate synthase small chain (EC 6.3.5.5)	chromosome	339244	340914
RGOX1613	GOX0322	Carbamoyl-phosphate synthase large chain (EC 6.3.5.5)	chromosome	340921	344172
RGOX1615	GOX0323	Hypothetical protein	chromosome	344313	344801
RGOX1616	GOX0324	Transcription elongation factor	chromosome	344998	345468
RGOX1617	GOX0325	Threonine dehydratase (EC 4.2.1.16)	chromosome	345471	346694
RGOX1618	GOX0326	Hypothetical protein	chromosome	346989	346705
RGOX1619	GOX0327	Uracil phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.9)	chromosome	347709	347074
RGOX1620	GOX0328	Transcriptional regulator	chromosome	348122	347709
RGOX1621	GOX0329	SigmaB-controlled gene product	chromosome	348272	348460
RGOX1622	GOX0330	Phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1)	chromosome	348581	350110
RGOX1623	GOX0331	Hypothetical protein	chromosome	350466	351386

RGOX1624	GOX0332	Carboxy-terminal protease	chromosome	351518	352972
RGOX1625	GOX0333	Hypothetical protein	chromosome	353374	354171
RGOX1627	GOX0334	Probable (di) nucleoside polyphosphate hydrolase	chromosome	354171	354680
RGOX1626	GOX0335	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	356329	354644
RGOX1629	GOX0336	Poly(A) polymerase/t-RNA nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.19)	chromosome	357631	356444
RGOX1630	GOX0337	Hypothetical protein	chromosome	358164	357631
RGOX1632	GOX0338	MoxR-like protein (transcriptional regulator)	chromosome	358319	359344
RGOX1633	GOX0339	Hypothetical protein	chromosome	359353	360276
RGOX1634	GOX0340	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	360276	363008
RGOX3492	GOX0341	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	363008	364357
RGOX1638	GOX0342	Hypothetical protein	chromosome	364515	365042
RGOX1639	GOX0343	Hypothetical protein	chromosome	365042	365737
RGOX3493	GOX0344	Adenine DNA methyltransferase (EC 2.1.1.72)	chromosome	366899	365817
RGOX1641	GOX0345	Ribonuclease HII (EC 3.1.26.4)	chromosome	367519	366899
RGOX1642	GOX0346	Hypothetical protein	chromosome	368301	367669
RGOX1643	GOX0347	Hypothetical protein	chromosome	368668	368381
RGOX1645	GOX0348	Putative membrane fusion protein MtrC	chromosome	368950	370290
RGOX3494	GOX0349	Acriflavin resistance protein D	chromosome	370333	373530
RGOX3495	GOX0350	Acriflavin resistance protein F	chromosome	373530	376805
RGOX1652	GOX0351	Putative outer membrane drug efflux protein	chromosome	376808	378349
RGOX1653	GOX0352	Hypothetical protein	chromosome	378586	378419
RGOX1654	GOX0353	Hypothetical protein	chromosome	378890	378651
RGOX1655	GOX0354	Putative sugar/polyol transporter	chromosome	380289	378982
RGOX1656	GOX0355	LSU ribosomal protein L17P	chromosome	381051	380632
RGOX1658	GOX0356	DNA-directed RNA polymerase alpha chain (EC 2.7.7.6)	chromosome	382098	381082
RGOX1659	GOX0357	SSU ribosomal protein S11P	chromosome	382623	382234
RGOX1660	GOX0358	SSU ribosomal protein S13P	chromosome	383058	382684
RGOX1661	GOX0359	Adenylate kinase (EC 2.7.4.3)	chromosome	383856	383278
RGOX1663	GOX0360	Protein translocase subunit SecY	chromosome	385226	383856
RGOX1664	GOX0361	LSU ribosomal protein L15P	chromosome	385812	385327
RGOX1665	GOX0362	LSU ribosomal protein L30P	chromosome	386002	385817
RGOX1667	GOX0363	SSU ribosomal protein S5P	chromosome	386570	385998
RGOX1669	GOX0364	LSU ribosomal protein L18P	chromosome	386945	386586
RGOX1670	GOX0365	LSU ribosomal protein L6P	chromosome	387481	386948
RGOX1671	GOX0366	SSU ribosomal protein S8P	chromosome	387890	387495
RGOX1673	GOX0367	SSU ribosomal protein S14P	chromosome	388208	387906
RGOX3496	GOX0368	LSU ribosomal protein L5P	chromosome	388904	388344
RGOX1678	GOX0369	LSU ribosomal protein L24P	chromosome	389236	388919
RGOX1679	GOX0370	LSU ribosomal protein L14P	chromosome	389604	389239
RGOX1680	GOX0371	SSU ribosomal protein S17P	chromosome	389889	389620
RGOX1681	GOX0372	LSU ribosomal protein L29P	chromosome	390136	389906
RGOX1683	GOX0373	LSU ribosomal protein L16P	chromosome	390552	390139
RGOX1684	GOX0374	SSU ribosomal protein S3P	chromosome	391287	390613
RGOX1685	GOX0375	LSU ribosomal protein L22P	chromosome	391719	391294
RGOX1686	GOX0376	SSU ribosomal protein S19P	chromosome	392000	391725
RGOX1688	GOX0377	LSU ribosomal protein L2P	chromosome	392847	392020
RGOX1689	GOX0378	LSU ribosomal protein L23P	chromosome	393205	392867
RGOX1690	GOX0379	LSU ribosomal protein L4P	chromosome	393816	393205
RGOX1691	GOX0380	LSU ribosomal protein L3P	chromosome	394511	393831
RGOX1693	GOX0381	SSU ribosomal protein S10P	chromosome	394830	394525
RGOX1695	GOX0382	Protein Translation Elongation Factor Tu (EF-TU)	chromosome	396140	394953
RGOX1696	GOX0383	SSU ribosomal protein S7P	chromosome	396732	396259
RGOX1697	GOX0384	SSU ribosomal protein S12P	chromosome	397116	396748
RGOX1699	GOX0385	DNA-directed RNA polymerase beta' chain (EC 2.7.7.6)	chromosome	401811	397495
RGOX3616	GOX0386	DNA-directed RNA polymerase beta chain (EC 2.7.7.6)	chromosome	406235	401895
RGOX1704	GOX0387	LSU ribosomal protein L12P (L7/L12)	chromosome	406682	406308
RGOX1706	GOX0388	LSU ribosomal protein L10P	chromosome	407305	406754
RGOX1707	GOX0389	LSU ribosomal protein L1P	chromosome	408275	407586
RGOX1708	GOX0390	LSU ribosomal protein L11P	chromosome	408714	408283
RGOX3635	GOX0391	Putative outer membrane channel protein	chromosome	410283	408817
RGOX1712	GOX0392	Putative transport transmembrane protein	chromosome	411776	410487
RGOX1713	GOX0393	Putative transport transmembrane protein	chromosome	414916	411776
RGOX1714	GOX0394	Two component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	416541	415114
RGOX1715	GOX0395	DNA binding response regulator	chromosome	417283	416531
RGOX1716	GOX0396	DNA recombination protein RmuC homolog	chromosome	418553	417324
RGOX1717	GOX0397	Hypothetical protein	chromosome	419070	418603
RGOX3530	GOX0398	NAD(FAD)-utilizing dehydrogenase	chromosome	420167	418995
RGOX1719	GOX0399	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	chromosome	420847	420182
RGOX1721	GOX0400	Cell division inhibitor MinC	chromosome	420925	421650
RGOX1722	GOX0401	Cell division inhibitor MinD	chromosome	421802	422611
RGOX1724	GOX0402	Cell division inhibitor MinE	chromosome	422619	422894
RGOX1725	GOX0403	Hypothetical protein	chromosome	422982	423338
RGOX1726	GOX0404	Hypothetical protein	chromosome	424610	423417
RGOX3498	GOX0405	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	424788	427289
RGOX1729	GOX0406	Hypothetical protein	chromosome	429261	427468
RGOX1730	GOX0407	Hypothetical protein	chromosome	429495	430025
RGOX1731	GOX0408	Hypothetical protein	chromosome	430504	432390
RGOX1733	GOX0409	Hypothetical protein	chromosome	432529	433044
RGOX1734	GOX0410	Leucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.4)	chromosome	433055	435649

RGOX1735	GOX0411	Hypothetical protein	chromosome	435652	436320
RGOX1737	GOX0412	DNA polymerase III, delta subunit (EC 2.7.7.7)	chromosome	436324	437325
RGOX1738	GOX0413	Acetyl-coenzyme A synthetase (EC 6.2.1.1)	chromosome	437445	439349
RGOX1739	GOX0414	Hypothetical protein	chromosome	439684	439376
RGOX1740	GOX0415	Putative transport protein	chromosome	439845	440822
RGOX1741	GOX0416	Protein-tyrosine phosphatase (EC 3.1.3.48)	chromosome	441077	441286
RGOX1742	GOX0417	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase (EC 1.1.1.-)	chromosome	441327	442256
RGOX1743	GOX0418	Probable inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase (EC 2.7.1.23)	chromosome	443021	442266
RGOX1745	GOX0419	Transposase (class II)	chromosome	443353	444429
RGOX1746	GOX0420	Flagellar biosynthetic protein FlhA	chromosome	446789	444660
RGOX1747	GOX0421	Flagellar motor switch protein FlhN	chromosome	447127	446813
RGOX1748	GOX0422	Hypothetical protein	chromosome	447719	447120
RGOX1749	GOX0423	Flagellar motor switch protein FlhG	chromosome	448792	447791
RGOX1750	GOX0424	Flagellar M-ring protein FlhF	chromosome	450246	448801
RGOX1751	GOX0425	Basal-body rod modification protein FlgD	chromosome	451391	450654
RGOX1752	GOX0426	Hypothetical protein	chromosome	452162	451410
RGOX1753	GOX0427	Hypothetical protein	chromosome	453298	452951
RGOX1754	GOX0428	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransf./IMP cyclohydrol. (EC 3.5.4.10)	chromosome	454872	453298
RGOX1755	GOX0429	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	455588	454872
RGOX1756	GOX0430	KDPG aldolase (EC 4.1.2.14)	chromosome	456159	455539
RGOX1757	GOX0431	Phosphogluconate dehydratase (EC 4.2.1.12)	chromosome	458019	456175
RGOX1758	GOX0432	Hypothetical protein	chromosome	458097	458351
RGOX1759	GOX0433	Hypothetical protein	chromosome	458432	459124
RGOX1760	GOX0434	Hypothetical protein	chromosome	459784	459218
RGOX1761	GOX0435	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase (EC 6.3.4.14)	chromosome	461151	459802
RGOX1762	GOX0436	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	chromosome	461597	461154
RGOX1763	GOX0437	3-Dehydroquinate dehydratase (EC 4.2.1.10)	chromosome	462085	461606
RGOX1765	GOX0438	Rare lipoprotein A	chromosome	462149	462853
RGOX1766	GOX0439	t-RNA-processing ribonuclease BN	chromosome	463928	462885
RGOX1767	GOX0440	Ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17)	chromosome	464343	465479
RGOX1768	GOX0441	Molybdenum-pterin binding protein	chromosome	465614	465817
RGOX1769	GOX0442	Hypothetical protein	chromosome	466735	466064
RGOX1770	GOX0443	Molybdopterin (MPT) converting factor, subunit 2	chromosome	467276	466767
RGOX1771	GOX0444	Bifunctional molybdenum cofactor biosynthesis protein	chromosome	468112	467276
RGOX1773	GOX0445	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C	chromosome	468591	468112
RGOX1774	GOX0446	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A	chromosome	469693	468641
RGOX1775	GOX0447	Molybdopterin biosynthesis MoeA protein	chromosome	470858	469665
RGOX1776	GOX0448	Hypothetical protein related to XdhC/CoxI (attachment of molybdopterin to proteins)	chromosome	471028	471996
RGOX1777	GOX0449	Hypothetical protein	chromosome	471996	472589
RGOX1778	GOX0450	Branched-chain amino acid aminotransferase (EC 2.6.1.42)	chromosome	473767	472631
RGOX1779	GOX0451	SSU ribosomal protein S9P	chromosome	474447	473959
RGOX1780	GOX0452	LSU ribosomal protein L13P	chromosome	475066	474461
RGOX1783	GOX0453	Hypothetical protein	chromosome	475258	476661
RGOX1784	GOX0454	Putative transmembrane oxidoreductase	chromosome	476661	477581
RGOX1785	GOX0455	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	chromosome	479037	477619
RGOX1786	GOX0456	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	479273	480202
RGOX1787	GOX0458	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	481358	480420
RGOX1788	GOX0459	Sulfate permease	chromosome	481466	482917
RGOX1790	GOX0460	Hypothetical protein	chromosome	483012	483656
RGOX1791	GOX0461	Hypothetical protein (similar to OpgC)	chromosome	483734	484891
RGOX1792	#NV	GTP-binding protein HflX (C-terminus)	chromosome	485852	484908
RGOX3401	GOX0463	Transposase	chromosome	485769	487475
RGOX1794	#NV	GTP-binding protein HflX (N-terminus)	chromosome	487967	487482
RGOX1795	GOX0465	NrfA protein	chromosome	488218	487967
RGOX1797	GOX0466	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrX	chromosome	489679	488270
RGOX1798	GOX0467	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrY	chromosome	492056	489672
RGOX1799	GOX0468	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrC	chromosome	492793	492056
RGOX1802	GOX0469	Nitrogen assimilation regulatory protein NifR3	chromosome	493933	492821
RGOX1804	GOX0470	Putative peroxidase	chromosome	494064	494870
RGOX1805	GOX0471	Putative 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	chromosome	494878	495726
RGOX1806	GOX0472	Hypothetical protein	chromosome	495759	496037
RGOX1807	GOX0473	Dihydroorotate dehydrogenase (EC 1.6.99.7)	chromosome	496096	497166
RGOX1808	GOX0474	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	497333	499753
RGOX1809	GOX0475	Hypothetical protein	chromosome	499851	500333
RGOX1810	GOX0476	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	501382	500372
RGOX3617	GOX0477	Putative monooxygenase	chromosome	502608	501427
RGOX1813	GOX0478	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	503215	502616
RGOX1814	GOX0479	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (EC 4.2.1.19)	chromosome	503426	504019
RGOX1815	GOX0480	Hypothetical protein	chromosome	504019	504420
RGOX1816	GOX0481	Amidotransferase HisH (EC 2.4.2.-)	chromosome	504408	505043
RGOX1817	GOX0482	P-ribosyl-P-ribosylamino-methylideneaminoimidazole-4-carboxamide isom. (EC 5.3.1.16)	chromosome	505043	506392
RGOX1818	GOX0483	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF (EC 4.1.3.-)	chromosome	506389	507147
RGOX1820	GOX0484	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase (EC 3.6.1.31)	chromosome	507155	507553
RGOX1821	GOX0485	Hypothetical HIT-like protein	chromosome	507571	507936
RGOX3618	GOX0487	DNA integration/recombination/inversion protein	chromosome	508188	509369
RGOX1825	GOX0488	Hypothetical protein	chromosome	509387	509632
RGOX1826	GOX0489	Hypothetical protein	chromosome	509689	510030
RGOX1827	GOX0490	Hypothetical protein	chromosome	510018	511514
RGOX3636	GOX2687	Transposase (class II)	chromosome	511554	512630

RGOX1830	GOX0492	Putative regulatory protein	chromosome	512802	513020
RGOX1831	GOX0493	Hypothetical protein	chromosome	513044	514237
RGOX1832	GOX0494	Hypothetical protein	chromosome	514273	515436
RGOX1833	GOX0495	Hypothetical protein	chromosome	515898	515464
RGOX1834	GOX0496	Hypothetical protein	chromosome	516061	521310
RGOX1835	GOX0497	Hypothetical protein	chromosome	521776	521372
RGOX1836	GOX0498	Hypothetical protein	chromosome	522310	521924
RGOX1838	GOX0499	Putative NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	chromosome	522512	523879
RGOX1840	GOX0501	23S rRNA methyltransferase (EC 2.1.1.-)	chromosome	524145	524990
RGOX1841	GOX0502	NAD(P)H-dependent 2-cyclohexen-1-one reductase	chromosome	526121	525039
RGOX1842	GOX0503	Hypothetical protein	chromosome	527045	526572
RGOX3281	GOX0504	Hypothetical protein	chromosome	527580	527125
RGOX1844	GOX0505	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	chromosome	527495	528460
RGOX1845	GOX0506	Heat shock sigma factor RpoH	chromosome	528708	529598
RGOX1846	GOX0507	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	chromosome	531198	529987
RGOX1847	GOX0508	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	chromosome	532260	531205
RGOX1848	GOX0509	Hypothetical protein	chromosome	532412	532861
RGOX1849	GOX0510	Exodeoxyribonuclease VII large subunit (EC 3.1.11.6)	chromosome	534049	533018
RGOX1851	GOX0511	Hypothetical protein	chromosome	534143	534538
RGOX1852	GOX0512	Amino acid transport protein	chromosome	535532	534549
RGOX1854	GOX0513	Glutamate uptake regulatory protein	chromosome	536359	535901
RGOX1856	GOX0514	NifS-like protein	chromosome	536494	537966
RGOX1857	GOX0515	Hypothetical protein	chromosome	538880	537993
RGOX3500	GOX0516	Uncharacterized PQQ-dependent dehydrogenase 4	chromosome	541128	538960
RGOX1861	GOX0517	Probable transcriptional regulator	chromosome	541870	542760
RGOX1860	GOX0518	Hypothetical protein	chromosome	543118	542741
RGOX3501	GOX0519	Hypothetical outer membrane protein	chromosome	543312	546620
RGOX3576	GOX0520	Secretory lipase	chromosome	548042	546735
RGOX1864	GOX0521	Gamma-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	chromosome	549791	548091
RGOX1865	GOX0522	Transcriptional regulator LysR family	chromosome	549998	550966
RGOX3619	GOX0523	Sugar transporter transmembrane protein	chromosome	550966	552225
RGOX1868	GOX0524	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	552405	554891
RGOX1869	GOX0525	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	555668	554940
RGOX1871	GOX0526	Sulfate permease	chromosome	555646	557490
RGOX1870	GOX0527	Alkylphosphonate uptake protein PhnA	chromosome	557830	557483
RGOX1873	GOX0528	Putative iron-dependent peroxidase	chromosome	557983	558909
RGOX1872	GOX0529	Hypothetical protein	chromosome	559754	558891
RGOX1874	GOX0530	TonB protein	chromosome	560626	559796
RGOX1875	GOX0531	ExbD protein	chromosome	561075	560629
RGOX1876	GOX0532	ExbB protein	chromosome	561807	561085
RGOX1877	GOX0533	Hypothetical protein	chromosome	562543	561971
RGOX1878	GOX0534	Putative O-methyltransferase (EC 2.1.1.6)	chromosome	563177	562605
RGOX1880	GOX0535	Hypothetical protein	chromosome	564007	563285
RGOX1881	GOX0536	Hydroxamate-type ferrisiderophore receptor	chromosome	566405	564087
RGOX1882	GOX0537	Phosphate-binding protein	chromosome	566691	567677
RGOX1883	GOX0538	Porin homolog	chromosome	567771	569222
RGOX1884	GOX0539	Hypothetical protein	chromosome	569328	570242
RGOX1885	GOX0540	Hypothetical protein	chromosome	570507	570319
RGOX1886	GOX0541	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	572621	570492
RGOX1887	GOX0542	Hypothetical metabolite transport protein	chromosome	574023	572692
RGOX1888	GOX0543	Dipeptidase PepQ (EC 3.4.13.9)	chromosome	575281	574130
RGOX1890	GOX0544	Transcriptional regulator TetR family	chromosome	576106	575465
RGOX1891	GOX0545	Putative outer membrane receptor for iron transport	chromosome	576323	578548
RGOX03529	#NV	Hypothetical protein	chromosome	579764	578562
RGOX1893	GOX0547	Hypothetical protein	chromosome	579959	579774
RGOX1894	GOX0548	Hypothetical protein	chromosome	580772	579978
RGOX1895	GOX0549	Hypothetical protein	chromosome	581084	580821
RGOX1896	GOX0550	Hypothetical protein	chromosome	582391	581195
RGOX1898	GOX0551	Putative hydrolase	chromosome	583594	582803
RGOX1899	GOX0552	Hypothetical protein	chromosome	584108	583833
RGOX1901	GOX0553	Hypothetical protein	chromosome	584120	586096
RGOX1902	GOX0554	Heavy-metal ion transporter HslA	chromosome	589198	586124
RGOX1903	GOX0555	Cation efflux protein	chromosome	590371	589211
RGOX1904	GOX0556	Hypothetical protein	chromosome	590967	590371
RGOX1905	GOX0557	Hypothetical protein	chromosome	591665	590928
RGOX1906	GOX2731	Transposase (class IV)	chromosome	592659	591832
RGOX1907	GOX0559	Iron-uptake factor	chromosome	592792	593472
RGOX1908	GOX0560	Diguanylate cyclase	chromosome	593708	595483
RGOX1909	GOX0561	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	597822	595519
RGOX1910	GOX0562	Putative siderophore receptor protein	chromosome	598058	600403
RGOX1912	GOX0563	Hypothetical protein	chromosome	601074	600640
RGOX1913	GOX0564	Cytochrome c precursor	chromosome	601561	601205
RGOX1914	GOX0565	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit (EC 1.10.2.2)	chromosome	601843	602472
RGOX1915	GOX0566	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit (EC 1.10.2.2)	chromosome	602488	603663
RGOX1916	GOX0567	Ubiquinol-cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.2) cytochrome c1	chromosome	603663	604352
RGOX1917	GOX0568	Hypothetical protein	chromosome	604794	604369
RGOX1918	GOX0569	Aldehyde dehydrogenase-like protein	chromosome	605481	604942
RGOX1919	GOX0570	Hypothetical protein	chromosome	605767	606114
RGOX1920	GOX0571	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	606891	606127

RGOX1921	GOX0572	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	608587	606902
RGOX1922	GOX0573	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	chromosome	609568	608645
RGOX3020	GOX0574	Putative peroxiredoxin	chromosome	609677	610321
RGOX1923	GOX0575	Transcriptional regulator ArsR family	chromosome	610321	610701
RGOX1924	GOX0576	Hypothetical protein	chromosome	610832	611086
RGOX1925	GOX0577	Transcriptional regulator	chromosome	611321	612448
RGOX3502	GOX0578	Transposase (IS12528)	chromosome	612484	613200
RGOX1927	GOX0579	Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)	chromosome	613988	613326
RGOX1928	GOX0580	Beta-N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52)	chromosome	616225	614054
RGOX1929	GOX0581	Iron-chelating periplasmic-binding protein	chromosome	617258	616257
RGOX1931	GOX0582	ABC-type Fe3+-siderophore transport system, ATP-binding protein	chromosome	618037	617258
RGOX1932	GOX0583	ABC-type Fe3+-siderophore transport system, permease component	chromosome	619068	618037
RGOX3286	GOX0584	Hypothetical protein	chromosome	619216	619440
RGOX1934	GOX0585	Cytochrome c subunit of aldehyde dehydrogenase	chromosome	619512	620915
RGOX1935	GOX0586	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase, small subunit (EC 1.2.99.3)	chromosome	620902	621375
RGOX1936	GOX0587	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase, large subunit (EC 1.2.99.3)	chromosome	621371	623683
RGOX1937	GOX0588	Hypothetical protein	chromosome	623881	624471
RGOX1938	GOX0589	Lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyl transferase	chromosome	625519	624482
RGOX1939	GOX0590	Hypothetical protein	chromosome	626142	625573
RGOX1940	GOX0591	Zinc protease (EC 3.4.99.-)	chromosome	626272	628983
RGOX1941	GOX0592	Hypothetical protein	chromosome	630174	629137
RGOX1942	GOX0593	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	632475	630226
RGOX3503	GOX0594	Hypothetical protein	chromosome	632691	633395
RGOX1945	GOX0595	Putative glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	636585	633241
RGOX3504	GOX0596	SSU ribosomal protein S1P	chromosome	638542	636833
RGOX1948	GOX0597	Cytidylate kinase (EC 2.7.4.14)	chromosome	639438	638800
RGOX1949	GOX0598	3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.19)	chromosome	640763	639438
RGOX1950	GOX0599	Hypothetical protein	chromosome	640894	641259
RGOX1951	GOX0600	Hypothetical protein	chromosome	641198	641806
RGOX1952	GOX0601	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	642572	641817
RGOX1953	GOX0602	Recombination protein RecR	chromosome	643171	642578
RGOX1954	GOX0603	Hypothetical protein	chromosome	643520	643200
RGOX1956	GOX0604	DNA polymerase III subunit gamma/tau (EC 2.7.7.7)	chromosome	645489	643534
RGOX1957	GOX0605	Gamma-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	chromosome	647555	645759
RGOX1958	GOX0606	Methionine aminopeptidase (EC 3.4.11.18)	chromosome	648352	647555
RGOX1959	GOX0607	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (EC 3.4.16.4)	chromosome	649490	648447
RGOX1961	GOX0608	Hypothetical protein	chromosome	649806	650162
RGOX1962	GOX0609	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	chromosome	650295	652607
RGOX1963	GOX0610	Hypothetical protein	chromosome	653160	652669
RGOX3505	GOX0611	Hypothetical protein	chromosome	653696	653839
RGOX1966	GOX0612	Putative sugar kinase protein (EC 2.7.1.4)	chromosome	654270	655247
RGOX1967	GOX0613	Sugar phosphotransferase system protein	chromosome	656119	655286
RGOX1968	GOX0614	Putative methyltransferase (EC 2.1.1.-)	chromosome	657617	656196
RGOX1969	GOX0615	Ceramide glucosyltransferase (EC 2.4.1.80)	chromosome	658825	657617
RGOX1971	GOX0616	Hypothetical protein	chromosome	659609	658887
RGOX1973	GOX0617	Hypothetical protein	chromosome	659876	661066
RGOX1974	GOX0618	Hemolysin-related protein	chromosome	661224	662513
RGOX1975	GOX0619	Hypothetical protein	chromosome	662960	662529
RGOX1976	GOX0620	Chemotactic signal-response protein CheL	chromosome	663259	662960
RGOX1977	GOX0621	Flagellar P-ring protein precursor	chromosome	664401	663262
RGOX1978	GOX0622	DnaK suppressor protein	chromosome	664630	665046
RGOX1979	GOX0624	Hypothetical protein	chromosome	666100	665411
RGOX1980	GOX0625	Ribonuclease D (EC 3.1.26.3)	chromosome	667426	666239
RGOX1981	GOX0626	Thioredoxin	chromosome	667826	667503
RGOX3506	GOX0627	ATP-dependent nuclease subunit A	chromosome	671486	667914
RGOX1984	GOX0628	Hypothetical protein	chromosome	674533	671486
RGOX1985	GOX0629	Hypothetical protein	chromosome	674979	674533
RGOX1986	GOX0630	Lipopolysaccharide core biosynthesis protein WbcM	chromosome	676122	675046
RGOX1987	GOX0631	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5)	chromosome	676122	677183
RGOX1988	GOX0632	D-amino acid dehydrogenase small subunit (EC 1.4.99.1)	chromosome	677277	678530
RGOX1989	GOX0633	Hypothetical protein	chromosome	678558	679598
RGOX1991	GOX0634	Hypothetical protein	chromosome	679388	679993
RGOX1990	GOX0635	Hypothetical protein	chromosome	680247	679900
RGOX1992	GOX0636	GTP-binding protein	chromosome	682277	680460
RGOX1993	GOX0637	Hypothetical protein	chromosome	682448	682933
RGOX1994	GOX0638	Aminoglycoside N3-acetyltransferase	chromosome	682945	683751
RGOX1995	GOX0639	Hypothetical protein	chromosome	684876	683926
RGOX1996	GOX0640	Hypothetical protein	chromosome	685331	684783
RGOX1998	GOX0641	Hydroxamate-type ferrisiderophore receptor	chromosome	688089	685900
RGOX1999	GOX0642	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	688724	688221
RGOX2000	GOX0643	Hypothetical protein	chromosome	690004	688742
RGOX2001	GOX0644	Putative 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	690925	690089
RGOX2002	GOX0645	Histidine kinase-response regulator hybrid protein (EC 2.7.3.-)	chromosome	694634	691005
RGOX2003	GOX0646	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	694810	695601
RGOX2004	GOX0647	Hypothetical protein	chromosome	697513	695621
RGOX2005	GOX0648	Transcriptional regulator LysR family	chromosome	698459	697557
RGOX2006	GOX0649	Sugar-proton symporter	chromosome	698782	700197
RGOX2007	GOX0650	Hypothetical protein	chromosome	700455	700273
RGOX2008	GOX0651	Hypothetical protein	chromosome	702108	700564

RGOX2009	GOX0652	Xanthine dehydrogenase Xdh C protein (assists in molybdopterin insertion)	chromosome	703086	702217
RGOX2010	GOX0653	Xanthine dehydrogenase XdhB protein (EC 1.1.1.204)	chromosome	705404	703092
RGOX2011	GOX0654	Xanthine dehydrogenase XdhA protein (EC 1.1.1.204)	chromosome	706857	705400
RGOX2012	GOX0655	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein OppF	chromosome	707892	706963
RGOX2013	GOX0656	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein OppD	chromosome	708842	707892
RGOX2014	GOX0657	Oligopeptide ABC transporter permease protein OppB	chromosome	709815	708835
RGOX2015	GOX0658	Oligopeptide ABC transporter permease protein OppC	chromosome	710783	709815
RGOX2016	GOX0659	Hypothetical protein	chromosome	711129	710869
RGOX2017	GOX0660	Cysteine synthase (EC 4.2.99.8)	chromosome	711386	712378
RGOX2018	GOX0661	Hypothetical protein	chromosome	712506	713171
RGOX2019	GOX0662	Cation-transporting ATPase (EC 3.6.3.-)	chromosome	715571	713199
RGOX2020	GOX0663	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	716083	715640
RGOX2022	GOX0664	Transposase	chromosome	716583	717470
RGOX2023	GOX0665	Outer membrane receptor for ferric iron uptake	chromosome	717976	717473
RGOX2024	GOX0666	Outer membrane receptor for ferric iron uptake	chromosome	719426	718230
RGOX2025	GOX0667	Copper resistance protein CopZ	chromosome	719757	719548
RGOX2026	GOX0668	Hypothetical protein	chromosome	720066	720458
RGOX2027	GOX0669	Copper resistance protein CopA	chromosome	720549	722354
RGOX2028	GOX0670	Copper resistance protein CopB	chromosome	722354	723124
RGOX2029	GOX0671	Hypothetical protein	chromosome	723163	723477
RGOX2030	GOX0672	Hypothetical protein	chromosome	723835	723497
RGOX2031	GOX0673	Ferrous iron transport protein A (FeoA)	chromosome	724246	724485
RGOX2032	GOX0674	Ferrous iron transport protein B (FeoB)	chromosome	724494	726359
RGOX2033	GOX0675	Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	chromosome	728295	726577
RGOX2034	GOX0676	Iron-regulated sigma factor/transcriptional regulator	chromosome	728411	728881
RGOX2035	GOX0677	Iron transport regulator protein/ sensor kinase	chromosome	728897	729811
RGOX2036	GOX0678	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	729914	732595
RGOX2037	GOX0679	Conserved protein of the SAM superfamily	chromosome	732780	734513
RGOX2038	GOX0680	Thiopurine S-methyltransferase (EC 2.1.1.67)	chromosome	735182	734523
RGOX2040	GOX0681	Bacteriophage-type DNA helicase	chromosome	735280	736599
RGOX2039	GOX0682	Predicted Na ⁺ -dependent transporter	chromosome	737494	736577
RGOX2041	GOX0683	Sensor histidine kinase	chromosome	737759	738961
RGOX2042	GOX0684	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	739106	741214
RGOX03507	#NV	Putative sugar efflux protein	chromosome	741429	742607
RGOX2045	GOX0205	Transposase (class I)	chromosome	742691	743647
RGOX2046	GOX0687	Hypothetical protein	chromosome	744171	743650
RGOX2047	GOX0688	Putative efflux protein	chromosome	745227	744262
RGOX2050	GOX0689	Probable outer membrane efflux lipoprotein	chromosome	747157	745694
RGOX2051	GOX0690	Acriflavin resistance protein B (multidrug efflux system)	chromosome	750330	747157
RGOX2052	GOX0691	Acriflavin resistance protein A (multidrug efflux system)	chromosome	751533	750340
RGOX2053	GOX0692	Transcriptional regulator TetR family	chromosome	751621	752331
RGOX2054	GOX0693	Hypothetical protein	chromosome	754885	752345
RGOX2055	GOX0694	Hypothetical protein	chromosome	755631	754885
RGOX2056	GOX0695	Hypothetical protein	chromosome	756135	755641
RGOX2057	GOX0696	Flagellar motor switch protein FliM	chromosome	757181	756153
RGOX2058	GOX0697	Flagellar FliL protein	chromosome	757738	757268
RGOX2059	GOX0698	Hypothetical protein	chromosome	757805	759058
RGOX2060	GOX0699	L-asparagine permease	chromosome	759253	760665
RGOX2061	GOX0700	Prolyl oligopeptidase family protein (EC 3.4.21.26)	chromosome	762783	760741
RGOX2062	GOX0701	Phosphate regulon sensor protein PhoR (EC 2.7.3.-)	chromosome	764092	762881
RGOX2063	GOX0702	Phosphate regulon response regulator PhoB	chromosome	764872	764153
RGOX2064	GOX0703	Phosphate transport system protein PhoU	chromosome	765603	764872
RGOX2065	GOX0704	Phosphate transport ATP-binding protein PstB	chromosome	766416	765613
RGOX2066	GOX0705	Phosphate transport system permease protein PstA	chromosome	767309	766440
RGOX2067	GOX0706	Phosphate transport system permease protein PstC	chromosome	768286	767309
RGOX2070	GOX0707	Starvation-inducible DNA-binding protein	chromosome	768661	769197
RGOX2071	GOX0708	Hypothetical protein	chromosome	769731	769267
RGOX2072	GOX0709	Hypothetical protein	chromosome	770444	771046
RGOX2073	GOX0710	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	772156	771089
RGOX2074	GOX0711	Hypothetical protein	chromosome	773448	772459
RGOX2075	GOX0712	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	776348	773637
RGOX2077	GOX0713	Hypothetical protein	chromosome	778356	776587
RGOX2078	GOX0714	HlyD family secretion protein	chromosome	779910	778453
RGOX2079	GOX0715	Probable secretion ATP-binding protein	chromosome	782135	779916
RGOX2080	GOX0716	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	783269	782499
RGOX2081	GOX0717	Transcriptional regulator LysR family	chromosome	783401	784315
RGOX2082	GOX0718	Hypothetical protein	chromosome	784873	785856
RGOX2084	GOX0719	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase (EC 2.6.1.62)	chromosome	786351	787628
RGOX2085	GOX0720	8-Amino-7-oxononanoate synthase (EC 2.3.1.47)	chromosome	787628	788803
RGOX2086	GOX0721	Biotin synthesis protein BioH	chromosome	788803	789426
RGOX2087	GOX0722	Biotin synthesis protein BioC	chromosome	789416	790219
RGOX2088	GOX0723	Dethiobiotin synthetase BioD (EC 6.3.3.3)	chromosome	790219	790866
RGOX2089	GOX0724	Periplasmic glucan biosynthesis protein MdoG	chromosome	791032	792597
RGOX2090	GOX0725	Periplasmic glucan biosynthesis protein MdoH	chromosome	792576	794759
RGOX2091	GOX0726	Hypothetical protein	chromosome	795514	794843
RGOX2093	GOX0727	Oligopeptidase B (EC 3.4.21.83)	chromosome	795730	797727
RGOX2094	GOX0728	Putative multidrug resistance efflux pump	chromosome	798789	797842
RGOX2095	GOX0729	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	799042	798845
RGOX2096	GOX0730	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	801045	799039

RGOX2098	GOX0731	Hypothetical protein	chromosome	801033	801770
RGOX2099	GOX0732	LSU ribosomal protein L36P	chromosome	801872	801994
RGOX2100	GOX0733	Hypothetical protein	chromosome	802039	802707
RGOX2101	GOX0734	Hypothetical protein	chromosome	802802	803041
RGOX2102	GOX0735	Primosomal replication factor Y, primosomal protein N'	chromosome	805304	803067
RGOX2103	GOX0736	Site-specific recombinase, integrase/recombinase RipX, XerC	chromosome	805338	806300
RGOX2104	GOX0737	Hypothetical protein	chromosome	806300	807217
RGOX2105	GOX0738	Non-heme chloroperoxidase (EC 1.11.1.10)	chromosome	808160	807306
RGOX2106	GOX0739	Transcriptional regulator, Mer family	chromosome	808236	808742
RGOX2107	GOX0740	Putative protease	chromosome	809434	808745
RGOX2108	GOX0741	Hypothetical protein	chromosome	809586	810512
RGOX2109	GOX0742	Hypothetical protein	chromosome	811222	810701
RGOX2110	GOX0743	Ammonium transporter AmtB	chromosome	812653	811298
RGOX2111	GOX0744	Nitrogen regulatory protein P-II, GlnK	chromosome	813000	812656
RGOX2112	GOX0745	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	814335	813142
RGOX2115	GOX0746	FAD-dependent monooxygenase	chromosome	814874	816079
RGOX2116	GOX0747	Serine O-acetyltransferase CysE (EC 2.3.1.30)	chromosome	816079	816858
RGOX2117	GOX0748	Aldose 1-epimerase (EC 5.1.3.3)	chromosome	818068	816911
RGOX2118	GOX0749	Putative lipoprotein	chromosome	818385	819200
RGOX2119	GOX0750	Hypothetical protein	chromosome	819214	819804
RGOX2120	GOX0751	Hypothetical protein	chromosome	819900	821489
RGOX2121	GOX0752	Putative acetyltransferase (EC 2.3.1.-)	chromosome	822002	821508
RGOX2122	GOX0753	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	823756	822080
RGOX2123	GOX0755	Hypothetical protein in adhS 5' region	chromosome	824074	826290
RGOX2124	GOX0756	Alcohol dehydrogenase 15 kDa subunit	chromosome	826447	826845
RGOX2125	GOX0757	Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)	chromosome	827024	827542
RGOX2126	GOX0758	Porin similar to RpfN protein	chromosome	828173	829366
RGOX3620	GOX0759	Hypothetical protein	chromosome	830750	829377
RGOX2128	GOX0762	Thioredoxin	chromosome	831401	832351
RGOX2129	GOX0763	ATP-dependent protease La (EC 3.4.21.53)	chromosome	832359	833030
RGOX2131	GOX0764	Hypothetical protein	chromosome	833036	833212
RGOX2130	GOX0765	Methyl-accepting chemotaxis protein	chromosome	833411	833226
RGOX2132	GOX0766	Methyl-accepting chemotaxis protein	chromosome	834784	833411
RGOX2133	GOX0767	Hypothetical protein	chromosome	835368	836027
RGOX2134	GOX0768	Transcriptional regulator	chromosome	836672	836037
RGOX2135	GOX0769	Apolipoprotein N-acyltransferase (EC 2.3.1.-)	chromosome	838198	836678
RGOX2136	GOX0770	Hypothetical protein	chromosome	839105	838278
RGOX2137	GOX0771	Ferric uptake regulation protein	chromosome	839761	839231
RGOX2139	GOX0772	Transcriptional regulator	chromosome	840273	839869
RGOX2140	GOX2731	Transposase (class IV)	chromosome	841360	840533
RGOX2141	GOX0774	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase (EC 2.3.1.128)	chromosome	841952	841512
RGOX2142	GOX0775	Hypothetical protein	chromosome	842575	841952
RGOX2143	GOX0776	Putative oxidoreductase (NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase)	chromosome	843186	842569
RGOX2144	GOX0777	NifU protein	chromosome	843828	843193
RGOX2145	GOX0778	Two component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	845174	843873
RGOX3531	GOX0779	Two component response regulator	chromosome	846023	845328
RGOX2146	GOX0780	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	chromosome	846194	847267
RGOX2147	GOX0781	Outer membrane channel protein	chromosome	848735	847323
RGOX2150	GOX0782	Transcriptional regulator, TetR family	chromosome	848996	849670
RGOX2149	GOX0783	Multidrug resistance protein B	chromosome	851244	849670
RGOX2151	GOX0784	Multidrug resistance protein A	chromosome	852347	851244
RGOX2152	GOX0785	DNA polymerase related protein (EC 2.7.7.7)	chromosome	854017	852521
RGOX2153	GOX0786	Hypothetical protein	chromosome	855246	854017
RGOX2154	GOX0787	Flagellin B	chromosome	855425	856897
RGOX2155	GOX0788	Flagellin assembly protein	chromosome	857044	857463
RGOX2156	GOX0789	Peptidase	chromosome	858356	857610
RGOX2157	GOX0790	Peptidase	chromosome	859609	858557
RGOX2158	GOX0791	5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.7.99.5)	chromosome	860395	859646
RGOX2159	GOX0792	Methylene-THF dehydrogenase (EC 1.5.1.5) / Methenyl-THF cyclohydrolase (EC 3.5.4.9)	chromosome	861306	860395
RGOX2160	GOX0793	Low-specificity threonine aldolase (EC 4.1.2.5)	chromosome	861318	862451
RGOX2161	GOX0794	L-serine deaminase /L-threonine deaminase (EC 4.2.1.13)	chromosome	862455	863810
RGOX2162	GOX0795	Hypothetical protein	chromosome	864935	863823
RGOX2163	GOX0796	Hypothetical protein	chromosome	865184	866491
RGOX3294	GOX0797	Hypothetical protein	chromosome	866741	866505
RGOX2164	GOX0798	Serine protease, HtrA/DegQ/DegS family (EC 3.4.21.-)	chromosome	868391	866835
RGOX2165	GOX0799	Cytosine deaminase (EC 3.5.4.1)	chromosome	869016	868513
RGOX2166	GOX0800	Possible amidotransferase	chromosome	869026	869754
RGOX3508	GOX0801	tRNA pseudouridine synthase A (EC 4.2.1.70)	chromosome	869754	870545
RGOX2169	GOX0802	Hypothetical protein	chromosome	870552	871148
RGOX2170	GOX0803	Cell division protein FtsK	chromosome	871307	873985
RGOX2172	GOX0804	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase A (EC 4.2.1.70)	chromosome	873978	874772
RGOX2171	GOX0805	Hypothetical protein	chromosome	875503	874769
RGOX2173	GOX0806	Hypothetical protein	chromosome	875949	875527
RGOX3509	GOX0807	Hypothetical protein	chromosome	876513	876094
RGOX2175	GOX0808	Galactose-proton symporter	chromosome	878028	876604
RGOX2176	GOX0809	L-asparaginase II	chromosome	879136	878120
RGOX2177	GOX0810	Hypothetical protein	chromosome	879622	879173
RGOX2178	GOX0811	Transcriptional regulator Fur family	chromosome	880192	879632
RGOX2180	GOX0812	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (EC 2.7.3.9)	chromosome	882011	880245

RGOX2181	GOX0813	Phosphocarrier protein HPr (EC 2.7.1.69)	chromosome	882408	882112
RGOX2182	GOX0814	PTS system, IIA component (EC 2.7.1.69)	chromosome	882862	882293
RGOX2183	GOX0815	Hypothetical protein	chromosome	883824	882862
RGOX2184	GOX0816	HPr kinase (EC 2.7.3.-)/phosphatase-related protein	chromosome	884584	883877
RGOX2185	GOX0817	Hypothetical protein	chromosome	884946	885335
RGOX2186	GOX0818	Sensor protein ChvG (EC 2.7.3.-)	chromosome	887311	885476
RGOX2187	GOX0819	Two component response regulator ChvI	chromosome	888088	887321
RGOX2188	GOX0820	GrpE protein (HSP-70 cofactor)	chromosome	888251	888913
RGOX2189	GOX0821	Lipopolysaccharide core biosynthesis protein	chromosome	889029	889946
RGOX2190	GOX0822	Hypothetical protein	chromosome	889967	890998
RGOX2191	GOX0823	Threonyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.3)	chromosome	891115	893049
RGOX2193	GOX0824	Bacterial protein translation initiation factor 3 (IF-3)	chromosome	893206	893724
RGOX2194	GOX0825	Hypothetical protein	chromosome	895316	893850
RGOX2195	GOX0826	Hypothetical protein	chromosome	895746	895402
RGOX2196	GOX0827	Hypothetical protein	chromosome	896503	895778
RGOX2197	GOX0828	Hypothetical protein	chromosome	896892	896551
RGOX2198	GOX0829	Two component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	898384	896954
RGOX2199	GOX0830	Two component response regulator	chromosome	899071	898394
RGOX3510	GOX0831	Serine protease (similar to DO protease)	chromosome	900639	899386
RGOX2203	GOX0832	ATP-dependent helicase	chromosome	902994	900730
RGOX2205	GOX0833	Cold shock protein	chromosome	903533	903330
RGOX2206	GOX0834	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	904691	903864
RGOX2207	GOX0835	Adenine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.7)	chromosome	905242	904706
RGOX2209	GOX0836	Hypothetical protein	chromosome	905693	905340
RGOX2211	GOX0837	Putative drug transport transmembrane protein	chromosome	906989	905724
RGOX2212	GOX0838	Hypothetical protein	chromosome	907820	907038
RGOX2213	GOX0839	Hypothetical protein	chromosome	907942	908763
RGOX2214	GOX0840	Hypothetical protein	chromosome	908818	909201
RGOX2215	GOX0841	Hypothetical protein	chromosome	909285	909560
RGOX2216	GOX0842	Hypothetical protein	chromosome	910215	909574
RGOX2217	GOX0843	ADP-ribose pyrophosphatase (EC 3.6.1.13)	chromosome	910739	910164
RGOX2218	GOX0844	DNA polymerase IV, damage-inducible protein P (EC 2.7.7.7)	chromosome	910790	911857
RGOX2219	GOX0845	Hypothetical protein	chromosome	911954	912397
RGOX2220	GOX0846	Probable MFS family transport protein	chromosome	912529	913719
RGOX2221	GOX0847	Predicted Rossmann fold nucleotide-binding protein	chromosome	913719	914306
RGOX2222	GOX0848	Hypothetical protein	chromosome	914813	914340
RGOX2223	GOX0849	NADPH-dependent L-sorbose reductase	chromosome	915033	916505
RGOX2224	GOX0850	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.7)	chromosome	917890	916637
RGOX2225	GOX0851	Deoxycytidine triphosphate deaminase (EC 3.5.4.13)	chromosome	918480	917932
RGOX2226	GOX0852	Permease	chromosome	919487	918576
RGOX2227	GOX0853	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	chromosome	920847	919666
RGOX3621	GOX0854	D-Sorbitol dehydrogenase subunit SldA	chromosome	923267	921039
RGOX2231	GOX0855	D-Sorbitol dehydrogenase subunit SldB	chromosome	923647	923270
RGOX2232	GOX0856	Hypothetical protein	chromosome	924953	923802
RGOX3512	GOX0857	Chaperone protein DnaK	chromosome	925224	927125
RGOX2235	GOX0858	Chaperone protein DnaJ	chromosome	927271	928410
RGOX2236	GOX0859	Shikimate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.25)	chromosome	929313	928468
RGOX2237	GOX0860	CDG1D protein (control of cellular turnover of cyclic di-GMP)	chromosome	929850	929404
RGOX2238	GOX0861	Flavohemoprotein (EC 1.6.99.7) (EC 1.14.12.17)	chromosome	929931	931109
RGOX2239	GOX0862	Acyl carrier protein phosphodiesterase (EC 3.1.4.14)	chromosome	931721	931116
RGOX3302	GOX0863	Hypothetical protein	chromosome	931813	932223
RGOX2240	GOX0864	Dihydrodipicolinate reductase (EC 1.3.1.26)	chromosome	932251	932994
RGOX2241	GOX0865	Xylitol Dehydrogenase	chromosome	933849	933064
RGOX2242	GOX0866	S-adenosylmethionine synthetase (EC 2.5.1.6)	chromosome	934151	935332
RGOX2244	GOX0867	SAM-dependent methyltransferase (EC 2.1.1.-)	chromosome	935639	936043
RGOX2245	GOX0868	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreduct./ putative oxidoreduct. (EC 1.5.5.1)	chromosome	936085	937722
RGOX3513	GOX0869	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	chromosome	937832	938578
RGOX2248	GOX0870	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	chromosome	938581	939483
RGOX2249	GOX0871	Signal peptidase I (EC 3.4.21.89)	chromosome	939623	940327
RGOX2250	GOX0873	Levansucrase (EC 2.4.1.10)	chromosome	941892	940585
RGOX2251	GOX0874	Ferrochelatase (EC 4.99.1.1)	chromosome	943308	942280
RGOX2252	GOX0875	AtaE protein	chromosome	943768	944187
RGOX2253	GOX0876	Hypothetical protein	chromosome	945302	944220
RGOX2254	GOX0877	Hypothetical protein	chromosome	946219	945335
RGOX2255	GOX0878	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.11)	chromosome	947287	946226
RGOX2256	GOX0879	Hypothetical protein related to SanF from Streptomyces ansochromogenes	chromosome	948000	947314
RGOX2257	GOX0880	Hypothetical protein	chromosome	948353	948033
RGOX2259	GOX0881	Arylesterase	chromosome	948546	949505
RGOX2260	GOX0882	2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.2)	chromosome	949641	952295
RGOX2261	GOX0884	Peptidyl-tRNA hydrolase (EC 3.1.1.29)	chromosome	952864	953283
RGOX2262	GOX0885	Ferric enterobactin receptor	chromosome	953567	956206
RGOX3101	GOX0886	Hypothetical protein	chromosome	959590	956366
RGOX2266	GOX0887	DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3)	chromosome	959751	962522
RGOX2267	GOX0888	Phosphopantetheine adenyltransferase (EC 2.7.7.3)	chromosome	962506	963033
RGOX2268	GOX0889	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	chromosome	963068	963550
RGOX3305	GOX0890	Hypothetical protein	chromosome	963743	963916
RGOX2269	GOX0891	Single-strand DNA binding protein	chromosome	964581	964018
RGOX2271	GOX0892	Excinuclease ABC subunit A	chromosome	964714	967755
RGOX2273	GOX0893	Transposase (class I)	chromosome	968062	969018

RGOX2274	GOX0894	Hypothetical protein	chromosome	969347	969021
RGOX2275	GOX0895	Hypothetical protein	chromosome	970285	969347
RGOX2277	GOX0896	Hypothetical protein	chromosome	970945	972219
RGOX2276	GOX0897	Putative glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	973405	972161
RGOX2278	GOX0898	Guanine deaminase (EC 3.5.4.3)	chromosome	973760	975085
RGOX2279	GOX0899	Transposase (class I)	chromosome	976124	975168
RGOX2280	GOX0900	Hypothetical protein	chromosome	976295	977272
RGOX2281	GOX0901	Xanthine/uracil permease	chromosome	978798	977398
RGOX2282	GOX0902	Hypothetical protein	chromosome	979140	978811
RGOX2283	GOX0903	Hypothetical protein	chromosome	979715	979140
RGOX2285	GOX0904	Hypothetical protein	chromosome	980557	979661
RGOX2286	GOX0905	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	982017	980575
RGOX2287	GOX0906	Transcriptional regulator LysR family	chromosome	982191	983111
RGOX2288	GOX0907	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	983288	985612
RGOX2289	GOX0908	Hypothetical protein	chromosome	985729	986256
RGOX2290	GOX0909	Thiol:disulfide interchange protein DsbD	chromosome	988435	986336
RGOX2291	GOX0893	Transposase (class I)	chromosome	989507	988551
RGOX2292	GOX0911	Hypothetical protein	chromosome	990709	989582
RGOX2293	GOX0912	Hypothetical protein	chromosome	990780	991166
RGOX2294	GOX0913	Putative transport protein	chromosome	991308	992804
RGOX2295	GOX0914	Putative transport protein	chromosome	992294	993814
RGOX2298	GOX0915	Hypothetical protein	chromosome	993991	994611
RGOX2299	GOX0916	Hypothetical protein	chromosome	995920	994697
RGOX2300	GOX0917	Hypothetical protein	chromosome	996774	995920
RGOX2302	GOX0918	Hypothetical protein	chromosome	996896	997390
RGOX2303	GOX0919	Putative efflux protein	chromosome	999140	997896
RGOX2305	GOX0920	Phosphate-binding periplasmic protein precursor	chromosome	1000315	999290
RGOX2306	GOX0921	Putative polyphosphate-selective porin O	chromosome	1000647	1002335
RGOX2308	GOX0922	Hypothetical protein	chromosome	1002481	1003017
RGOX2309	GOX0923	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1003134	1005101
RGOX2310	GOX0924	UDP-glucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	chromosome	1005180	1006502
RGOX2311	GOX0925	Sugar-proton symporter	chromosome	1007921	1006518
RGOX2312	GOX0926	Sulfate adenyltransferase subunit 1 / adenylsulfate kinase (EC 2.7.7.4) (EC 2.7.1.25)	chromosome	1010026	1008149
RGOX2313	GOX0927	Sulfate adenyltransferase subunit 2 (EC 2.7.7.4)	chromosome	1010886	1010032
RGOX2314	GOX0928	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase (EC 1.8.99.4)	chromosome	1011581	1010904
RGOX2315	GOX0929	Hypothetical protein	chromosome	1012751	1011729
RGOX2316	GOX0930	Psp operon transcriptional activator PspF	chromosome	1014074	1013025
RGOX2317	GOX0931	Phage shock protein A	chromosome	1014189	1014869
RGOX2308	GOX0932	Hypothetical protein	chromosome	1014902	1015138
RGOX2318	GOX0933	Hypothetical protein	chromosome	1015138	1016469
RGOX2319	GOX0934	Hypothetical protein	chromosome	1016476	1017840
RGOX2320	GOX0935	ABC transporter permease protein	chromosome	1017915	1018697
RGOX2321	GOX0936	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	1018697	1019497
RGOX2323	GOX0937	DNA repair protein Rada	chromosome	1019791	1021272
RGOX2324	GOX0938	Hypothetical protein	chromosome	1021453	1023273
RGOX2325	GOX0939	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1023297	1025258
RGOX2326	GOX0940	Hypothetical protein	chromosome	1026959	1025271
RGOX2327	GOX0941	Hypothetical protein	chromosome	1027646	1027062
RGOX2328	GOX0942	Hypothetical protein	chromosome	1027640	1030312
RGOX2329	GOX0943	Hypothetical protein	chromosome	1030427	1030987
RGOX2330	GOX0944	Hypothetical protein	chromosome	1030987	1031499
RGOX2331	GOX0945	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	1032145	1035417
RGOX2332	GOX0946	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1036795	1035563
RGOX2333	GOX0947	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (EC 3.2.2.1)	chromosome	1037802	1036837
RGOX2334	GOX0948	Hypothetical protein	chromosome	1038050	1037802
RGOX2336	GOX0949	Putative secreted protein	chromosome	1038233	1039435
RGOX2337	GOX0950	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1039519	1040319
RGOX2338	GOX0951	Hypothetical protein similar to nodulation factor NalG	chromosome	1040403	1043705
RGOX2339	GOX0952	Flagella basal body P ring formation protein FlgA	chromosome	1044734	1043745
RGOX2340	GOX0953	Flagellar basal-body rod protein FlgG	chromosome	1045528	1044740
RGOX2341	GOX0954	Flagellar basal-body rod protein FlgF	chromosome	1046303	1045566
RGOX2342	GOX0955	Hypothetical protein	chromosome	1047567	1046389
RGOX2343	GOX0956	Probable transcriptional regulator	chromosome	1048058	1047594
RGOX2344	GOX0957	Putative chloride channel protein	chromosome	1049936	1048161
RGOX2345	GOX0958	Putative esterase/lipase	chromosome	1050104	1050868
RGOX2346	GOX0959	Hypothetical protein	chromosome	1051093	1051818
RGOX2347	GOX0960	Sensory box/GGDEF family protein	chromosome	1052031	1054391
RGOX2348	GOX0961	DNA-3-methyladenine glycosylase (EC 3.2.2.21)	chromosome	1055069	1054413
RGOX2349	GOX0962	Hypothetical protein	chromosome	1055565	1056413
RGOX2350	GOX0963	Hypothetical protein	chromosome	1056494	1057426
RGOX2351	GOX0964	Ribose-phosphate pyrophosphokinase (EC 2.7.6.1)	chromosome	1057570	1058499
RGOX2352	GOX0965	Probable phosphoglycerate mutase 2 (EC 5.4.2.1)	chromosome	1058552	1059208
RGOX2353	GOX0966	Hypothetical protein	chromosome	1059246	1061114
RGOX2354	GOX0967	Hypothetical protein	chromosome	1061153	1062571
RGOX2355	GOX0968	Transposase (IS12528)	chromosome	1063388	1062594
RGOX2356	GOX0969	Hypothetical protein	chromosome	1063573	1065534
RGOX2357	GOX0970	Outer membrane channel lipoprotein	chromosome	1067182	1065665
RGOX2358	GOX0971	Cation efflux system protein CzcA	chromosome	1070289	1067182
RGOX2359	GOX0972	Cation efflux system protein CzcB	chromosome	1071444	1070311

RGOX2360	GOX0973	Outer membrane channel lipoprotein	chromosome	1072540	1071725
RGOX2362	GOX0974	Transcriptional regulator AadR (cyclic AMP receptor protein)	chromosome	1072686	1073405
RGOX2363	GOX0975	Hypothetical protein	chromosome	1073483	1073914
RGOX2364	GOX0976	Deoxyribodipyrimidine photolyase (EC 4.1.99.3)	chromosome	1075407	1073971
RGOX2365	GOX0977	Hypothetical protein	chromosome	1075729	1076073
RGOX2366	GOX0978	Bifunctional riboflavin biosynthesis protein RibD (EC 3.5.4.26) (EC 1.1.1.193)	chromosome	1076238	1077284
RGOX2367	GOX0979	Riboflavin synthase alpha chain (EC 2.5.1.9)	chromosome	1077269	1077904
RGOX2368	GOX0980	3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II (EC 3.5.4.25)	chromosome	1077904	1079154
RGOX2369	GOX0981	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase (EC 2.5.1.9)	chromosome	1079154	1079630
RGOX2371	GOX0982	Hypothetical protein	chromosome	1079773	1080984
RGOX2370	GOX0983	Coenzyme PQQ synthesis protein E	chromosome	1082054	1080981
RGOX3312	GOX0984	Coenzyme PQQ synthesis protein D	chromosome	1082341	1082054
RGOX2372	GOX0985	Coenzyme PQQ synthesis protein C	chromosome	1083057	1082341
RGOX2373	GOX0986	Coenzyme PQQ synthesis protein B	chromosome	1083968	1083057
RGOX3627	GOX0987	Coenzyme PQQ synthesis protein A (Pyrroloquinoline quinonebiosynthesis protein A)	chromosome	1084164	1084087
RGOX2374	GOX0988	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1084360	1085616
RGOX2375	GOX0989	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8)	chromosome	1085825	1086448
RGOX2376	GOX0990	ATP phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.17)	chromosome	1086596	1087318
RGOX2377	GOX0991	Histidinol dehydrogenase (EC 1.1.1.23)	chromosome	1087321	1088610
RGOX2378	GOX0992	General secretion protein G	chromosome	1089129	1088686
RGOX2380	GOX0993	BfpH protein (involved in biogenesis of type IV pili)	chromosome	1089225	1089632
RGOX2381	GOX0994	Acid phosphatase (EC 3.1.3.2)	chromosome	1091419	1089785
RGOX2382	GOX0995	Hypothetical protein	chromosome	1091865	1091614
RGOX3514	GOX0996	Transposase (class II)	chromosome	1093079	1092003
RGOX2384	GOX0997	Hypothetical protein	chromosome	1093406	1093119
RGOX2385	GOX0998	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1094824	1093397
RGOX2386	GOX0999	Putative glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1095366	1096412
RGOX2387	GOX1000	Hypothetical protein	chromosome	1096468	1096905
RGOX2388	GOX1001	ATP-dependent RNA helicase	chromosome	1097035	1098330
RGOX2390	GOX1002	Bacterial Protein Translation Initiation Factor 1 (IF-1)	chromosome	1098529	1098744
RGOX2391	GOX1003	Septum formation associated protein (Maf-like protein)	chromosome	1098761	1099414
RGOX2392	GOX1004	Hypothetical protein	chromosome	1099414	1100454
RGOX2393	GOX1006	Hypothetical protein	chromosome	1100945	1101466
RGOX2394	GOX1007	Hypothetical protein	chromosome	1101610	1102068
RGOX2395	GOX1008	Hypothetical protein	chromosome	1102187	1102813
RGOX2396	GOX1009	Hypothetical protein	chromosome	1102889	1103896
RGOX2397	GOX1010	Levanase precursor (EC 3.2.1.65)	chromosome	1105890	1103953
RGOX2399	GOX1011	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1105988	1107007
RGOX2398	GOX1012	Ferrichrome ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	1107705	1106938
RGOX2400	GOX1013	Ferrichrome ABC transporter permease protein	chromosome	1108702	1107719
RGOX2401	GOX1014	Ferrichrome binding protein of ABC transporter	chromosome	1109532	1108702
RGOX2402	GOX1015	TonB-dependent receptor of ferrichrome transport system	chromosome	1111522	1109564
RGOX2404	GOX1016	Hypothetical protein	chromosome	1112034	1112798
RGOX2405	GOX1017	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	1113025	1115559
RGOX2406	GOX1018	Hypothetical protein	chromosome	1115719	1116219
RGOX2407	GOX1019	Putative exonuclease (EC 3.1.11.-)	chromosome	1116273	1117508
RGOX2408	GOX1020	Hypothetical protein	chromosome	1117511	1119481
RGOX2409	GOX1021	Hypothetical protein	chromosome	1119497	1120918
RGOX2410	GOX1022	Transcriptional regulator	chromosome	1121134	1122009
RGOX2411	GOX1023	Bifunctional protein RfaE (involved in ADP-L-glycero-D-manno-heptose synthesis)	chromosome	1123467	1122031
RGOX2412	GOX1024	Chaperone protein HtpG	chromosome	1125469	1123601
RGOX2413	GOX1025	Flagellar hook-associated protein 3 FlgL	chromosome	1126597	1125539
RGOX2414	GOX1026	Flagellar hook-associated protein 1 FlgK	chromosome	1128129	1126603
RGOX2415	GOX1027	Flagellar hook protein FlgE	chromosome	1129390	1128158
RGOX2416	GOX1028	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1129608	1130990
RGOX2417	GOX1029	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1132001	1131066
RGOX2418	GOX2692	Transposase (IS12528)	chromosome	1133211	1132390
RGOX2419	GOX1031	Hypothetical protein	chromosome	1133295	1133675
RGOX3515	GOX1032	Acyl-peptide hydrolase-like protein	chromosome	1135047	1133740
RGOX2421	GOX1033	Hypothetical protein	chromosome	1135162	1136406
RGOX2422	GOX1034	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1136433	1137401
RGOX2423	GOX1035	Hypothetical protein	chromosome	1137968	1137525
RGOX2424	GOX1036	Putative phosphatase	chromosome	1138669	1137968
RGOX2425	GOX1037	Uroporphyrinogen decarboxylase (EC 4.1.1.37)	chromosome	1139727	1138669
RGOX2426	GOX1038	Septum formation associated protein (Maf-like protein)	chromosome	1140081	1140689
RGOX2427	GOX1040	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	chromosome	1140990	1142129
RGOX2428	GOX1041	Hypothetical protein	chromosome	1142077	1142691
RGOX2429	GOX1042	Putative transcriptional regulator	chromosome	1143222	1142749
RGOX2430	GOX1043	BfpH protein (involved in biogenesis of type IV pili)	chromosome	1143330	1143734
RGOX2431	GOX1044	ABC transporter substrate binding protein	chromosome	1143814	1144695
RGOX2432	GOX1045	Metal ABC transport system ATP-binding protein	chromosome	1144685	1145371
RGOX2433	GOX1046	Metal ABC transport system permease protein	chromosome	1145361	1146164
RGOX2434	GOX1047	Sugar-proton symporter	chromosome	1146417	1147898
RGOX2436	GOX1048	Hypothetical protein	chromosome	1147937	1148374
RGOX2435	GOX1049	Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis (EC 2.4.1.-)	chromosome	1149307	1148372
RGOX2437	GOX1050	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (EC 1.1.1.133)	chromosome	1150312	1149422
RGOX2438	GOX1051	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (EC 5.1.3.13)	chromosome	1150884	1150324
RGOX2440	GOX1052	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase, C-terminus (EC 2.7.7.24)	chromosome	1151295	1150990
RGOX2441	GOX1053	dTDP-glucose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.46)	chromosome	1152929	1151877

RGOX2442	GOX1054	Hypothetical protein	chromosome	1153128	1155173
RGOX2444	GOX1055	Hypothetical protein	chromosome	1155173	1155856
RGOX3542	GOX1056	Hypothetical protein	chromosome	1156843	1155908
RGOX2445	GOX1057	Transposase (class I)	chromosome	1156949	1157905
RGOX2446	GOX1058	Hypothetical protein	chromosome	1158029	1159204
RGOX2447	GOX1059	Hypothetical protein	chromosome	1159158	1161068
RGOX2448	GOX1060	DNA integration/recombination/inversion protein	chromosome	1161257	1161802
RGOX2449	GOX1062	Chromosome partitioning protein ParB	chromosome	1163571	1162699
RGOX2450	GOX1063	Chromosome partitioning protein ParA	chromosome	1164381	1163581
RGOX2451	GOX1064	Glucose inhibited division protein B	chromosome	1164952	1164374
RGOX2452	GOX1065	Glucose inhibited division protein A	chromosome	1166805	1164952
RGOX2453	GOX1066	tRNA modification GTPase	chromosome	1168122	1166812
RGOX2454	GOX1067	Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit precursor	chromosome	1169688	1168255
RGOX2455	GOX1068	Alcohol dehydrogenase large subunit (membrane-bound, PQQ-linked) (EC 1.1.99.8)	chromosome	1171991	1169721
RGOX2456	GOX1069	O6-methylguanine-DNA methyltransferase (EC 2.1.1.63)	chromosome	1172455	1172898
RGOX2457	GOX1070	Transcription termination factor Rho	chromosome	1174288	1172990
RGOX2458	GOX1071	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.1-)	chromosome	1176112	1174568
RGOX2459	GOX1072	Hypothetical protein	chromosome	1176756	1176112
RGOX2460	GOX1073	Dihydropyrimidinase succinyl transferase (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogen. (EC 2.3.1.61)	chromosome	1176960	1178066
RGOX2461	GOX1074	Hypothetical protein	chromosome	1178186	1179193
RGOX2462	GOX1075	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	1179340	1181601
RGOX2463	GOX1076	Periplasmic phosphoanhydride phosphohydrolase	chromosome	1181601	1182773
RGOX2464	GOX1077	Hypothetical protein	chromosome	1183245	1182856
RGOX2465	GOX1078	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	chromosome	1184637	1183324
RGOX2467	GOX1079	Hypothetical protein	chromosome	1184762	1185313
RGOX2468	GOX1080	Divalent cation transporter	chromosome	1185341	1186402
RGOX3517	GOX1081	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1)	chromosome	1188199	1186511
RGOX2471	GOX1082	Hypothetical protein	chromosome	1188582	1188199
RGOX2472	GOX1083	Hypothetical protein	chromosome	1189505	1188864
RGOX2473	GOX1084	A/G-specific adenine DNA glycosylase (EC 3.2.2.-)	chromosome	1190878	1189505
RGOX2477	GOX1085	Phosphoserine phosphatase (EC 3.1.3.3)	chromosome	1192770	1191880
RGOX2479	GOX1086	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase (EC 2.5.1.8)	chromosome	1192812	1193807
RGOX2480	GOX1087	Acetolactate synthase large subunit (EC 4.1.3.18)	chromosome	1193841	1195631
RGOX2481	GOX1088	Acetolactate synthase small subunit (EC 4.1.3.18)	chromosome	1195634	1196158
RGOX2482	GOX1089	Ketol-acid reductoisomerase (EC 1.1.1.86)	chromosome	1196161	1197177
RGOX2484	GOX1090	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (EC 4.1.1.50)	chromosome	1197521	1197997
RGOX2485	GOX1091	Spermidine synthase (EC 2.5.1.16)	chromosome	1198067	1198936
RGOX2486	GOX1092	Transcriptional regulator MarR family	chromosome	1199437	1198979
RGOX2487	GOX1093	Hypothetical protein	chromosome	1199784	1199506
RGOX2488	GOX1094	Hypothetical protein	chromosome	1200090	1199791
RGOX2489	GOX1095	Aminomethyltransferase (Glycine cleavage system T protein) (EC 2.1.2.10)	chromosome	1200410	1201558
RGOX2490	GOX1096	Glycine cleavage system H protein	chromosome	1201598	1201954
RGOX2491	GOX1097	Glycine dehydrogenase [decarboxylating] (EC 1.4.4.2)	chromosome	1202021	1204873
RGOX2492	GOX1098	Hypothetical protein	chromosome	1205072	1205380
RGOX2493	GOX1099	Hypothetical protein	chromosome	1205472	1205681
RGOX2494	GOX1100	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1206337	1205711
RGOX2495	GOX1101	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	chromosome	1207805	1206426
RGOX2497	GOX1102	Hypothetical protein	chromosome	1208149	1208772
RGOX2498	GOX1103	Transaminase (EC 2.6.1.-)	chromosome	1208895	1210055
RGOX2499	GOX1104	TldD protein	chromosome	1210135	1211595
RGOX2500	GOX1105	Hypothetical protein	chromosome	1212163	1211861
RGOX2501	GOX1107	O-antigen biosynthesis protein RfbC	chromosome	1215166	1212539
RGOX2502	GOX1108	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1216997	1215348
RGOX2503	GOX1109	Dolichol-phosphate mannosyltransferase (EC 2.4.1.83)	chromosome	1217838	1217074
RGOX2504	GOX1110	ATP synthase B' chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1218343	1217846
RGOX2506	GOX1111	ATP synthase B' chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1218914	1218357
RGOX2508	GOX1112	ATP synthase C chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1219180	1218926
RGOX2510	GOX1113	ATP synthase A chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1219982	1219236
RGOX2512	GOX1114	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	chromosome	1221944	1220475
RGOX2514	GOX1115	ABC transporter substrate binding protein	chromosome	1222194	1222715
RGOX2515	GOX1116	Hypothetical protein	chromosome	1222722	1222961
RGOX2516	GOX1117	Hypothetical protein	chromosome	1222961	1223647
RGOX2518	GOX1118	Trehalose-phosphatase (EC 3.1.3.12)	chromosome	1223699	1224418
RGOX2519	GOX1119	Alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase (EC 2.4.1.15)	chromosome	1224409	1225464
RGOX2520	GOX1120	Disulfide bond formation protein B	chromosome	1225742	1226254
RGOX2522	GOX1121	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase (EC 6.3.5.1)	chromosome	1226636	1228669
RGOX2523	GOX1122	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] (EC 1.2.1.16)	chromosome	1228765	1230153
RGOX2524	GOX1123	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1233050	1230276
RGOX2525	GOX1124	Hypothetical protein	chromosome	1233580	1234956
RGOX2527	GOX1125	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1235075	1237777
RGOX2526	GOX1126	Hypothetical protein	chromosome	1238645	1237758
RGOX2528	GOX1127	DNA-binding protein HU-beta	chromosome	1238825	1239091
RGOX2529	GOX1128	Hypothetical protein	chromosome	1240623	1239175
RGOX2530	GOX1130	Hypothetical protein	chromosome	1241596	1240910
RGOX2531	GOX1131	Proline-5-carboxylate reductase (EC 1.5.1.2)	chromosome	1242457	1241681
RGOX2532	GOX1132	Hypothetical protein	chromosome	1243008	1242505
RGOX3532	GOX1133	Hypothetical protein	chromosome	1243477	1243190
RGOX2534	GOX1134	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase (EC 5.1.3.20)	chromosome	1243559	1244536
RGOX2535	GOX1135	Protoporphobilin diacylglycerol transferase (EC 2.4.99.-)	chromosome	1244551	1245369

RGOX2537	GOX1136	Hypothetical protein	chromosome	1245365	1246141
RGOX2536	GOX1137	Probable lipopolysaccharide modification acyltransferase	chromosome	1247277	1246105
RGOX2538	GOX1138	Catalase (EC 1.11.1.6)	chromosome	1249514	1247412
RGOX2539	GOX1139	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1249728	1250600
RGOX2540	GOX1140	Hypothetical metabolite transport protein	chromosome	1251951	1250623
RGOX2542	GOX1141	LSU ribosomal protein L25P	chromosome	1252137	1252790
RGOX2544	GOX1142	Peptidyl-tRNA hydrolase (EC 3.1.1.29)	chromosome	1252797	1253363
RGOX2543	GOX1143	Hypothetical protein	chromosome	1254132	1253338
RGOX2545	GOX1144	Hypothetical protein	chromosome	1254131	1254658
RGOX2547	GOX1145	Transcriptional regulator	chromosome	1254658	1254951
RGOX2548	GOX1146	GTP-binding protein	chromosome	1255079	1256170
RGOX2549	GOX1147	Gamma-glutamyl phosphate reductase (EC 1.2.1.41)	chromosome	1256139	1257419
RGOX2550	GOX1148	Nicotinate-nucleotide adenylyltransferase (EC 2.7.7.18)	chromosome	1257455	1258039
RGOX2551	GOX1149	Hypothetical protein	chromosome	1258090	1258590
RGOX2552	GOX1150	Hypothetical protein	chromosome	1258594	1259049
RGOX2553	GOX1151	Hypothetical protein	chromosome	1259789	1259076
RGOX2554	GOX1152	Hypothetical protein	chromosome	1260312	1259965
RGOX2555	GOX1153	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	chromosome	1260388	1261122
RGOX2556	GOX1154	Hypothetical protein	chromosome	1261142	1261615
RGOX2557	GOX1155	UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase (EC 5.1.3.7)	chromosome	1261626	1262591
RGOX2559	GOX1162	Histidine utilization repressor	chromosome	1269014	1268277
RGOX2560	GOX1163	Imidazolonepropionase (EC 3.5.2.7)	chromosome	1270351	1269116
RGOX2561	GOX1164	Hypothetical protein	chromosome	1270480	1271838
RGOX2562	GOX1165	N-formylglutamate deformylase (EC 3.5.1.68)	chromosome	1271863	1272675
RGOX2563	GOX1166	Urocanate hydratase (EC 4.2.1.49)	chromosome	1272765	1274447
RGOX2564	GOX1167	Histidine ammonia-lyase (EC 4.3.1.3)	chromosome	1274458	1276002
RGOX2565	GOX1168	Putative membrane-bound dehydrogenase	chromosome	1276029	1277171
RGOX2567	GOX1169	Hypothetical protein	chromosome	1277700	1277170
RGOX2568	GOX1170	Putative lactate dehydrogenase (cyt c dependent)	chromosome	1279103	1277700
RGOX3533	GOX1171	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9)	chromosome	1280322	1279120
RGOX3324	GOX1172	Hypothetical protein	chromosome	1280598	1280404
RGOX2569	GOX1173	Outer membrane heme receptor	chromosome	1280700	1283222
RGOX2570	GOX1174	Purine-cytosine permease	chromosome	1283225	1284625
RGOX2571	GOX1175	Translation initiation inhibitor	chromosome	1284603	1285121
RGOX2572	GOX1176	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.14)	chromosome	1285204	1286643
RGOX2573	GOX1177	D-aminoacylase (EC 3.5.1.81)	chromosome	1286679	1288166
RGOX2574	GOX1178	Hypothetical protein	chromosome	1288166	1289155
RGOX2575	GOX1179	Putative sugar uptake ABC transporter permease protein	chromosome	1290378	1289158
RGOX3543	GOX1180	Putative sugar uptake ABC transporter permease protein	chromosome	1291235	1290378
RGOX2576	GOX1181	Sugar uptake ABC transporter permease protein	chromosome	1292098	1291202
RGOX2577	GOX1182	Putative glucokinase (EC 2.7.1.2)	chromosome	1293049	1292111
RGOX2578	GOX1183	Hypothetical protein similar to IOLE protein	chromosome	1293918	1293049
RGOX2579	GOX1184	ABC transporter sugar-binding protein	chromosome	1295231	1293918
RGOX2580	GOX1185	Hypothetical protein	chromosome	1296358	1295366
RGOX2581	GOX1186	Hypothetical protein	chromosome	1296787	1296545
RGOX2582	GOX1187	Myo-inositol 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.18)	chromosome	1296877	1297968
RGOX3622	GOX1188	Outer membrane receptor protein	chromosome	1297999	1300953
RGOX2585	GOX1189	Hypothetical protein	chromosome	1301088	1302347
RGOX2586	GOX1190	Glucose-1-phosphatase (EC 3.1.3.10)	chromosome	1302317	1303342
RGOX2587	GOX1191	Bacterioferritin	chromosome	1303447	1303992
RGOX2588	GOX1192	Probable transcriptional regulator	chromosome	1304804	1304343
RGOX2590	GOX1193	Alanine racemase (EC 5.1.1.1)	chromosome	1304919	1305689
RGOX3325	GOX1195	Alanine racemase, C-terminus (EC 5.1.1.1)	chromosome	1307319	1307816
RGOX2592	GOX1196	Hypothetical protein	chromosome	1307905	1308348
RGOX2593	GOX1197	Hypothetical protein	chromosome	1308560	1308874
RGOX2594	GOX1198	Sulfite reductase (Ferrodoxin) (EC 1.8.7.1)	chromosome	1308874	1310544
RGOX2595	GOX1199	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1310534	1310977
RGOX2596	GOX1200	Magnesium and cobalt transport protein CorA	chromosome	1311954	1310980
RGOX2597	GOX1201	Tryptophan synthase beta chain (EC 4.2.1.20)	chromosome	1312135	1313370
RGOX2598	GOX1202	Tryptophan synthase alpha chain (EC 4.2.1.20)	chromosome	1313370	1314179
RGOX2599	GOX1203	Hypothetical protein	chromosome	1314792	1314229
RGOX2601	GOX1204	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase	chromosome	1315065	1315931
RGOX2603	GOX1205	Folylpolyglutamate synthase / dihydrofolate synthase (EC 6.3.2.17) (EC 6.3.2.12)	chromosome	1316055	1317254
RGOX2604	GOX1206	Replicative DNA helicase (EC 3.6.1.-)	chromosome	1317303	1318814
RGOX2605	GOX1207	Probable transcriptional regulator	chromosome	1319688	1319383
RGOX2608	GOX1208	Hypothetical protein	chromosome	1320190	1320726
RGOX2609	GOX1209	Hypothetical protein	chromosome	1320860	1321291
RGOX2610	GOX1210	Hypothetical protein	chromosome	1321298	1321786
RGOX2611	GOX1211	Phage DNA Packaging Protein	chromosome	1321773	1323083
RGOX2612	GOX1212	Hypothetical protein	chromosome	1323133	1324548
RGOX2613	GOX1213	Hypothetical protein	chromosome	1324569	1325060
RGOX2614	GOX1214	Hypothetical protein	chromosome	1325093	1326511
RGOX2615	GOX1215	Hypothetical protein	chromosome	1326569	1326967
RGOX2616	GOX1216	Hypothetical protein	chromosome	1326981	1327577
RGOX2617	GOX1217	Hypothetical protein	chromosome	1327593	1328573
RGOX2618	GOX1218	Hypothetical protein	chromosome	1328672	1330156
RGOX2619	GOX1219	Hypothetical protein	chromosome	1330160	1330582
RGOX2620	GOX1220	Hypothetical protein	chromosome	1330582	1330896
RGOX2621	GOX1221	Hypothetical protein	chromosome	1331066	1331920

RGOX3518	GOX1222	Hypothetical protein	chromosome	1331942	1332853
RGOX2624	GOX1223	Hypothetical protein	chromosome	1333070	1334128
RGOX2625	GOX1224	Hypothetical protein	chromosome	1334128	1334748
RGOX2626	GOX1225	Hypothetical protein	chromosome	1334748	1335104
RGOX2627	GOX1226	Hypothetical protein	chromosome	1335152	1336369
RGOX2628	GOX1227	Hypothetical protein	chromosome	1336333	1337568
RGOX2629	GOX1228	Hypothetical protein	chromosome	1337576	1338259
RGOX2630	GOX1229	Hypothetical protein	chromosome	1338262	1339515
RGOX2631	GOX1230	Gluconate 2-dehydrogenase, cytochrome c subunit	chromosome	1340840	1339530
RGOX2632	GOX1231	Gluconate 2-dehydrogenase alpha chain (EC 1.1.99.3)	chromosome	1342615	1340840
RGOX2633	GOX1232	Gluconate 2-dehydrogenase gamma chain (EC 1.1.99.3)	chromosome	1343327	1342620
RGOX2634	GOX1233	Hypothetical protein	chromosome	1344284	1343469
RGOX2635	GOX1234	Hypothetical protein	chromosome	1345263	1344307
RGOX2636	GOX1235	Heat shock protein HSP33	chromosome	1346189	1345263
RGOX2637	GOX1236	Ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)	chromosome	1347217	1346192
RGOX2638	GOX1237	Acetylornithine aminotransferase (EC 2.6.1.11)	chromosome	1348422	1347142
RGOX2639	GOX1238	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (EC 3.4.16.4)	chromosome	1350081	1348507
RGOX2640	GOX1239	Hypothetical protein	chromosome	1350148	1350759
RGOX2642	GOX1240	Hypothetical protein	chromosome	1350765	1351250
RGOX2643	GOX1241	Sec-independent protein translocase protein TatA	chromosome	1351324	1351575
RGOX2644	GOX1242	Methylthioribose salvage protein	chromosome	1351578	1352201
RGOX2645	GOX1243	Putative dioxygenase	chromosome	1352207	1352770
RGOX2646	GOX1244	Putative enolase-phosphatase	chromosome	1352783	1353463
RGOX2647	GOX1245	Riboflavin kinase (EC 2.7.1.26) / FMN adenyltransferase (RibF)	chromosome	1353463	1354383
RGOX2649	GOX1246	TonB-dependent receptor protein	chromosome	1354598	1356994
RGOX2648	GOX1247	Hypothetical protein	chromosome	1357769	1356978
RGOX2650	GOX1248	Hypothetical protein	chromosome	1358779	1357772
RGOX2651	GOX1249	Isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)	chromosome	1358896	1361775
RGOX2653	GOX1250	Putative lipoprotein signal peptidase (EC 3.4.23.36)	chromosome	1361778	1362287
RGOX2654	GOX1251	Hypothetical protein	chromosome	1362356	1362925
RGOX3519	GOX1252	DNA mismatch repair protein MutL	chromosome	1363018	1364874
RGOX2657	GOX1253	D-Lactate dehydrogenase (NAD dependent) (EC 1.1.1.28)	chromosome	1364959	1366686
RGOX2658	GOX1254	Outer membrane protein	chromosome	1368849	1366711
RGOX2659	GOX1255	Putative permease	chromosome	1369386	1368967
RGOX2660	GOX1256	Putative permease	chromosome	1370380	1369493
RGOX2661	GOX1257	DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2)	chromosome	1372398	1370386
RGOX2662	GOX1258	Hypothetical protein	chromosome	1373026	1372469
RGOX2663	GOX1259	Hypothetical protein	chromosome	1373752	1373276
RGOX2665	GOX1260	Outer membrane protein	chromosome	1375147	1374038
RGOX2666	GOX1261	Hypothetical protein	chromosome	1375681	1375343
RGOX2667	GOX1262	Carboxy-terminal processing protease	chromosome	1377491	1375710
RGOX2668	GOX1263	DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2)	chromosome	1380332	1377639
RGOX2669	GOX1264	DNA processing chain A	chromosome	1381542	1380361
RGOX2670	GOX1265	Hypothetical membrane-spanning protein	chromosome	1382219	1381590
RGOX2671	GOX1266	Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)	chromosome	1383517	1382219
RGOX2672	GOX1267	Aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2)	chromosome	1384455	1383517
RGOX2673	GOX1268	Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17)	chromosome	1385866	1384451
RGOX2674	GOX1269	Hypothetical protein	chromosome	1386065	1386649
RGOX3105	GOX1270	Transposase	chromosome	1387506	1386949
RGOX2676	GOX1271	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1387645	1388289
RGOX2677	GOX1272	Putative DNA uptake protein	chromosome	1388341	1390566
RGOX2678	GOX1273	Hypothetical protein	chromosome	1390633	1391139
RGOX2679	GOX1274	Endonuclease III (EC 4.2.99.18)	chromosome	1391837	1391142
RGOX2680	GOX1275	ATP-binding protein of ABC transporter	chromosome	1391984	1393819
RGOX2681	GOX1276	Organophosphate acid anhydride	chromosome	1393943	1395319
RGOX2682	GOX1277	Na(+)/H(+) antiporter	chromosome	1396322	1395333
RGOX2683	GOX1278	Hypothetical protein	chromosome	1398051	1396738
RGOX2684	GOX1279	Hypothetical protein	chromosome	1398570	1400885
RGOX2686	GOX1280	Hypothetical protein	chromosome	1403776	1401767
RGOX2687	GOX1281	Nucleoside-triphosphatase (EC 3.6.1.15)	chromosome	1404713	1404090
RGOX2688	GOX1282	Ribonuclease PH (EC 2.7.7.56)	chromosome	1405432	1404713
RGOX3106	GOX1283	Heat inducible transcription repressor HrcA	chromosome	1405514	1406581
RGOX3102	GOX1284	Penicillin-binding protein 1 (Peptidoglycan synthetase)	chromosome	1406688	1409345
RGOX2691	GOX1285	Bacterial Peptide Chain Release Factor 2 (RF-2)	chromosome	1409571	1410536
RGOX2692	GOX1286	Hypothetical protein	chromosome	1410928	1411593
RGOX2694	GOX1287	Biopolymer transport ExbB protein	chromosome	1411734	1412831
RGOX2695	GOX1288	Biopolymer transport ExbD protein	chromosome	1412839	1413261
RGOX2697	GOX1289	Biopolymer transport ExbD protein	chromosome	1413337	1413768
RGOX2698	GOX1290	Hypothetical protein	chromosome	1413775	1415013
RGOX2699	GOX1291	Flagellar L-ring protein flgH	chromosome	1415819	1415076
RGOX2700	GOX1292	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1416011	1417036
RGOX2701	GOX1293	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A (EC 6.3.5.-)	chromosome	1417451	1418635
RGOX2702	GOX1294	C4-dicarboxylate transport protein	chromosome	1419898	1418642
RGOX2703	GOX1295	Gamma-glutamyltranspeptidase	chromosome	1421484	1419895
RGOX2704	GOX1296	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	1422370	1421501
RGOX2705	GOX1297	N-carbamyl-L-amino acid amidohydrolase	chromosome	1422483	1423715
RGOX2706	GOX1298	Serine--pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.51)	chromosome	1423715	1424944
RGOX2707	GOX1299	Transcriptional regulator	chromosome	1425158	1424973
RGOX2708	GOX1300	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	chromosome	1425315	1426238

RGOX2711	GOX1302	Paraquat-inducible protein A	chromosome	1426638	1428119
RGOX2712	GOX1303	Paraquat-inducible protein B	chromosome	1428119	1429798
RGOX2713	GOX1304	Hypothetical protein	chromosome	1429805	1430419
RGOX2714	GOX1305	Transcription antitermination protein NusG	chromosome	1431030	1430503
RGOX2715	GOX1306	Protein translocase subunit SecE	chromosome	1431291	1431043
RGOX2716	GOX1309	Hypothetical protein	chromosome	1432256	1431708
RGOX2717	GOX1310	ATP synthase delta chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1432495	1433154
RGOX3520	GOX1311	ATP synthase alpha chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1433157	1434689
RGOX2720	GOX1312	ATP synthase gamma chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1434702	1435589
RGOX2721	GOX1313	ATP synthase beta chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1435615	1437075
RGOX2723	GOX1314	ATP synthase epsilon chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	1437227	1437496
RGOX2724	GOX1315	Hypothetical protein	chromosome	1437988	1437719
RGOX3110	GOX1322	Transposase (class I, N-terminus missing))	chromosome	1443993	1443619
RGOX2998	GOX1323	Transposase	chromosome	1444111	1445403
RGOX3000	GOX0419	Transposase (class II)	chromosome	1447026	1445950
RGOX3001	GOX1325	Transposase (class III)	chromosome	1447787	1447080
RGOX3111	GOX1326	Conserved hypothetical protein (C-terminus missing)	chromosome	1448184	1448672
RGOX3057	GOX1327	Hypothetical protein	chromosome	1449117	1449671
RGOX3058	GOX1328	Hypothetical protein	chromosome	1449736	1450089
RGOX3112	GOX1329	Small heat shock protein	chromosome	1450633	1450154
RGOX2725	GOX1057	Transposase (class I)	chromosome	1450998	1451954
RGOX2726	GOX1331	Oxidative stress regulatory protein OxyR	chromosome	1453035	1452109
RGOX2727	GOX1332	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (EC 1.6.4.-)	chromosome	1453283	1453843
RGOX2728	GOX1333	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (EC 1.6.4.-)	chromosome	1453972	1455540
RGOX2729	GOX1334	Amino acid efflux protein	chromosome	1455590	1456219
RGOX2730	GOX1335	Aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)	chromosome	1458957	1456267
RGOX2731	GOX1336	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	chromosome	1460013	1458994
RGOX2732	GOX1337	Putative transcriptional regulator	chromosome	1460127	1461050
RGOX2733	GOX1338	Putative permease	chromosome	1462155	1461061
RGOX2734	GOX1339	Hypothetical protein	chromosome	1463221	1462307
RGOX2735	GOX1340	Hypothetical protein	chromosome	1463961	1463365
RGOX2736	GOX1341	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	1464213	1467098
RGOX2737	GOX1342	Alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20)	chromosome	1467101	1469413
RGOX3638	GOX1343	Transposase (class III)	chromosome	1470354	1469479
RGOX2741	GOX1344	Hypothetical protein	chromosome	1470802	1471221
RGOX2740	GOX1345	Nicotinamide mononucleotide transporter	chromosome	1471773	1471213
RGOX2742	GOX1346	Hypothetical protein	chromosome	1472918	1471767
RGOX2743	GOX1347	TonB-dependent outer membrane receptor	chromosome	1475404	1472924
RGOX2745	GOX1348	Methyl-accepting chemotaxis protein	chromosome	1475913	1477247
RGOX2746	GOX1349	Putative transporter	chromosome	1477386	1478621
RGOX2747	GOX1350	Hypothetical protein	chromosome	1478624	1479205
RGOX2748	GOX1351	Putative isomerase	chromosome	1480478	1479222
RGOX2749	GOX1352	Ribulose-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.1)	chromosome	1480635	1481309
RGOX2750	GOX1353	Hypothetical protein	chromosome	1481309	1482958
RGOX2751	GOX1354	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	chromosome	1482987	1484102
RGOX2752	GOX1355	Hypothetical protein	chromosome	1486491	1484116
RGOX2753	GOX1356	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	chromosome	1486878	1487618
RGOX2754	GOX1357	Putative electron transport protein	chromosome	1487618	1489138
RGOX2756	GOX1358	Hypothetical protein	chromosome	1489138	1489728
RGOX2755	GOX1359	Excinuclease ABC subunit A	chromosome	1492241	1489719
RGOX2757	GOX1360	Hypothetical protein	chromosome	1492730	1492311
RGOX2758	GOX1361	Two component response regulator	chromosome	1493432	1492761
RGOX2759	GOX1362	Two component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	1494553	1493432
RGOX2760	GOX1363	Hypothetical protein	chromosome	1495104	1494556
RGOX3564	GOX1364	Tyrosyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.1)	chromosome	1496462	1495215
RGOX2762	GOX1365	ABC transporter permease protein	chromosome	1497975	1496572
RGOX2763	GOX1366	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	1498898	1497975
RGOX2765	GOX1367	Hypothetical protein	chromosome	1499682	1499020
RGOX2768	GOX1368	Cysteine desulfurase I NifS (EC 4.4.1.-)	chromosome	1499802	1500917
RGOX2770	GOX1369	Cysteine desulfurase II NifS (EC 4.4.1.-)	chromosome	1501231	1502082
RGOX2771	GOX1370	Ferredoxin, 2Fe-2S	chromosome	1502108	1502419
RGOX2772	GOX1371	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase (EC 2.1.1.61)	chromosome	1502446	1503510
RGOX2773	GOX1372	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	chromosome	1503513	1504157
RGOX3118	GOX1373	Hypothetical protein	chromosome	1504180	1504335
RGOX2774	GOX1374	DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2)	chromosome	1504550	1505275
RGOX2775	GOX1375	Gluconolactonase (EC 3.1.1.17)	chromosome	1505547	1506287
RGOX3639	GOX1343	Transposase (class III)	chromosome	1506631	1507506
RGOX3521	GOX1377	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter NhaA	chromosome	1507798	1508943
RGOX2779	GOX1378	Hypothetical protein	chromosome	1509047	1509511
RGOX2778	GOX1379	Hypothetical protein	chromosome	1509826	1509488
RGOX2780	GOX1380	Hypothetical protein	chromosome	1510041	1510457
RGOX2781	GOX1381	Gluconolactonase (EC 3.1.1.17)	chromosome	1511749	1510532
RGOX2782	GOX1382	Transposase (class I)	chromosome	1513053	1512031
RGOX2783	GOX1383	Hypothetical protein	chromosome	1513488	1513877
RGOX2784	GOX1384	Transposase (class I)	chromosome	1515418	1514462
RGOX2785	GOX1385	Hypothetical protein	chromosome	1516091	1515471
RGOX3567	GOX1386	Hypothetical protein	chromosome	1516480	1517580
RGOX3123	GOX1387	Transposase (fragment)	chromosome	1517872	1517681
RGOX2787	GOX1388	Transposase (C-terminus missing)	chromosome	1518127	1517903

RGOX3637	GOX0419	Transposase (class II)	chromosome	1519749	1518673
RGOX2790	GOX1390	Methyltransferase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis	chromosome	1521348	1520470
RGOX2791	GOX1391	Hypothetical protein	chromosome	1521950	1521321
RGOX2792	GOX1392	Hypothetical protein	chromosome	1522341	1523978
RGOX2793	GOX1393	Acyltransferase	chromosome	1523990	1524898
RGOX2794	GOX1394	Putative fatty acyl CoA synthetase	chromosome	1524862	1525503
RGOX2795	GOX1395	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1525516	1527855
RGOX2796	GOX1396	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I (EC 2.3.1.41)	chromosome	1527777	1529039
RGOX2797	GOX1397	Hypothetical protein	chromosome	1529042	1529833
RGOX2798	GOX1398	Phosphotransferase	chromosome	1529830	1530267
RGOX2799	GOX1399	3-Oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (EC 1.1.1.100)	chromosome	1530271	1530984
RGOX2800	GOX1400	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1530984	1532240
RGOX2801	GOX1401	Hypothetical protein	chromosome	1532752	1532261
RGOX2802	GOX1402	Transposase (class I, C-terminus missing)	chromosome	1532830	1533321
RGOX3644	GOX0419	Transposase (class II)	chromosome	1533361	1534437
RGOX2805	GOX1405	Hypothetical protein	chromosome	1535603	1534923
RGOX2806	GOX1406	Hypothetical protein	chromosome	1536099	1535611
RGOX3125	GOX1407	Hypothetical protein	chromosome	1536500	1536099
RGOX2807	GOX1408	Binding protein component of ABC transporter	chromosome	1537735	1536503
RGOX2808	GOX1409	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	1538897	1537740
RGOX2809	GOX1410	Hypothetical protein	chromosome	1539298	1538969
RGOX03127	#NV	Putative HlyD-family protein	chromosome	1540173	1541081
RGOX3129	GOX1412	Outer membrane channel protein similar to TrpC	chromosome	1541086	1542639
RGOX3023	GOX1413	Putative hydrolase	chromosome	1542678	1543622
RGOX3025	GOX1414	Chaperone protein DnaJ	chromosome	1543828	1544745
RGOX3027	GOX1415	Di-/tripeptide transporter	chromosome	1544939	1546435
RGOX3028	GOX1416	Porin B precursor	chromosome	1546656	1548215
RGOX3032	GOX1417	Ferrichrome receptor FcuA	chromosome	1550555	1548309
RGOX3130	GOX1418	Carbohydrate-selective porin, OprB family	chromosome	1552263	1550707
RGOX3131	GOX1419	Hypothetical protein	chromosome	1553758	1553174
RGOX3038	GOX1420	Putative peroxiredoxin	chromosome	1554303	1553758
RGOX3043	GOX1421	Murein transglycosylase (EC 3.2.1.-)	chromosome	1555713	1554358
RGOX3045	GOX1422	O-antigen export system permease protein	chromosome	1555921	1556787
RGOX3046	GOX1423	O-antigen export system ATP-binding protein	chromosome	1556795	1557589
RGOX3132	GOX1424	Hypothetical protein	chromosome	1557686	1557901
RGOX3048	GOX1425	Hypothetical protein	chromosome	1558331	1557942
RGOX3133	GOX1426	Hypothetical protein	chromosome	1558999	1558427
RGOX3051	GOX1427	Hypothetical protein	chromosome	1559518	1560426
RGOX0004	GOX1429	GTP-binding protein, Mrp/Nbp345 family	chromosome	1562574	1561378
RGOX0006	GOX1430	Probable serine protease (EC 3.4.21.-)	chromosome	1562699	1564276
RGOX3134	GOX1431	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1564307	1565371
RGOX0010	GOX1432	NADP-D-sorbitol dehydrogenase	chromosome	1565524	1566978
RGOX0014	GOX1433	Putative DnaJ-like protein	chromosome	1568095	1567286
RGOX0015	GOX1434	Hypothetical protein	chromosome	1568274	1568627
RGOX0017	GOX1435	Iron-sulfur cluster-binding protein	chromosome	1570071	1568857
RGOX0018	GOX1436	Adenosine deaminase (EC 3.5.4.4)	chromosome	1570442	1571608
RGOX0019	GOX1437	Purine nucleoside permease	chromosome	1571608	1572681
RGOX0020	GOX1438	Hypothetical protein	chromosome	1573476	1572700
RGOX0023	GOX1439	Queuine tRNA-ribosyltransferase (EC 2.4.2.29)	chromosome	1574865	1573690
RGOX0024	GOX1440	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	chromosome	1575935	1574865
RGOX0027	GOX1441	Uncharacterized PQQ-dependent dehydrogenase 3	chromosome	1578415	1575998
RGOX3135	GOX1442	Hypothetical protein	chromosome	1578808	1578548
RGOX3136	GOX1443	MazG protein	chromosome	1579771	1578992
RGOX0032	GOX1444	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase (EC 1.2.1.38)	chromosome	1579946	1580842
RGOX0034	GOX1446	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	chromosome	1581058	1582212
RGOX0036	GOX1447	Histidyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.21)	chromosome	1582212	1583348
RGOX0038	GOX1448	Adenylosuccinate synthetase (EC 6.3.4.4)	chromosome	1583406	1584692
RGOX0039	GOX1449	Hypothetical protein	chromosome	1584785	1586752
RGOX0040	GOX1450	Hypothetical protein	chromosome	1586765	1587232
RGOX0042	GOX1451	Cell division protein FtsY homolog	chromosome	1588220	1587264
RGOX0044	GOX1452	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1589483	1588284
RGOX0048	GOX1453	Diaminopimelate epimerase (EC 5.1.1.7)	chromosome	1590253	1589483
RGOX0047	GOX1454	Hypothetical protein	chromosome	1590338	1590985
RGOX0051	GOX1455	ATP-dependent RNA helicase	chromosome	1591151	1592959
RGOX0053	GOX1456	Hypothetical protein	chromosome	1594129	1593029
RGOX0055	GOX1457	Hypothetical protein	chromosome	1595016	1594141
RGOX0058	GOX1458	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1595761	1595009
RGOX0059	GOX1459	Transcriptional regulator	chromosome	1595884	1596507
RGOX0060	GOX1460	Glutaredoxin 2	chromosome	1596560	1597210
RGOX0064	GOX1461	Dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5)	chromosome	1599510	1597294
RGOX0065	GOX1462	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1599709	1600785
RGOX0066	GOX1463	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB	chromosome	1600880	1603477
RGOX0067	GOX1470	Glucosamine-6-phosphate deaminase (N-terminus missing) (EC 3.5.99.6)	chromosome	1609525	1609181
RGOX0068	GOX1471	Transposase	chromosome	1609725	1610123
RGOX3138	GOX1472	Transposase	chromosome	1610180	1610518
RGOX0069	GOX1473	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25)	chromosome	1611802	1610699
RGOX0070	GOX1474	Sugar permease	chromosome	1613088	1611856
RGOX0071	GOX1475	Putative N-acetylglucosamine kinase (EC 2.7.1.59)	chromosome	1614161	1613088
RGOX3523	GOX1476	Transposase (class II)	chromosome	1614372	1615268

RGOX0073	GOX1477	Capsule polysaccharide biosynthesis protein (WcbQ homolog)	chromosome	1616950	1615604
RGOX0074	GOX1478	Capsule polysaccharide export protein (WcbA homolog)	chromosome	1617236	1618963
RGOX0075	GOX1479	Capsule export protein (WcbO homolog)	chromosome	1618963	1620261
RGOX0076	GOX1480	Mannosyltransferase (WcbB homolog)	chromosome	1620185	1621504
RGOX0077	GOX1481	Fatty acid hydroxylase	chromosome	1621716	1622180
RGOX0078	GOX1482	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1622167	1623303
RGOX0079	GOX1483	Capsule polysaccharide export protein (WcbC homolog)	chromosome	1623351	1624556
RGOX0080	GOX1484	Capsule polysaccharide export inner-membrane protein (WcbD homolog)	chromosome	1624821	1625918
RGOX0081	GOX1485	Capsule polysaccharide export inner-membrane protein (KpsM homolog)	chromosome	1625918	1626715
RGOX0082	GOX1486	Capsule polysaccharide export ATP-binding protein (KpsT homolog)	chromosome	1626715	1628223
RGOX0083	GOX1487	UDP-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)	chromosome	1628325	1629308
RGOX0084	GOX1488	UDP-galactopyranose mutase (EC 5.4.99.9)	chromosome	1629345	1630490
RGOX0085	GOX1489	Putative glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1630583	1632694
RGOX0086	GOX1490	Putative glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	1632753	1634378
RGOX0087	GOX1491	Transposase (class I)	chromosome	1634645	1635601
RGOX3640	GOX1343	Transposase (class III)	chromosome	1636809	1635934
RGOX3140	GOX1493	Hypothetical protein	chromosome	1637325	1637146
RGOX0090	GOX1494	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1638345	1637341
RGOX0091	GOX1495	Oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit	chromosome	1638848	1638345
RGOX3414	GOX1496	Transmembrane transport protein	chromosome	1638950	1640326
RGOX0094	GOX1497	Acyl-CoA dehydrogenase (1.3.99.-)	chromosome	1640455	1641588
RGOX0095	GOX1498	Hypothetical protein	chromosome	1641588	1642316
RGOX0096	GOX1499	Glycosyltransferase related protein (EC 2.4.1.-)	chromosome	1643939	1642821
RGOX0097	GOX1500	Hypothetical protein	chromosome	1644543	1644782
RGOX3141	GOX1501	Hypothetical protein	chromosome	1644782	1645201
RGOX0098	GOX2731	Transposase (class IV)	chromosome	1646019	1645192
RGOX0099	GOX1503	Probable ATP-dependent helicase Lhr	chromosome	1646189	1651351
RGOX0100	GOX1504	ATP-dependent helicase HepA	chromosome	1651359	1654136
RGOX0101	GOX1505	Putative type II DNA modification enzyme	chromosome	1654143	1658972
RGOX0102	GOX1506	Putative chromosome segregation SMC protein	chromosome	1658959	1660926
RGOX0103	GOX1507	Putative restriction endonuclease	chromosome	1660936	1661685
RGOX0105	GOX1508	Hypothetical protein	chromosome	1662771	1663901
RGOX0106	GOX1509	Hypothetical protein	chromosome	1663998	1664210
RGOX3143	GOX1510	Hypothetical protein	chromosome	1664475	1664690
RGOX0107	GOX1511	Hypothetical protein	chromosome	1664787	1665419
RGOX0108	GOX1512	Hypothetical protein	chromosome	1665651	1666100
RGOX0109	GOX1513	DNA integration/recombination/inversion protein	chromosome	1667221	1666115
RGOX0110	GOX1515	Single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	chromosome	1669281	1667485
RGOX0111	GOX1516	Putative glycerol-inducible protein	chromosome	1670293	1669295
RGOX0112	GOX1517	Homoserine dehydrogenase (EC 1.1.1.3)	chromosome	1671579	1670293
RGOX0113	GOX1518	Putative aminotransferase AatC (EC 2.6.1.-)	chromosome	1672802	1671579
RGOX0114	GOX1519	Hypothetical protein	chromosome	1673945	1672923
RGOX0115	GOX1520	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)	chromosome	1674102	1674770
RGOX0116	GOX1521	Hypothetical protein	chromosome	1674800	1675801
RGOX3445	GOX1522	RecA protein	chromosome	1676904	1675870
RGOX0118	GOX1523	Flagellar biosynthetic protein FlhB	chromosome	1678184	1677111
RGOX0120	GOX1524	Flagellar biosynthetic protein FlhR	chromosome	1679042	1678191
RGOX0121	GOX1525	Flagellar biosynthetic protein FlhQ	chromosome	1679388	1679119
RGOX0122	GOX1526	Flagellar hook-basal body protein FlhE	chromosome	1679738	1679394
RGOX0123	GOX1527	Flagellar basal-body rod protein FlgC	chromosome	1680151	1679747
RGOX0124	GOX1528	Flagellar basal-body rod protein FlgB	chromosome	1680556	1680167
RGOX3446	GOX1529	Hypothetical protein	chromosome	1681603	1680686
RGOX3146	GOX1530	Hypothetical protein	chromosome	1681774	1682076
RGOX0127	GOX1531	Flagellar biosynthetic protein FlhP	chromosome	1682076	1682840
RGOX0128	GOX1532	Gamma-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	chromosome	1684317	1682902
RGOX0129	GOX1533	Outer membrane protein	chromosome	1684550	1685305
RGOX0130	GOX1534	Hypothetical protein	chromosome	1685760	1685347
RGOX0131	GOX1535	Dihydropteroate synthase (EC 2.5.1.15)	chromosome	1685800	1686624
RGOX0132	GOX1536	Bifunctional folate synthesis protein	chromosome	1686624	1687520
RGOX0133	GOX1537	GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16)	chromosome	1687520	1688191
RGOX0134	GOX1538	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1689053	1688214
RGOX0135	GOX1539	Putative acetyltransferase (EC 2.3.1.-)	chromosome	1689179	1689787
RGOX0136	GOX1540	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	chromosome	1689977	1690873
RGOX0137	GOX1541	Hypothetical protein	chromosome	1691426	1690902
RGOX0138	GOX1542	Putative aluminum resistance protein	chromosome	1692151	1691426
RGOX0140	GOX1543	Hypothetical protein	chromosome	1692795	1692157
RGOX0141	GOX1544	ABC transporter permease protein	chromosome	1692930	1693766
RGOX0142	GOX1545	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	1693666	1694541
RGOX0143	GOX1546	Hypothetical protein	chromosome	1694962	1694555
RGOX0144	GOX1548	Hypothetical protein	chromosome	1695257	1696183
RGOX0145	GOX1549	Methyl-accepting chemotaxis protein	chromosome	1696302	1697774
RGOX0146	GOX1550	Chemotaxis protein CheX	chromosome	1697759	1698043
RGOX0147	GOX1551	Chemotaxis protein CheY	chromosome	1698043	1698399
RGOX0148	GOX1552	Chemotaxis protein CheA (EC 2.7.3.-)	chromosome	1698399	1700444
RGOX0149	GOX1553	Chemotaxis protein CheW	chromosome	1700474	1700869
RGOX0150	GOX1554	Chemotaxis protein CheR	chromosome	1700869	1701723
RGOX0151	GOX1555	Chemotaxis protein CheB (EC 3.1.1.61)	chromosome	1701723	1702775
RGOX0152	GOX1556	Chemotaxis protein CheY	chromosome	1702775	1703167
RGOX0153	GOX1557	Hypothetical protein	chromosome	1703190	1703498

RGOX0154	GOX1558	Hypothetical protein	chromosome	1703990	1703523
RGOX0155	GOX1559	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (EC 2.7.1.148)	chromosome	1704880	1703954
RGOX0156	GOX1560	Hypothetical protein	chromosome	1706421	1704880
RGOX3148	GOX1561	Hypothetical protein	chromosome	1706692	1706381
RGOX0158	GOX1562	Bacteriophage-type DNA polymerase	chromosome	1706755	1707597
RGOX0159	GOX1563	Hypothetical protein	chromosome	1707783	1709744
RGOX0160	GOX1564	Hypothetical protein	chromosome	1711661	1709889
RGOX0161	GOX2692	Transposase (IS12528)	chromosome	1711734	1712555
RGOX0162	GOX1566	Transposase (class IV)	chromosome	1713712	1712885
RGOX0163	GOX1567	DedA family protein	chromosome	1714564	1713989
RGOX0164	GOX1568	Cytochrome b561	chromosome	1714709	1715254
RGOX0165	GOX1569	Tricorn protease homolog (EC 3.4.21.-)	chromosome	1718879	1715613
RGOX0166	GOX1570	Heme exporter protein B	chromosome	1719699	1719037
RGOX0167	GOX1571	Heme exporter protein A	chromosome	1720331	1719699
RGOX0168	GOX1572	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	1720521	1721312
RGOX0169	GOX1573	Amino acid ABC transporter binding protein and permease protein	chromosome	1721315	1722838
RGOX0170	GOX1574	Hypothetical protein	chromosome	1723819	1722878
RGOX0171	GOX1575	Hypothetical protein	chromosome	1724023	1723826
RGOX0172	GOX1576	Transposase (class II) (N-terminal domain missing)	chromosome	1724634	1724164
RGOX0174	GOX1577	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA (N-terminal domain missing)	chromosome	1726392	1725280
RGOX0175	GOX1578	Hypothetical protein	chromosome	1727016	1726408
RGOX0176	GOX1579	Hypothetical protein associated with nus operon	chromosome	1727233	1727841
RGOX0177	GOX1580	N utilization substance protein A (NusA)	chromosome	1727879	1729429
RGOX0178	GOX1581	Hypothetical protein	chromosome	1729404	1730081
RGOX0179	GOX1582	Bacterial Protein Translation Initiation Factor 2 (IF2)	chromosome	1730081	1732831
RGOX0180	GOX1583	Ribosome-binding factor A	chromosome	1732831	1733256
RGOX0181	GOX1584	tRNA pseudouridine synthase B (EC 4.2.1.70)	chromosome	1733358	1734356
RGOX3149	GOX1585	SSU ribosomal protein S15P	chromosome	1734319	1734585
RGOX0182	GOX1586	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.8)	chromosome	1734784	1736931
RGOX0183	GOX1587	Putative 2-nitropropane dioxygenase (EC 1.13.11.32)	chromosome	1736999	1738414
RGOX0184	GOX1588	Hypothetical protein	chromosome	1738421	1740409
RGOX0185	GOX1589	Putative hydroxylase (N-terminus missing)	chromosome	1741463	1740807
RGOX0188	GOX0205	Transposase (class I)	chromosome	1741607	1742563
RGOX0187	GOX1591	Hypothetical protein	chromosome	1742882	1742532
RGOX0189	GOX1592	Hypothetical protein	chromosome	1743351	1742935
RGOX0190	GOX1593	Nucleoside hydrolase	chromosome	1744478	1743381
RGOX0191	GOX1594	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase (HemN)	chromosome	1745693	1744518
RGOX0192	GOX1595	Kup system potassium uptake protein	chromosome	1747717	1745693
RGOX3150	GOX1596	Hypothetical protein	chromosome	1748528	1747836
RGOX0193	GOX1597	rRNA methyltransferase RsmB	chromosome	1748604	1749944
RGOX0194	GOX1598	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1751085	1750000
RGOX0195	GOX1599	Two component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	1752750	1751137
RGOX0196	GOX1600	Two component response regulator	chromosome	1753481	1752759
RGOX0197	GOX1601	Cysteine synthase A (O-acetylserine sulphydrylase A) protein (EC 4.2.99.8)	chromosome	1754636	1753584
RGOX0200	GOX1602	Hypothetical protein	chromosome	1754694	1755119
RGOX0199	GOX1603	Hypothetical protein	chromosome	1756012	1755101
RGOX0201	GOX1604	Hypothetical protein	chromosome	1756523	1756077
RGOX0202	GOX1605	Translation initiation factor, aIF-2B alpha subunit	chromosome	1757633	1756530
RGOX0203	GOX1606	Lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase I	chromosome	1759123	1757753
RGOX0204	GOX1607	Lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase II	chromosome	1760583	1759123
RGOX0205	GOX1608	Hypothetical protein	chromosome	1761131	1761904
RGOX3151	GOX1609	Hypothetical protein	chromosome	1762981	1762076
RGOX0207	GOX1610	Putative D-glycero-D-manno-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	chromosome	1763391	1763933
RGOX0208	GOX1611	GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1764863	1763958
RGOX0209	GOX1612	GDP-mannose 4,6 dehydratase (EC 4.2.1.47)	chromosome	1765859	1764879
RGOX0210	GOX1613	Sensory box/GGDEF family protein	chromosome	1768041	1766281
RGOX0211	GOX1614	Putative hexosyltransferase	chromosome	1768133	1769239
RGOX0212	GOX1615	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1770243	1769248
RGOX0213	GOX1616	Hypothetical protein	chromosome	1770334	1771623
RGOX0214	GOX1617	Hypothetical protein	chromosome	1771646	1772653
RGOX0215	GOX1618	Hypothetical protein	chromosome	1772671	1773690
RGOX3447	GOX1619	Two component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	chromosome	1773760	1775841
RGOX0218	GOX1620	Two component response regulator	chromosome	1775868	1776236
RGOX0021	GOX1621	Transposase	chromosome	1776400	1776720
RGOX0220	GOX1622	Transposase	chromosome	1776720	1777607
RGOX0219	GOX1623	Hypothetical protein	chromosome	1777865	1777602
RGOX0221	GOX1624	Nonspecific acid phosphatase precursor (EC 3.1.3.2)	chromosome	1778011	1778817
RGOX0222	GOX1625	Chloride channel protein	chromosome	1780203	1778848
RGOX0223	GOX1626	Cation efflux system protein	chromosome	1781379	1780489
RGOX0224	GOX1627	Cation efflux system protein	chromosome	1782444	1781392
RGOX0226	GOX1628	Protease	chromosome	1782598	1783197
RGOX0227	GOX1629	Hypothetical protein	chromosome	1783266	1783880
RGOX0228	GOX1630	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1784514	1785488
RGOX0229	GOX1631	Putative sugar transport protein	chromosome	1786771	1785491
RGOX0230	GOX1632	Hypothetical protein	chromosome	1787064	1788032
RGOX0231	GOX1633	Hypothetical protein	chromosome	1788498	1788103
RGOX0232	GOX1634	Pirin-like protein	chromosome	1789367	1788666
RGOX0233	GOX1635	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	1789467	1790423
RGOX0234	GOX1636	5-Aminolevulinic acid synthase (EC 2.3.1.37)	chromosome	1790423	1791637

RGOX0235	GOX1637	Hypothetical protein	chromosome	1793629	1791764
RGOX0237	GOX1057	Transposase (class I)	chromosome	1793694	1794650
RGOX0238	GOX1639	Hypothetical protein	chromosome	1795157	1795834
RGOX0239	GOX1640	Amidophosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.14)	chromosome	1795821	1797299
RGOX0240	GOX1641	Bacteriophytochrome protein (EC 2.7.3.-)	chromosome	1799619	1797388
RGOX0241	GOX1642	Carboxypeptidase-related protein	chromosome	1801236	1799755
RGOX0242	GOX1643	Fumarate hydratase (EC 4.2.1.2)	chromosome	1802760	1801360
RGOX0243	GOX1644	Hypothetical protein	chromosome	1803782	1802889
RGOX0244	GOX1645	Hypothetical protein	chromosome	1804467	1803841
RGOX0245	GOX1646	Hypothetical protein	chromosome	1805247	1804969
RGOX0245	GOX1647	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH (C-terminus missing)	chromosome	1805984	1805247
RGOX0247	GOX1648	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	chromosome	1806460	1805993
RGOX0248	GOX1649	Thiol:disulfide interchange protein DsbE precursor	chromosome	1807011	1806460
RGOX0249	GOX1650	Cytochrome c-type biogenesis protein CysK	chromosome	1809003	1807027
RGOX0250	GOX1651	Cytochrome c-type biogenesis protein CycJ	chromosome	1809514	1809014
RGOX0252	GOX1652	Heme exporter protein C	chromosome	1810436	1809678
RGOX0254	GOX1653	Hypothetical protein	chromosome	1810610	1811023
RGOX0255	GOX1654	Hypothetical protein	chromosome	1811566	1811036
RGOX0256	GOX1655	Hypothetical protein	chromosome	1811708	1812544
RGOX0258	GOX1656	Hypothetical protein	chromosome	1812575	1812961
RGOX0259	GOX1657	Leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase (EC 2.3.2.6)	chromosome	1813188	1813934
RGOX0260	GOX1658	Hypothetical protein	chromosome	1813934	1814848
RGOX0261	GOX1659	Hypothetical protein	chromosome	1814848	1815459
RGOX0262	GOX1660	Hypothetical protein	chromosome	1815629	1816024
RGOX0264	GOX1661	Bacterioferritin comigratory protein	chromosome	1816091	1816594
RGOX0265	GOX1662	Hypothetical protein	chromosome	1816657	1817574
RGOX0266	GOX1663	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1817658	1819919
RGOX0267	GOX1664	ATPase associated with chromosome architecture/replication	chromosome	1820040	1821449
RGOX0268	GOX1665	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase C (EC 4.2.1.70)	chromosome	1821449	1822453
RGOX0269	GOX1666	Hypothetical protein	chromosome	1822453	1824969
RGOX0270	GOX1667	Hypothetical protein	chromosome	1825701	1825153
RGOX0272	GOX1668	Hypothetical protein	chromosome	1826431	1826039
RGOX0273	GOX1669	IspD/IspF bifunctional enzyme (EC 2.7.7.60 EC4.6.1.12)	chromosome	1827749	1826508
RGOX0274	GOX1670	ApaG protein	chromosome	1828229	1827759
RGOX3610	GOX1671	O-succinylhomoserine sulfhydrylase (EC 4.2.99.-)	chromosome	1829464	1828274
RGOX0278	GOX1673	Hypothetical protein	chromosome	1830372	1829824
RGOX0279	GOX1674	Hypothetical protein	chromosome	1831162	1830416
RGOX0280	GOX1675	NADH dehydrogenase type II(EC 1.6.99.3)	chromosome	1832472	1831246
RGOX0281	GOX1676	Glutamate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.35) / Amino-acetic acetyltransferase	chromosome	1833845	1832574
RGOX0283	GOX1677	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor (EC 5.2.1.8)	chromosome	1834737	1833814
RGOX0286	GOX1678	Protein translocase subunit SecA	chromosome	1835074	1837836
RGOX0287	GOX1679	Nucleotidyltransferase	chromosome	1837874	1838620
RGOX0288	GOX1680	Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC (EC 3.1.22.4)	chromosome	1838620	1839123
RGOX0290	GOX1681	Holliday junction DNA helicase RuvA	chromosome	1839123	1839722
RGOX0291	GOX1682	Holliday junction DNA helicase RuvB	chromosome	1839722	1840768
RGOX0292	GOX1683	Hypothetical protein	chromosome	1840824	1841246
RGOX0294	GOX1684	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	chromosome	1841327	1842067
RGOX0295	GOX1685	ExbD/TolR family protein	chromosome	1842074	1842511
RGOX0296	GOX1686	Hypothetical protein (related to TolA protein)	chromosome	1842527	1843519
RGOX0297	GOX1687	TolB protein	chromosome	1843539	1844897
RGOX0298	GOX1688	Peptidoglycan-associated lipoprotein	chromosome	1845388	1845864
RGOX0299	GOX1689	Hypothetical protein	chromosome	1846011	1846874
RGOX0300	GOX1690	Cell cycle protein MesJ/cytosine deaminase-related protein	chromosome	1846940	1848133
RGOX0301	GOX1691	Cell division protein FtsH	chromosome	1848308	1850209
RGOX0302	GOX1692	Phosphoglucosyltransferase/phosphomannosyltransferase family protein, MrsA (EC 5.4.2.10)	chromosome	1850306	1851661
RGOX0303	GOX1693	Cell cycle transcriptional regulator CtrA	chromosome	1852476	1851736
RGOX0304	GOX1694	Flagellum-specific ATP synthase (EC 3.6.3.14)	chromosome	1852667	1854022
RGOX0306	GOX1695	Hypothetical protein	chromosome	1854037	1854459
RGOX0305	GOX1696	Hypothetical protein	chromosome	1854875	1854447
RGOX0307	GOX1697	Hypothetical protein	chromosome	1855498	1854947
RGOX0308	GOX1698	Aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	chromosome	1856778	1855498
RGOX0310	GOX1699	Hypothetical protein	chromosome	1857992	1857741
RGOX0311	GOX1700	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9)	chromosome	1859218	1858154
RGOX0312	GOX1701	Ankyrin-like protein	chromosome	1859727	1859218
RGOX0313	GOX1702	Putative outer membrane protein	chromosome	1860771	1859770
RGOX0314	GOX1703	Transketolase (EC 2.2.1.1)	chromosome	1860909	1862963
RGOX0315	GOX1704	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	chromosome	1862979	1865849
RGOX0316	GOX1705	6-Phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44)	chromosome	1865856	1866851
RGOX0317	GOX1706	Putative hydrolase of the HAD superfamily	chromosome	1867021	1867818
RGOX0318	GOX1707	6-Phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.31)	chromosome	1867818	1868555
RGOX0320	GOX1708	Ribose 5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6)	chromosome	1868555	1869247
RGOX0321	GOX1709	Gluconokinase (EC 2.7.1.12)	chromosome	1869253	1869786
RGOX0323	GOX1710	Hypothetical protein	chromosome	1869793	1870317
RGOX0324	GOX1711	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	1870372	1871241
RGOX0325	GOX1712	Aldehyde dehydrogenase (low similarity to L-sorbose dehydrogenase)	chromosome	1871384	1872823
RGOX0326	GOX1713	Protease I	chromosome	1872884	1873408
RGOX0327	GOX1714	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (EC 3.1.4.46)	chromosome	1874587	1873484
RGOX0328	GOX1715	TonB-dependent receptor protein	chromosome	1876980	1874602
RGOX0329	GOX1716	Hypothetical protein	chromosome	1878528	1877092

RGOX0330	GOX1717	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1879831	1878536
RGOX0332	GOX1718	Pantoate--beta-alanine ligase (EC 6.3.2.1)	chromosome	1879830	1880654
RGOX0333	GOX1719	Adenine deaminase (EC 3.5.4.2)	chromosome	1880716	1882410
RGOX3647	GOX1720	Transposase (class V)	chromosome	1882805	1883113
RGOX3642	GOX1343	Transposase (class III)	chromosome	1883113	1883988
RGOX0336	GOX1723	Hypothetical protein	chromosome	1885396	1884365
RGOX0337	GOX1724	DNA polymerase I (EC 2.7.7.7)	chromosome	1885448	1888279
RGOX0338	GOX1725	Hypothetical protein	chromosome	1888296	1888901
RGOX0340	GOX1726	ABC transporter dipeptide binding protein	chromosome	1888905	1890557
RGOX0339	GOX1727	Hypothetical protein	chromosome	1891229	1890543
RGOX0341	GOX1728	Phosphoribosylamine--glycine ligase (EC 6.3.4.13)	chromosome	1892455	1891229
RGOX0342	GOX1729	Exodeoxyribonuclease VII large subunit (EC 3.1.11.6)	chromosome	1892522	1894072
RGOX0343	GOX1730	Hypothetical protein	chromosome	1894112	1894471
RGOX0344	GOX1731	Ribonuclease E (EC 3.1.4.-)	chromosome	1897458	1894783
RGOX0345	GOX1732	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (EC 3.5.1.28)	chromosome	1897919	1898740
RGOX0346	GOX1733	2-Isopropylmalate synthase (EC 4.1.3.12)	chromosome	1898953	1900521
RGOX0347	GOX1734	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1900687	1901451
RGOX0348	GOX1735	Hypothetical protein	chromosome	1901986	1901483
RGOX3161	GOX1736	Hypothetical protein	chromosome	1902289	1902038
RGOX0349	GOX1737	Rod shape-determining protein MreB	chromosome	1902585	1903631
RGOX0350	GOX1738	Rod shape-determining protein MreC	chromosome	1903653	1904579
RGOX0351	GOX1739	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1904588	1905151
RGOX0352	GOX1740	Cell elongation specific D,D-transpeptidase	chromosome	1905232	1907229
RGOX0353	GOX1741	Rod shape-determining protein RodA	chromosome	1907244	1908416
RGOX0354	GOX1742	Hypothetical protein	chromosome	1910449	1908419
RGOX0355	GOX1743	Glycyl-tRNA synthetase beta chain (EC 6.1.1.14)	chromosome	1912508	1910457
RGOX0356	GOX1744	Glycyl-tRNA synthetase alpha chain (EC 6.1.1.14)	chromosome	1913664	1912504
RGOX0358	GOX1745	Hypothetical protein	chromosome	1913714	1914304
RGOX0360	GOX1746	Rubredoxin-NAD(+) reductase (EC 1.18.1.1)	chromosome	1914451	1915770
RGOX3448	GOX1747	Aspartyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.12)	chromosome	1916115	1917908
RGOX0363	GOX1748	Bacterioferritin	chromosome	1918052	1918612
RGOX0364	GOX1749	Hypothetical protein	chromosome	1918796	1919083
RGOX0365	GOX1750	Exodeoxyribonuclease III (EC 3.1.11.2)	chromosome	1919957	1919133
RGOX0366	GOX1751	HesB family protein	chromosome	1920255	1919914
RGOX0368	GOX1752	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase (EC 3.1.5.1)	chromosome	1920490	1921650
RGOX0369	GOX1753	Arginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.19)	chromosome	1921697	1923502
RGOX3537	GOX1754	Hypothetical protein	chromosome	1923502	1924620
RGOX0370	GOX1755	Hypothetical protein	chromosome	1924634	1925395
RGOX0372	GOX1756	Hypothetical protein	chromosome	1925595	1925981
RGOX0374	GOX1757	Sec-independent protein translocase protein TatB	chromosome	1925994	1926593
RGOX0375	GOX1758	Sec-independent protein translocase protein TatC	chromosome	1926593	1927375
RGOX0376	GOX1759	Seryl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.11)	chromosome	1927406	1928665
RGOX0378	GOX1760	Hypothetical protein	chromosome	1928681	1929418
RGOX0379	GOX1761	Hypothetical protein	chromosome	1929676	1930284
RGOX0380	GOX1762	Putative RNA helicase	chromosome	1932825	1930327
RGOX0382	GOX1763	Ferredoxin--NADP reductase (EC 1.18.1.2)	chromosome	1932961	1933845
RGOX0383	GOX1764	Glutathione reductase (EC 1.6.4.2)	chromosome	1933817	1935265
RGOX0384	GOX1765	Hypothetical protein	chromosome	1935349	1937307
RGOX0385	GOX1766	Non-heme chloroperoxidase (EC 1.11.1.10)	chromosome	1938218	1937397
RGOX0387	GOX1767	Hypothetical protein	chromosome	1938217	1938756
RGOX0388	GOX1768	Alkylated DNA repair protein AlkB	chromosome	1938910	1939560
RGOX0389	GOX1769	2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (EC 4.1.2.15)	chromosome	1939611	1940999
RGOX0390	GOX1770	Hypothetical protein	chromosome	1940999	1942198
RGOX0391	GOX1771	Hypothetical protein	chromosome	1942198	1942659
RGOX0392	GOX1772	Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17)	chromosome	1942762	1944093
RGOX0393	GOX1773	Putative LacX protein	chromosome	1945024	1944143
RGOX0394	GOX1774	Putative ATP-sensitive potassium channel protein	chromosome	1946030	1944996
RGOX0395	GOX1775	SpoU rRNA methylase family protein	chromosome	1946829	1946038
RGOX0397	GOX1776	CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	chromosome	1948172	1946817
RGOX0399	GOX1777	Putative Na+ driven multidrug efflux pump	chromosome	1948259	1949650
RGOX0398	GOX1778	Putative transmembrane efflux protein	chromosome	1950821	1949610
RGOX0400	GOX1779	Putative LysM domain protein	chromosome	1951392	1950925
RGOX0402	GOX1780	SSU ribosomal protein S4P	chromosome	1951758	1952372
RGOX0403	GOX1781	Bacterial Peptide Chain Release Factor 3 (RF-3)	chromosome	1952542	1954086
RGOX0404	GOX1782	5-Methylthioribose kinase (EC 2.7.1.100)	chromosome	1955316	1954132
RGOX0405	GOX1783	Hypothetical protein	chromosome	1956011	1955316
RGOX0406	GOX1784	Hypothetical protein	chromosome	1956928	1956089
RGOX0408	GOX1785	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)	chromosome	1957630	1956983
RGOX0409	GOX1786	Alanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.7)	chromosome	1960386	1957750
RGOX0411	GOX1787	Outer membrane protein	chromosome	1962340	1961204
RGOX0413	GOX1788	Bifunctional shikimate kinase (EC 2.7.1.71)/ 3-dehydroquinate synthase (EC 4.6.1.3)	chromosome	1964348	1962660
RGOX3162	GOX1789	Hypothetical protein	chromosome	1964409	1964819
RGOX0415	GOX1790	Integrase/recombinase XerD	chromosome	1964833	1965765
RGOX0416	GOX1791	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase alpha subunit (EC 6.4.1.2)	chromosome	1965832	1966803
RGOX0417	GOX1792	Putative competence-damage protein	chromosome	1967623	1966856
RGOX0418	GOX1793	Transcriptional regulator, IclR family/regucalcin	chromosome	1967723	1968613
RGOX0419	GOX1794	Bifunctional acetyltransferase/MutT/nudix family protein	chromosome	1969625	1968621
RGOX0420	GOX1795	Bacterial ring hydroxylating dioxygenases alpha subunit	chromosome	1970799	1969630
RGOX0422	GOX1796	TonB-dependent outer membrane receptor (N-terminal domain)	chromosome	1971054	1972274

RGOX0423	GOX1797	TonB-dependent outer membrane receptor (C-terminal domain)	chromosome	1972447	1973490
RGOX0424	GOX1798	ATP-dependent protease subunit	chromosome	1974924	1974049
RGOX0425	GOX1799	Protein translocase subunit YajC	chromosome	1975002	1975385
RGOX0426	GOX1800	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	chromosome	1976087	1975482
RGOX0427	GOX1801	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	1977028	1976159
RGOX0428	GOX1802	Conserved hypothetical protein related to nitrate reductase	chromosome	1977109	1978044
RGOX0429	GOX1803	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	1978047	1978670
RGOX0430	GOX1804	Hypothetical protein	chromosome	1979244	1978684
RGOX3449	GOX1805	Hypothetical protein	chromosome	1979849	1979244
RGOX3545	GOX1806	Hypothetical protein	chromosome	1980482	1980030
RGOX0435	GOX1807	GTP pyrophosphokinase (EC 2.7.6.5)	chromosome	1980481	1982775
RGOX0436	GOX1808	Holo-[acyl-carrier protein] synthase (EC 2.7.8.7)	chromosome	1982783	1983253
RGOX0438	GOX1809	Signal peptidase I (EC 3.4.21.89)	chromosome	1983287	1984078
RGOX0439	GOX1810	Ribonuclease III (EC 3.1.26.3)	chromosome	1984288	1984809
RGOX0440	GOX1811	GTP-binding protein Era homolog	chromosome	1984838	1985722
RGOX0441	GOX1812	Uridylate kinase (EC 2.7.4.-)	chromosome	1985747	1986574
RGOX0443	GOX1813	Ribosome Recycling Factor (RRF)	chromosome	1986646	1987209
RGOX0444	GOX1814	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase (EC 2.5.1.31)	chromosome	1987281	1987985
RGOX0445	GOX1815	Phosphatidate cytidyltransferase (EC 2.7.7.41)	chromosome	1987985	1988830
RGOX0446	GOX1816	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (EC 1.1.1.267)	chromosome	1988826	1990049
RGOX0447	GOX1817	Putative membrane metalloprotease	chromosome	1990045	1991142
RGOX0448	GOX1818	Outer membrane protein	chromosome	1991278	1993743
RGOX0450	GOX1819	Hypothetical protein	chromosome	1993700	1994710
RGOX0451	GOX1820	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	chromosome	1995055	1995780
RGOX0452	GOX1821	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase	chromosome	1995896	1996402
RGOX3450	GOX1822	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase (EC 2.3.1.129)	chromosome	1996411	1997265
RGOX0454	GOX1823	Hypothetical protein	chromosome	1997271	1998110
RGOX0456	GOX1824	Lactoylglutathione lyase (EC 4.4.1.5)	chromosome	1998113	1998499
RGOX0457	GOX1825	LSU ribosomal protein L34P	chromosome	1998848	1998979
RGOX0458	GOX1826	Ribonuclease P protein component (EC 3.1.26.5)	chromosome	1999032	1999403
RGOX3451	GOX1827	60 kD inner membrane protein OxaA	chromosome	1999745	2001469
RGOX0461	GOX1828	Probable GTP-binding protein EngB	chromosome	2001487	2002167
RGOX0462	GOX1829	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	chromosome	2002167	2003123
RGOX0463	GOX1830	Hypothetical protein	chromosome	2004569	2003157
RGOX0465	GOX1831	2,3,4,5-Tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase (EC 2.3.1.117)	chromosome	2004700	2005590
RGOX3452	GOX1832	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase (EC 3.5.1.18)	chromosome	2005538	2006740
RGOX0468	GOX1833	Hypothetical protein	chromosome	2006740	2007360
RGOX0469	GOX1834	tRNA pseudouridine synthase A (EC 4.2.1.70)	chromosome	2008187	2007363
RGOX0470	GOX1835	Methionyl-tRNA formyltransferase (EC 2.1.2.9)	chromosome	2009094	2008183
RGOX0471	GOX1836	N-formylmethionylaminoacyl-tRNA deformylase (EC 3.5.1.31)	chromosome	2009655	2009104
RGOX0472	GOX1837	Small heat shock protein HspA	chromosome	2009847	2010356
RGOX0473	GOX1838	Hypothetical protein	chromosome	2010451	2010699
RGOX0474	GOX1839	Putative translation initiation inhibitor	chromosome	2010726	2011085
RGOX0476	GOX1840	Hypothetical protein	chromosome	2012061	2011699
RGOX0477	GOX1841	Hypothetical protein	chromosome	2012696	2012457
RGOX0478	GOX1842	RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	chromosome	2014157	2012844
RGOX0479	GOX1843	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2014922	2014170
RGOX0480	GOX1844	Hypothetical protein	chromosome	2015719	2014922
RGOX0482	GOX1845	Hypothetical protein	chromosome	2016680	2015877
RGOX0483	GOX1846	Capsule expression protein	chromosome	2017675	2016680
RGOX0484	GOX1847	Ribonuclease D (EC 3.1.26.3)	chromosome	2018339	2017698
RGOX0485	GOX1849	Hypothetical transmembrane protein (similar to complex I subunit M)	chromosome	2018599	2019618
RGOX0486	GOX1850	Hypothetical protein	chromosome	2019787	2020110
RGOX0487	GOX1851	Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13)	chromosome	2020417	2021853
RGOX3453	GOX1852	Glutamate synthase [NADPH] large chain (EC 1.4.1.13)	chromosome	2021853	2026370
RGOX0490	GOX1853	Putative lipopolysaccharide modification acyltransferase	chromosome	2027513	2026383
RGOX0491	GOX1854	Oligoendopeptidase F (EC 3.4.24.-)	chromosome	2027626	2029431
RGOX0492	GOX1855	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2029443	2030801
RGOX0493	GOX1856	Hypothetical protein	chromosome	2031126	2032346
RGOX0494	GOX1857	Uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 1	chromosome	2035033	2032670
RGOX0496	GOX1858	Hypothetical protein	chromosome	2035253	2035777
RGOX0497	GOX1859	Excinuclease ABC subunit B	chromosome	2035806	2038082
RGOX0499	GOX1860	Transcription elongation factor GreB	chromosome	2038190	2038693
RGOX0500	GOX1861	Glutathione synthetase (EC 6.3.2.3)	chromosome	2039111	2040085
RGOX0502	GOX1862	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (EC 2.1.1.17)	chromosome	2040457	2041134
RGOX0503	GOX1863	Hypothetical protein (low similarity to Cytc oxidase subunit I)	chromosome	2041224	2042387
RGOX0504	GOX1864	Probable protoheme IX farnesyltransferase (heme O synthase)	chromosome	2042387	2043334
RGOX0505	GOX1865	Putative transmembrane protein	chromosome	2044485	2043538
RGOX0506	GOX1866	PmbA protein	chromosome	2045816	2044488
RGOX0507	GOX1867	Putative processing protease protein	chromosome	2047078	2045816
RGOX0508	GOX1868	Threonine synthase (EC 4.2.99.2)	chromosome	2048538	2047141
RGOX0509	GOX1869	Hypothetical protein	chromosome	2049545	2048565
RGOX0510	GOX1870	Hypothetical protein	chromosome	2049944	2049597
RGOX0512	GOX1871	Hypothetical protein	chromosome	2050060	2051739
RGOX0511	GOX1872	[Protein-PilI] uridylyltransferase (EC 2.7.7.59)	chromosome	2054572	2051726
RGOX0513	GOX1873	DNA mismatch repair protein MutS	chromosome	2057220	2054572
RGOX0514	GOX1874	Virulence factor MviN	chromosome	2058872	2057319
RGOX0515	GOX1875	Hypothetical protein	chromosome	2059194	2058952
RGOX0517	GOX1876	Hypothetical protein	chromosome	2059301	2059687

RGOX0516	GOX1877	Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)	chromosome	2060178	2059687
RGOX0518	GOX1878	Nucleoside permease, NupC-like protein	chromosome	2060336	2061538
RGOX0519	GOX1879	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	chromosome	2061642	2062163
RGOX0520	GOX1880	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] (EC 1.1.1.94)	chromosome	2063150	2062179
RGOX0521	GOX1881	Hypothetical protein	chromosome	2063992	2063156
RGOX0522	GOX1882	O-sialoglycoprotein endopeptidase (EC 3.4.24.57)	chromosome	2065155	2063992
RGOX0523	GOX1883	Porphobilinogen deaminase (EC 4.3.1.8)	chromosome	2065130	2066200
RGOX0524	GOX1884	Putative uroporphyrinogen-III synthase	chromosome	2066239	2066883
RGOX0525	GOX1885	Protein translocase subunit SecB	chromosome	2067408	2066890
RGOX0527	GOX1886	Putative translocase transmembrane protein	chromosome	2067602	2068396
RGOX0528	GOX1887	Membrane-bound lytic murein transglycosylase	chromosome	2068412	2069551
RGOX0529	GOX1888	Probable DNA-methyltransferase (DNA-modification methylase) protein	chromosome	2069551	2070366
RGOX0530	GOX1889	Cytochrome c peroxidase (EC 1.11.1.5)	chromosome	2070463	2071938
RGOX0531	GOX1890	Hypothetical protein	chromosome	2072159	2073604
RGOX0532	GOX1891	Hypothetical protein	chromosome	2073951	2073676
RGOX3632	GOX2718	Transposase (class II)	chromosome	2075238	2074162
RGOX0534	GOX1893	Hypothetical protein	chromosome	2076167	2075292
RGOX0536	GOX1894	SMR/MUTS family protein	chromosome	2076543	2077211
RGOX0537	GOX1895	Hypothetical protein	chromosome	2078302	2077223
RGOX0538	GOX1896	Coproporphyrinogen III oxidase (EC 1.3.3.3)	chromosome	2079216	2078302
RGOX0540	GOX1897	5'-Methylthioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28)	chromosome	2079504	2080391
RGOX0541	GOX1898	Hypothetical protein	chromosome	2080721	2080461
RGOX0542	GOX1899	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	2081469	2080726
RGOX0543	GOX1900	Putative carboxymethylenebutenolidase (EC 3.1.1.45) (Dienelactone hydrolase)	chromosome	2082335	2081481
RGOX0544	GOX1901	Chaperonin GroES	chromosome	2082571	2082870
RGOX0545	GOX1902	Chaperonin GroEL	chromosome	2082924	2084552
RGOX0546	GOX1903	TonB-dependent receptor protein	chromosome	2084800	2087718
RGOX0547	GOX1904	Putative ATP-dependent helicase (DinG family)	chromosome	2090759	2087895
RGOX0548	GOX1905	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6)	chromosome	2090970	2092598
RGOX0549	GOX1906	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2092656	2094734
RGOX0550	GOX1907	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2094734	2095432
RGOX0551	GOX1908	Uracil-DNA glycosylase	chromosome	2096041	2095439
RGOX0552	GOX1909	2'-5' RNA ligase (EC 6.5.1.-)	chromosome	2096601	2096041
RGOX0553	GOX1910	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2096753	2097520
RGOX0554	GOX1911	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II (EC 1.10.3.-)	chromosome	2097971	2098906
RGOX0555	GOX1912	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)	chromosome	2098917	2100902
RGOX0557	GOX1913	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III (EC 1.10.3.-)	chromosome	2100924	2101538
RGOX0558	GOX1914	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV (EC 1.10.3.-)	chromosome	2101541	2101873
RGOX0559	GOX1915	Ferredoxin	chromosome	2102384	2102055
RGOX0560	GOX1916	Heat shock protein	chromosome	2102755	2102480
RGOX0561	GOX1917	ATP-dependent DNA helicase	chromosome	2105199	2102755
RGOX0562	GOX1918	Leucine aminopeptidase	chromosome	2105298	2106797
RGOX0564	GOX1919	Transcriptional regulator, MarR family	chromosome	2107074	2107502
RGOX3166	GOX1920	Undecaprenyl-phosphate alpha N-acetylglucosaminyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	2108491	2107523
RGOX0565	GOX1921	Putative nucleotide sugar epimerase dehydratase protein	chromosome	2108579	2110534
RGOX0566	GOX1922	Pleiotropic regulatory protein	chromosome	2110534	2111673
RGOX0567	GOX1923	Hypothetical protein	chromosome	2111673	2112098
RGOX0568	GOX1924	Putative permease	chromosome	2113326	2112184
RGOX0569	GOX1925	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2115254	2113479
RGOX0570	GOX1926	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2117402	2115498
RGOX0571	GOX1927	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	chromosome	2117549	2117968
RGOX0572	GOX1928	Hypothetical protein	chromosome	2119078	2118620
RGOX3455	GOX1057	Transposase (class I)	chromosome	2120300	2119344
RGOX3643	GOX1343	Transposase (class III)	chromosome	2121362	2120487
RGOX3633	GOX1720	Transposase (class V)	chromosome	2121670	2121362
RGOX0579	GOX1932	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	chromosome	2121722	2122276
RGOX3611	GOX1933	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase protein (EC 2.1.2.2)	chromosome	2123152	2122301
RGOX0582	#NV	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (EC 6.3.3.1)	chromosome	2124000	2122930
RGOX0583	#NV	DnaA-related protein	chromosome	2124103	2124861
RGOX0584	#NV	Polyphosphate kinase (EC 2.7.4.1)	chromosome	2124925	2127252
RGOX0585	#NV	Exopolyphosphatase (EC 3.6.1.11)	chromosome	2127261	2128736
RGOX0586	#NV	CDP-diacylglycerol pyrophosphatase (EC 3.6.1.26)	chromosome	2128736	2129497
RGOX0587	#NV	Putative transmembrane efflux protein	chromosome	2129582	2130745
RGOX0588	#NV	Putative acid phosphatase (EC 3.1.3.2)	chromosome	2130745	2131428
RGOX0589	#NV	Hypothetical protein	chromosome	2131463	2132365
RGOX3541	GOX1942	Hypothetical protein	chromosome	2133595	2132423
RGOX0590	GOX1943	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2135091	2133826
RGOX0591	GOX1944	Diaminopimelate decarboxylase (EC 4.1.1.20)	chromosome	2136358	2135087
RGOX0593	GOX1945	Putative protease	chromosome	2136915	2137583
RGOX0594	GOX1946	Two component response regulator	chromosome	2137723	2138154
RGOX0595	GOX1949	Hypothetical protein	chromosome	2138817	2138443
RGOX0596	GOX1950	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.2)	chromosome	2138914	2140512
RGOX0597	GOX1951	Hypothetical protein	chromosome	2141041	2141451
RGOX0598	GOX1952	Hypothetical protein	chromosome	2141971	2141528
RGOX0600	GOX1953	5-Methylcytosine-specific restriction enzyme (EC 3.1.25.-)	chromosome	2142580	2142017
RGOX0601	GOX1954	Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17)	chromosome	2142731	2143591
RGOX0602	GOX1955	Argininosuccinate lyase (EC 4.3.2.1)	chromosome	2145152	2143710
RGOX0603	GOX1956	Putative thiol:disulfide interchange protein I	chromosome	2145168	2145764
RGOX0605	GOX1957	Putative thiol:disulfide interchange protein II	chromosome	2146245	2147036

RGOX0606	GOX1958	Hypothetical protein	chromosome	2147058	2147831
RGOX0607	GOX1959	Shikimate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.25)	chromosome	2147831	2148667
RGOX3457	GOX1960	Dephospho-CoA kinase (EC 2.7.1.24)	chromosome	2148667	2149269
RGOX0610	GOX1961	DNA polymerase III, epsilon chain (EC 2.7.7.7)	chromosome	2149269	2149952
RGOX0611	GOX1962	Lipopolysaccharide heptosyltransferase	chromosome	2149952	2150872
RGOX0612	GOX1963	Lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyl transferase LpsE	chromosome	2150948	2151958
RGOX0613	GOX1964	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.4)	chromosome	2151961	2153718
RGOX0614	GOX1965	Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)	chromosome	2153750	2155066
RGOX0615	GOX1966	Hypothetical protein	chromosome	2155115	2155507
RGOX0616	GOX1967	Hypothetical protein	chromosome	2156138	2155539
RGOX0617	GOX1968	Hypothetical protein	chromosome	2156385	2156702
RGOX0618	GOX1969	Uncharacterized PQQ-containing dehydrogenase 2	chromosome	2156705	2158114
RGOX0619	GOX1970	GTP-binding protein	chromosome	2158110	2159498
RGOX0620	GOX1971	Galactose-proton symporter	chromosome	2159632	2161041
RGOX0621	GOX1972	Putative transport protein	chromosome	2161049	2162245
RGOX3169	GOX1973	Hypothetical protein	chromosome	2162284	2162445
RGOX0622	GOX1974	Ribosomal protein L11 methyltransferase	chromosome	2163085	2162420
RGOX0623	GOX1975	4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase (EC 2.5.1.-)	chromosome	2163999	2163085
RGOX0624	GOX1976	Hypothetical protein	chromosome	2164023	2164784
RGOX0625	GOX1977	Glutamate--cysteine ligase (EC 6.3.2.2)	chromosome	2164771	2166228
RGOX0626	GOX1978	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2166259	2167212
RGOX0627	GOX1979	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	chromosome	2167219	2167842
RGOX0628	GOX1980	Putative corrin/porphyrin methyltransferase	chromosome	2168791	2167853
RGOX0629	GOX1981	Hypothetical protein	chromosome	2168923	2170152
RGOX0630	GOX1982	Hypothetical protein	chromosome	2170752	2170246
RGOX0632	GOX1983	Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	chromosome	2171706	2170795
RGOX0633	GOX1984	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase (EC 2.7.1.130)	chromosome	2172686	2171706
RGOX0634	GOX1985	3-Deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase	chromosome	2174563	2172686
RGOX0635	GOX1986	Hypothetical protein	chromosome	2175362	2174637
RGOX0636	GOX1987	Hypothetical protein	chromosome	2176289	2175408
RGOX0637	GOX1988	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (EC 1.4.3.5)	chromosome	2176940	2176341
RGOX0638	GOX1989	Hypothetical protein	chromosome	2177493	2177074
RGOX0639	GOX1990	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (EC 1.3.1.9)	chromosome	2177760	2178608
RGOX0640	GOX1991	Chorismate synthase (EC 4.6.1.4)	chromosome	2178613	2179692
RGOX0641	GOX1992	Osmotically inducible protein C	chromosome	2180153	2179725
RGOX0642	GOX1993	Ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain (EC 1.17.4.1)	chromosome	2180491	2182464
RGOX0643	GOX1994	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain (EC 1.17.4.1)	chromosome	2182493	2183509
RGOX0644	GOX1995	Hypothetical protein	chromosome	2184376	2183537
RGOX0645	GOX1996	Decaprenyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.1)	chromosome	2184635	2185579
RGOX0646	GOX1997	Glutamate racemase (EC 5.1.1.3)	chromosome	2186473	2185631
RGOX0647	GOX1998	Orotate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.10)	chromosome	2187219	2186476
RGOX0650	GOX1999	Citrate synthase (EC 4.1.3.7)	chromosome	2188975	2187683
RGOX0651	GOX2000	Phosphohistidine phosphatase SixA homolog	chromosome	2189576	2189070
RGOX0652	GOX2001	Chorismate mutase (EC 5.4.99.5)	chromosome	2189932	2189579
RGOX0653	GOX2002	Putative phosphatase	chromosome	2190608	2189925
RGOX0654	GOX2003	Chromosome partition protein Smc	chromosome	2195256	2190724
RGOX0655	GOX2004	Putative thiol:disulfide interchange protein	chromosome	2195926	2195294
RGOX0656	GOX2005	Putative thiol:disulfide interchange protein	chromosome	2196754	2195930
RGOX0657	GOX2006	Hypothetical protein	chromosome	2197564	2196992
RGOX0658	GOX2007	Hypothetical protein	chromosome	2198067	2197564
RGOX0659	GOX2008	PhoH-like protein	chromosome	2199217	2198039
RGOX0660	GOX2009	MiaB protein (probable tRNA-thiotransferase or tRNA-methylthiotransferase)	chromosome	2200536	2199214
RGOX0662	GOX2010	1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (EC 2.3.1.51)	chromosome	2201841	2200888
RGOX0663	GOX2011	Outer membrane protein	chromosome	2202009	2204309
RGOX0664	GOX2012	Hypothetical protein	chromosome	2204312	2208454
RGOX0665	GOX2013	Putative flagellin modification protein FlbA	chromosome	2210089	2208464
RGOX0666	GOX2014	Putative two-component transcriptional regulator	chromosome	2210479	2210102
RGOX0667	GOX2015	NAD(P)-dependent glucose 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.47)	chromosome	2211286	2210489
RGOX0668	GOX2016	Transcriptional regulator	chromosome	2212014	2211463
RGOX0670	GOX2017	Hypothetical protein	chromosome	2213134	2212127
RGOX0671	GOX2018	Aldehyde dehydrogenase (involved in Pyr degrad.)	chromosome	2213180	2214292
RGOX0672	GOX2019	Putative esterase (EC 3.1.1.1)	chromosome	2214298	2215143
RGOX0674	GOX2020	Ribonuclease I	chromosome	2215143	2215904
RGOX0673	GOX2021	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.19)	chromosome	2216365	2215898
RGOX0675	GOX2022	Aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10)	chromosome	2217147	2216305
RGOX0676	GOX2023	Adenylate cyclase (EC 4.6.1.1)	chromosome	2217220	2219706
RGOX0677	GOX2024	Putative ABC transport system permease protein	chromosome	2219706	2220527
RGOX0678	GOX2025	Putative ABC transporter system ATP-binding protein	chromosome	2220523	2221239
RGOX0679	GOX2026	Hypothetical protein	chromosome	2221242	2222195
RGOX0680	GOX2027	Hypothetical protein	chromosome	2222195	2223094
RGOX0681	GOX2028	Hypothetical protein	chromosome	2223447	2223160
RGOX0682	GOX2029	Putative porin B precursor outer (Glucose porin) transmembrane protein	chromosome	2224834	2223599
RGOX0683	GOX2030	Chaperone protein DnaK	chromosome	2226757	2225459
RGOX0684	GOX2031	Biotin synthase (EC 2.8.1.6)	chromosome	2227921	2226884
RGOX0686	GOX2032	Hypothetical protein	chromosome	2228025	2228843
RGOX0687	GOX2033	Hypothetical protein	chromosome	2228905	2229579
RGOX0688	GOX2034	Metalloprotease (EC 3.4.24.-)	chromosome	2229654	2231747
RGOX0689	GOX2035	Hypothetical protein	chromosome	2231826	2232548
RGOX0690	GOX2036	Putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	chromosome	2233373	2232597

RGOX0692	GOX2037	Hypothetical protein	chromosome	2233619	2234494
RGOX0693	GOX2038	Hypothetical protein	chromosome	2234539	2235330
RGOX0694	GOX2039	Malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase (EC 2.3.1.39)	chromosome	2235300	2236298
RGOX0695	GOX2040	3-Oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (EC 1.1.1.100)	chromosome	2236314	2237051
RGOX0696	GOX2041	Acyl carrier protein	chromosome	2237277	2237513
RGOX0697	GOX2042	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II (EC 2.3.1.41)	chromosome	2237641	2238924
RGOX0698	GOX2043	Hypothetical protein	chromosome	2238945	2239991
RGOX0699	GOX2044	Hypothetical protein	chromosome	2240914	2240033
RGOX0700	GOX2045	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase (EC 3.1.3.25)	chromosome	2241792	2241007
RGOX0701	GOX2046	Hypothetical protein	chromosome	2242341	2241805
RGOX0703	GOX2047	Hypothetical protein	chromosome	2242424	2243311
RGOX0704	GOX2048	Lipopolysaccharide glycosyl transferase	chromosome	2244406	2243339
RGOX0705	GOX2049	Hypothetical protein	chromosome	2245158	2244406
RGOX0706	GOX2050	Hypothetical protein	chromosome	2245970	2245158
RGOX0707	GOX2051	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2247109	2245970
RGOX0708	GOX2052	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2248254	2247076
RGOX3612	GOX2053	Hypothetical protein	chromosome	2249165	2248227
RGOX0710	GOX2054	Hypothetical protein	chromosome	2249305	2250249
RGOX0711	GOX2055	Hypothetical protein	chromosome	2250173	2251180
RGOX0712	GOX2056	Serine palmitoyltransferase (EC 2.3.1.50)	chromosome	2252418	2251228
RGOX0713	GOX2057	Acyl carrier protein	chromosome	2252669	2252418
RGOX3458	GOX2058	Putative fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.-)	chromosome	2254595	2252787
RGOX0717	GOX2059	Hypothetical protein	chromosome	2255725	2254598
RGOX0718	GOX2060	Hypothetical protein	chromosome	2257089	2255725
RGOX0719	GOX2061	Alanine racemase (EC 5.1.1.1)	chromosome	2257328	2258428
RGOX0720	GOX2062	Hypothetical protein	chromosome	2261092	2258441
RGOX0721	GOX2063	Hypothetical protein	chromosome	2261834	2261250
RGOX0723	#NV	Hypothetical protein	chromosome	2262217	2262459
RGOX0724	GOX2065	Siroheme synthase (EC 2.1.1.107)	chromosome	2262602	2264020
RGOX0725	GOX2066	Glutaminase (EC 3.5.1.2)	chromosome	2264176	2265129
RGOX0726	GOX2067	Manganese transport protein MntH	chromosome	2266491	2265139
RGOX0727	GOX2068	Transcriptional regulator MntR (Manganese transport regulator)	chromosome	2266640	2267128
RGOX0728	GOX2069	Transcriptional regulator	chromosome	2267959	2267144
RGOX3459	GOX2070	Malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.99.16)	chromosome	2269580	2268081
RGOX0731	GOX2071	D-Lactate dehydrogenase (cytochrome c-dependent) (EC 1.1.1.28)	chromosome	2271070	2269640
RGOX0732	GOX2072	Hypothetical protein	chromosome	2271645	2271202
RGOX0733	GOX2073	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10)	chromosome	2272625	2271750
RGOX0734	GOX2074	5-Methyltetrahydrofolate-S-homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.13)	chromosome	2276170	2272667
RGOX0735	GOX2075	Hypothetical protein	chromosome	2276302	2276706
RGOX0736	GOX2076	Putative transcriptional regulator	chromosome	2276765	2277391
RGOX0737	GOX2077	Ferric siderophore receptor	chromosome	2279619	2277415
RGOX0738	GOX2078	Hypothetical protein	chromosome	2280325	2279774
RGOX0739	GOX2079	Hypothetical protein	chromosome	2280509	2280895
RGOX0740	GOX2080	Putative outer membrane protein	chromosome	2282616	2280997
RGOX0741	GOX2081	Putative transmembrane protein	chromosome	2284325	2282619
RGOX3175	GOX2082	Putative HlyD-family protein	chromosome	2285694	2284429
RGOX0743	GOX2083	Hypothetical protein	chromosome	2285919	2286470
RGOX3613	GOX2084	Ribokinase (EC 2.7.1.15)	chromosome	2286559	2287500
RGOX0745	GOX2085	Hypothetical protein	chromosome	2287564	2288004
RGOX0746	GOX2086	Hypothetical protein	chromosome	2288282	2288022
RGOX0747	GOX2087	Glycerol-3-phosphate regulon repressor	chromosome	2288526	2289308
RGOX0748	GOX2088	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5)	chromosome	2289430	2291007
RGOX0749	GOX2089	Glycerol uptake facilitator protein	chromosome	2291038	2291940
RGOX0750	GOX2090	Glycerol kinase (EC 2.7.1.30)	chromosome	2291996	2293531
RGOX0751	GOX2091	Bacterial ring hydroxylating dioxygenase alpha-subunit	chromosome	2293837	2293613
RGOX0752	GOX2092	Bacterial ring hydroxylating dioxygenase alpha-subunit	chromosome	2294647	2293979
RGOX0753	GOX2093	Hypothetical protein	chromosome	2294886	2295137
RGOX0754	GOX2094	Sorbitol dehydrogenase cytochrome c subunit	chromosome	2296532	2295219
RGOX0755	GOX2095	Sorbitol dehydrogenase large subunit (EC 1.1.99.21)	chromosome	2297862	2296528
RGOX0756	GOX2096	Sorbitol dehydrogenase large subunit (EC 1.1.99.21)	chromosome	2298162	2297956
RGOX0757	GOX2097	Sorbitol dehydrogenase small subunit (EC 1.1.99.21)	chromosome	2298800	2298186
RGOX3460	GOX2098	Lactate permease	chromosome	2300763	2299228
RGOX0760	GOX0578	Transposase (IS12528)	chromosome	2301621	2300827
RGOX0762	GOX2100	Hypothetical protein	chromosome	2302264	2301932
RGOX0763	GOX2101	Nuclease S1 (EC 3.1.30.1)	chromosome	2302361	2303260
RGOX0764	GOX2102	Outer membrane channel protein	chromosome	2304799	2303291
RGOX3538	GOX2103	Putative secretion protein	chromosome	2305872	2304799
RGOX0767	GOX2104	Putative transport protein	chromosome	2307565	2305892
RGOX0769	GOX2105	Transcriptional regulator	chromosome	2307732	2308700
RGOX0770	GOX2106	Transcriptional regulator LysR family	chromosome	2309642	2308728
RGOX0771	GOX2107	NADPH-specific quinone oxidoreductase (drug modulator)	chromosome	2309774	2310361
RGOX0772	GOX2108	NADH-dependent iron-containing alcohol dehydrogenase	chromosome	2311559	2310405
RGOX0773	GOX2109	Hypothetical protein	chromosome	2311847	2312158
RGOX0774	GOX2110	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase	chromosome	2312341	2313876
RGOX0775	GOX2111	Hypothetical protein	chromosome	2314944	2313883
RGOX0776	GOX2112	Outer membrane protein (similar to TrpC)	chromosome	2316595	2315042
RGOX3568	GOX2113	Putative HlyD-family protein	chromosome	2317508	2316600
RGOX0778	GOX2114	Transcriptional regulator, MarR family	chromosome	2317948	2318427
RGOX0779	GOX2115	Hypothetical protein	chromosome	2318446	2320614

RGOX0780	GOX2116	Transcriptional regulator, GntR family	chromosome	2321313	2320624
RGOX0781	GOX2117	Proline dehydrogenase/d-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (EC 1.5.99.8)	chromosome	2325038	2321388
RGOX0782	GOX2118	Putative L-aminopeptidase/D-esterase	chromosome	2326096	2325080
RGOX0783	GOX2119	Dipeptide ABC transport system ATP-binding protein DppF	chromosome	2326874	2326113
RGOX0784	GOX2120	Dipeptide ABC transport system ATP-binding protein DppD	chromosome	2327689	2326874
RGOX0785	GOX2121	Dipeptide ABC transport system permease protein DppC	chromosome	2328501	2327689
RGOX0786	GOX2122	Dipeptide ABC transport system permease protein DppB	chromosome	2329505	2328501
RGOX0787	GOX2123	Dipeptide-binding protein of ABC transport system	chromosome	2330944	2329451
RGOX0788	GOX2124	Putative outer membrane protein	chromosome	2331595	2331032
RGOX0789	GOX2125	Hypothetical protein	chromosome	2332611	2331655
RGOX0790	GOX2126	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2333378	2332614
RGOX0792	GOX2127	ABC transporter permease protein	chromosome	2334545	2333385
RGOX0793	GOX2128	Putative glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	2334847	2335770
RGOX0794	GOX2129	Putative beta-lactamase	chromosome	2335866	2337047
RGOX0795	GOX2130	Hypothetical protein	chromosome	2337700	2337074
RGOX0796	GOX2131	Hypothetical protein	chromosome	2338446	2337700
RGOX0797	GOX2132	Hypothetical protein	chromosome	2339027	2338530
RGOX0798	GOX2133	Hypothetical protein	chromosome	2339476	2339144
RGOX0800	GOX2134	Peptidyl-dipeptidase DCP (EC 3.4.15.5)	chromosome	2339691	2341814
RGOX3461	GOX2135	Hypothetical protein	chromosome	2341880	2343448
RGOX0803	GOX2136	Aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	chromosome	2343467	2345152
RGOX0804	GOX2137	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	2346088	2345180
RGOX0805	GOX2138	Hypothetical protein	chromosome	2346146	2347006
RGOX0806	GOX2139	Hypothetical protein	chromosome	2347043	2347651
RGOX0807	GOX2140	Putative permease	chromosome	2348540	2347719
RGOX0808	GOX2141	Putative permease	chromosome	2349007	2348225
RGOX0809	GOX2142	Hypothetical protein	chromosome	2351066	2349141
RGOX0810	GOX2143	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2353001	2351364
RGOX0811	GOX2144	Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2)	chromosome	2355746	2353113
RGOX0812	GOX2145	Hypothetical protein	chromosome	2356017	2357354
RGOX0813	GOX2146	Hypothetical protein	chromosome	2358767	2357367
RGOX0814	GOX2147	Endonuclease (EC 3.1.30.-)	chromosome	2358961	2359824
RGOX0815	GOX2148	Transposase (class I)	chromosome	2360907	2359951
RGOX0818	GOX2149	Low-affinity inorganic phosphate transporter	chromosome	2361000	2361329
RGOX0819	GOX2150	Low-affinity inorganic phosphate transporter	chromosome	2361435	2362103
RGOX0820	GOX2151	Hypothetical protein	chromosome	2363440	2362433
RGOX0821	GOX2152	Hypothetical protein	chromosome	2363926	2363549
RGOX0822	GOX2153	Hypothetical protein	chromosome	2364312	2363983
RGOX0823	GOX2154	Hypothetical protein	chromosome	2364486	2364884
RGOX0824	GOX2155	ABC transporter permease protein	chromosome	2365722	2364901
RGOX0825	GOX2156	Putative ABC transporter permease protein	chromosome	2366548	2365727
RGOX0826	GOX2157	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2367525	2366548
RGOX0827	GOX2158	Transcriptional regulator, AsnC family	chromosome	2368035	2367610
RGOX0828	GOX2159	Putative oxidoreductase	chromosome	2368157	2369230
RGOX3462	GOX2160	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2370358	2369243
RGOX0830	GOX2161	Transposase (class I)	chromosome	2370383	2371297
RGOX0831	GOX2162	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	2371421	2372332
RGOX0832	GOX2163	Cold shock protein	chromosome	2372680	2372393
RGOX0833	GOX2164	Transcriptional regulator, TetR family (N-terminus missing)	chromosome	2373360	2372872
RGOX0835	GOX0419	Transposase (class II)	chromosome	2374643	2373567
RGOX0836	GOX2166	Hypothetical protein	chromosome	2375005	2374697
RGOX3463	GOX2167	ATP synthase beta chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	2375314	2376771
RGOX0839	GOX2168	ATP synthase epsilon chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	2376771	2377184
RGOX0840	GOX2169	ATP synthase subunit Atpl	chromosome	2377184	2377471
RGOX0841	GOX2170	Transmembrane protein	chromosome	2377467	2377778
RGOX3464	GOX2171	ATP synthase subunit a	chromosome	2377778	2378476
RGOX0844	GOX2172	ATP synthase subunit c	chromosome	2378476	2378718
RGOX0845	GOX2173	ATP synthase subunit b (C-terminus missing)	chromosome	2378726	2379457
RGOX0846	GOX2174	ATP synthase alpha chain (EC 3.6.1.34)	chromosome	2379447	2380967
RGOX0847	GOX2175	ATP synthase gamma chain (EC 3.6.3.14)	chromosome	2380967	2381839
RGOX0848	GOX2176	Non-hemolytic phospholipase C (EC 3.1.4.3)	chromosome	2382304	2384781
RGOX0850	GOX2177	Hypothetical protein	chromosome	2386538	2385078
RGOX0851	GOX2178	TonB-dependent receptor (disrupted by IS element)	chromosome	2387849	2386824
RGOX3554	GOX0578	Transposase (IS12528)	chromosome	2388974	2388180
RGOX3182	GOX2180	TonB-dependent receptor (disrupted by IS element)	chromosome	2389918	2388932
RGOX0855	GOX2181	Putative polyol dehydrogenase	chromosome	2390877	2390107
RGOX3569	GOX2182	Probable mannitol/sorbitol ABC transporter permease protein	chromosome	2391999	2390899
RGOX3184	GOX2183	Probable mannitol/sorbitol ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2392880	2392056
RGOX3185	GOX2184	Probable mannitol/sorbitol ABC transporter permease protein	chromosome	2393664	2392885
RGOX3186	GOX2185	Periplasmic mannitol/sorbitol binding protein	chromosome	2395038	2393836
RGOX3630	GOX2186	Ribulokinase (EC 2.7.1.47)	chromosome	2396886	2395243
RGOX0864	GOX2187	Gluconate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.69) (NADP)	chromosome	2397170	2397937
RGOX0865	GOX2188	Gluconate permease	chromosome	2398069	2399412
RGOX0867	GOX0893	Transposase (class I)	chromosome	2399725	2400681
RGOX0868	GOX2190	Transcriptional regulator, AraC family	chromosome	2401661	2400684
RGOX3189	GOX2191	Transposase (class I)	chromosome	2403241	2402285
RGOX3190	GOX2192	Hypothetical protein	chromosome	2403386	2403673
RGOX3191	GOX2193	Hypothetical protein	chromosome	2403765	2404871
RGOX0869	GOX2194	Hypothetical protein	chromosome	2405113	2404787

RGOX0870	GOX2195	Transposase (class III)	chromosome	2406127	2405252
RGOX0872	GOX2197	N-formylglutamate deformylase (EC 3.5.1.68)	chromosome	2406898	2407842
RGOX3558	GOX0205	Transposase (class I)	chromosome	2408801	2407845
RGOX0875	GOX2199	probable myosin-crossreactive antigen	chromosome	2409142	2409969
RGOX0876	GOX2200	probable myosin-crossreactive antigen	chromosome	2409954	2411111
RGOX3559	GOX1476	Transposase (class II)	chromosome	2411312	2412388
RGOX0878	GOX2202	Putative acetyltransferase (EC 2.3.1.-)	chromosome	2413740	2412628
RGOX0879	GOX2203	Hypothetical protein	chromosome	2415560	2414223
RGOX0881	GOX2204	Transposase (class I)/ siderophore receptor protein	chromosome	2415837	2418404
RGOX0882	GOX2205	Hypothetical protein	chromosome	2418677	2419657
RGOX0883	GOX2206	5-Methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate--homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14)	chromosome	2419688	2420713
RGOX0884	GOX2207	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)	chromosome	2421883	2420957
RGOX0887	GOX2208	Transcriptional activator, MetR family	chromosome	2422013	2422903
RGOX3570	GOX0893	Transposase (class I) truncated	chromosome	2423654	2423343
RGOX0889	GOX0419	Transposase (class II)	chromosome	2423890	2424966
RGOX0891	GOX2211	Hypothetical protein	chromosome	2426690	2425206
RGOX0893	GOX2212	Hypothetical protein	chromosome	2428007	2426808
RGOX0895	GOX2213	Hypothetical protein	chromosome	2428099	2428701
RGOX0896	GOX2214	Putative carbohydrate kinase	chromosome	2428878	2430479
RGOX0898	GOX2215	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5)	chromosome	2430479	2432185
RGOX0899	GOX2216	Hypothetical protein	chromosome	2432192	2433181
RGOX0900	GOX2217	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	chromosome	2433305	2434129
RGOX0901	GOX2218	Ribose 5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6)	chromosome	2434211	2434690
RGOX0904	GOX2219	Ribose ABC transporter, periplasmic binding protein	chromosome	2434748	2435686
RGOX0905	GOX2220	Ribose ABC transporter, ATP-binding protein	chromosome	2435720	2437222
RGOX3561	GOX2221	Ribose ABC transporter, permease protein	chromosome	2437215	2438234
RGOX0910	GOX2222	Dihydroxyacetone kinase (EC 2.7.1.29)	chromosome	2438259	2440031
RGOX3645	GOX1720	Transposase (class V)	chromosome	2440503	2440811
RGOX3646	GOX0899	Transposase (class I)	chromosome	2442976	2442020
RGOX0913	GOX2225	Thiamine biosynthesis protein ThiC	chromosome	2443597	2445387
RGOX0915	GOX2226	Thiamine biosynthesis oxidoreductase ThiO	chromosome	2445387	2446322
RGOX0916	GOX2227	Thiazole biosynthesis protein ThiG	chromosome	2446515	2447270
RGOX0918	GOX2228	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase (EC 2.5.1.3)	chromosome	2447270	2447878
RGOX0919	GOX2229	Thiamin biosynthesis protein ThiF	chromosome	2447848	2448837
RGOX0921	GOX2230	Phosphomethylpyrimidine kinase ThiD (EC 2.7.4.7)	chromosome	2448837	2449592
RGOX0924	GOX2231	Putative sugar transporter	chromosome	2450940	2449609
RGOX0925	GOX2232	Hypothetical protein	chromosome	2452664	2451522
RGOX0927	GOX2234	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase (EC 5.3.1.14)	chromosome	2453554	2452901
RGOX0929	GOX2235	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase (EC 4.1.1.23)	chromosome	2454261	2453554
RGOX0930	GOX2236	Hypothetical protein	chromosome	2454351	2454857
RGOX0931	GOX2237	Protein translocase subunit SecB	chromosome	2455074	2455592
RGOX0935	GOX2238	Putative glycosyl transferase (EC 2.4.1.-)	chromosome	2455650	2458739
RGOX0938	GOX2239	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.14)	chromosome	2458788	2460221
RGOX0941	GOX2240	Pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxA	chromosome	2460227	2461228
RGOX0943	GOX2241	Pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxJ	chromosome	2461228	2461923
RGOX0944	GOX2242	Hypothetical protein	chromosome	2462123	2461794
RGOX0945	GOX2244	Hypothetical protein	chromosome	2462224	2462625
RGOX3201	GOX2245	Hypothetical protein	chromosome	2462762	2462983
RGOX0947	GOX2246	Hypothetical protein	chromosome	2463528	2463010
RGOX0948	GOX2247	Molybdopterin biosynthesis MoeB protein	chromosome	2463603	2464397
RGOX0949	GOX2248	Hypothetical protein	chromosome	2464397	2464771
RGOX0952	GOX2249	Aspartyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.12)	chromosome	2464859	2465791
RGOX0955	GOX2250	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	chromosome	2465819	2467246
RGOX0956	GOX2251	Putative arogenate dehydrogenase / prephenate dehydrogenase (EC 1.3.1.43)	chromosome	2468195	2467317
RGOX0958	GOX2252	Hypothetical protein	chromosome	2469361	2468195
RGOX0959	GOX2253	Putative oxidoreductase (similar to HpnA)	chromosome	2469484	2470500
RGOX0961	GOX2254	Putative glycosyl transferase (similar to HpnB)	chromosome	2470503	2471642
RGOX0964	GOX2255	Hypothetical protein	chromosome	2471843	2472502
RGOX0966	GOX2256	Histidinol-phosphate aminotransferase HisH (EC 2.6.1.9)	chromosome	2473703	2472537
RGOX3202	GOX2257	Hypothetical protein	chromosome	2474258	2473788
RGOX0969	GOX2258	Putative phytoene synthase (similar to HpnD)	chromosome	2474396	2475268
RGOX0970	GOX2259	Putative oxidoreductase (similar to HpnE)	chromosome	2475277	2476569
RGOX3628	GOX2260	Squalene-hopene cyclase	chromosome	2476646	2478637
RGOX0981	GOX2261	Putative transmembrane protein	chromosome	2480601	2479243
RGOX0983	GOX2262	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J	chromosome	2481463	2480660
RGOX0986	GOX2263	Exopolyphosphatase	chromosome	2482581	2481463
RGOX0989	GOX2265	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	chromosome	2482964	2484454
RGOX0990	GOX2266	Sun family protein	chromosome	2484514	2485884
RGOX0991	GOX2267	Putative acetyltransferase (EC 2.3.1.-)	chromosome	2486377	2485856
RGOX0993	GOX2268	Na(+)/H(+) antiporter	chromosome	2486470	2488269
RGOX0995	GOX2269	Hypothetical protein	chromosome	2488792	2488283
RGOX0997	GOX2270	Two component response regulator	chromosome	2488955	2489686
RGOX1000	GOX2271	Exodeoxyribonuclease III (EC 3.1.11.2)	chromosome	2490561	2490716
RGOX3203	GOX2272	Membrane-bound dipeptidase (EC 3.4.13.19)	chromosome	2490592	2491596
RGOX1001	GOX2273	UvrC, excinuclease ABC subunit C	chromosome	2491914	2493848
RGOX1002	GOX2274	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5)	chromosome	2493942	2494541
RGOX1003	GOX2275	Hypothetical protein	chromosome	2494647	2495249
RGOX1004	GOX2276	LexA repressor (EC 3.4.21.88)	chromosome	2496077	2495301
RGOX1005	GOX2277	LSU ribosomal protein L33P	chromosome	2496320	2496484

RGOX1006	GOX2278	Hypothetical protein	chromosome	2496900	2496574
RGOX1007	GOX2279	Enolase (C-terminal domain) (EC 4.2.1.11)	chromosome	2498322	2497045
RGOX1009	GOX2280	Hypothetical protein	chromosome	2498374	2498898
RGOX1010	GOX2281	2-Dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase (EC 4.1.2.16)	chromosome	2499722	2498901
RGOX1011	GOX2282	CTP synthase (EC 6.3.4.2)	chromosome	2501350	2499722
RGOX1012	GOX2283	Hypothetical protein	chromosome	2501795	2501457
RGOX1013	GOX2284	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	chromosome	2502592	2501795
RGOX1014	GOX2285	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	chromosome	2502793	2504727
RGOX1015	GOX2286	Anthranilate synthase subunit I (EC 4.1.3.27)	chromosome	2504730	2506139
RGOX1017	GOX2287	Anthranilate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18)	chromosome	2506794	2507882
RGOX1018	GOX2288	Indole-3-glycerol phosphate synthase (EC 4.1.1.48)	chromosome	2507882	2508805
RGOX3466	GOX2289	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit (EC 1.2.4.1)	chromosome	2508962	2509963
RGOX1021	GOX2290	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit (EC 1.2.4.1)	chromosome	2509970	2511334
RGOX1022	GOX2291	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase (EC 2.3.1.12)	chromosome	2511361	2512569
RGOX1023	GOX2292	Dihydrolipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	chromosome	2512576	2513979
RGOX1024	GOX2293	Lipoic acid synthetase (EC 2.8.-.-)	chromosome	2513988	2514953
RGOX1025	GOX2294	Hypothetical protein	chromosome	2514956	2515432
RGOX3206	GOX2295	Hypothetical protein	chromosome	2515522	2515827
RGOX1026	GOX2296	Hypothetical protein	chromosome	2516397	2515912
RGOX1027	GOX2297	Murein transglycosylase (EC 3.2.1.-)	chromosome	2518264	2516390
RGOX3572	GOX2298	Hypothetical protein	chromosome	2518263	2519054
RGOX1029	GOX2299	Adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2)	chromosome	2518942	2520270
RGOX1031	GOX2300	Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase PurS (EC 6.3.5.3)	chromosome	2520418	2521179
RGOX1032	GOX2301	Phosphoribosylformylglycinamide synthase PurL (EC 6.3.5.3)	chromosome	2521179	2521418
RGOX1033	GOX2302	Hypothetical protein	chromosome	2521418	2521822
RGOX1034	GOX2303	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3)	chromosome	2521822	2522520
RGOX1035	GOX2304	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3)	chromosome	2522520	2524721
RGOX1037	GOX2305	Hypothetical protein	chromosome	2524730	2524957
RGOX1038	GOX2306	Glutaredoxin	chromosome	2525049	2525381
RGOX1039	GOX2307	Hypothetical protein	chromosome	2525575	2525898
RGOX1040	GOX2308	Delta-aminolevulinic acid dehydratase (EC 4.2.1.24)	chromosome	2527284	2526277
RGOX1041	GOX2309	Amino acid permease	chromosome	2528731	2527292
RGOX1042	GOX2310	Serine hydroxymethyl transferase (EC 2.1.2.1)	chromosome	2528824	2530125
RGOX1043	GOX2311	Hypothetical protein	chromosome	2531267	2530128
RGOX1044	GOX2312	Mannosyltransferase	chromosome	2531616	2532665
RGOX3467	GOX2313	Lipopolysaccharide core biosynthesis mannosyltransferase	chromosome	2532839	2533726
RGOX1047	GOX2314	ATP-dependent RNA helicase	chromosome	2534917	2533739
RGOX1049	GOX2315	Hypothetical protein	chromosome	2534980	2535909
RGOX1050	GOX2316	Hypothetical protein	chromosome	2535925	2537808
RGOX1051	GOX2318	Prophage integrase	chromosome	2539229	2538138
RGOX1052	GOX2319	Hypothetical protein	chromosome	2540231	2539608
RGOX1053	GOX2320	Hypothetical protein	chromosome	2540976	2540422
RGOX1054	GOX2321	Hypothetical protein	chromosome	2541133	2542257
RGOX3211	GOX2322	Hypothetical protein	chromosome	2542510	2542136
RGOX3212	GOX2323	Hypothetical protein	chromosome	2542740	2542510
RGOX3213	GOX2324	Hypothetical protein	chromosome	2543165	2542743
RGOX1056	GOX2325	Hypothetical protein	chromosome	2543694	2543407
RGOX1057	GOX2326	Hypothetical protein	chromosome	2544384	2543770
RGOX3214	GOX2327	Hypothetical protein	chromosome	2544787	2545014
RGOX1058	GOX2328	Hypothetical protein	chromosome	2545120	2545446
RGOX1059	GOX2329	Hypothetical protein	chromosome	2545877	2546125
RGOX1060	GOX2330	Hypothetical protein	chromosome	2546121	2546567
RGOX1061	GOX2331	Replicative DNA helicase DnaB	chromosome	2546567	2548114
RGOX3217	GOX2332	Hypothetical protein	chromosome	2548159	2548395
RGOX1062	GOX2333	Hypothetical protein	chromosome	2548495	2549391
RGOX1063	GOX2334	Hypothetical protein	chromosome	2549391	2549861
RGOX1064	GOX2335	Hypothetical protein	chromosome	2550105	2550704
RGOX1065	GOX2336	Bacteriophage terminase large subunit	chromosome	2550682	2552832
RGOX1066	GOX2337	Hypothetical protein	chromosome	2552846	2553595
RGOX1067	GOX2338	Hypothetical protein	chromosome	2553595	2553879
RGOX1068	GOX2339	Bacteriophage capsid structural protein	chromosome	2553879	2555564
RGOX1069	GOX2340	Bacteriophage minor capsid protein C	chromosome	2555564	2556358
RGOX1070	GOX2341	Hypothetical protein	chromosome	2556412	2557086
RGOX1071	GOX2342	Hypothetical protein	chromosome	2557095	2557514
RGOX3468	GOX2343	Hypothetical protein	chromosome	2557529	2558605
RGOX1074	GOX2344	Hypothetical protein	chromosome	2558611	2558925
RGOX1075	GOX2345	Hypothetical protein	chromosome	2558952	2559314
RGOX1076	GOX2346	Hypothetical protein	chromosome	2559292	2559810
RGOX1077	GOX2347	Bacteriophage tail sheath protein	chromosome	2560043	2561518
RGOX1078	GOX2348	Hypothetical protein	chromosome	2561531	2561911
RGOX1079	GOX2349	Hypothetical protein	chromosome	2561911	2562597
RGOX1080	GOX2350	Hypothetical protein	chromosome	2562721	2564580
RGOX1081	GOX2351	Bacteriophage protein	chromosome	2564611	2565906
RGOX1082	GOX2352	Bacteriophage tail protein	chromosome	2565906	2567042
RGOX1083	GOX2353	Bacteriophage protein	chromosome	2567056	2567565
RGOX1084	GOX2354	Bacteriophage protein	chromosome	2567577	2568077
RGOX1085	GOX2355	Bacteriophage protein	chromosome	2568080	2569192
RGOX1086	GOX2356	Bacteriophage tail protein	chromosome	2569198	2569830
RGOX1087	GOX2357	Bacteriophage tail fiber protein	chromosome	2569847	2570629

RGOX1088	GOX2358	Hypothetical protein	chromosome	2570756	2571076
RGOX1089	GOX2359	Hypothetical protein	chromosome	2571267	2571713
RGOX1090	GOX2360	Hypothetical protein	chromosome	2571720	2572121
RGOX1091	GOX2361	Hypothetical protein	chromosome	2572121	2574400
RGOX3573	GOX2362	Hypothetical protein	chromosome	2574843	2575319
RGOX1096	GOX2363	Hypothetical protein	chromosome	2575345	2576778
RGOX1095	GOX2364	Hypothetical protein	chromosome	2578334	2576751
RGOX1100	GOX2365	Hypothetical protein	chromosome	2578535	2579176
RGOX1101	GOX2366	Hypothetical protein	chromosome	2579838	2579236
RGOX3539	GOX2367	UmuC protein	chromosome	2581166	2579907
RGOX1104	GOX2368	Hypothetical protein	chromosome	2581543	2581166
RGOX3648	GOX2369	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	chromosome	2582072	2582833
RGOX3003	GOX2370	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaA (N-terminal domain missing)	chromosome	2582676	2583278
RGOX3006	GOX2371	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	2584141	2583281
RGOX3007	GOX2372	Transcriptional regulator, LysR family	chromosome	2584240	2585148
RGOX3008	GOX2373	Ring-hydroxylating dioxygenase	chromosome	2585618	2586706
RGOX3009	GOX2374	Hypothetical protein	chromosome	2587473	2586943
RGOX3220	GOX1057	Transposase (class I)	chromosome	2587706	2588662
RGOX1107	GOX2376	Putative aldehyde dehydrogenase	chromosome	2589528	2588665
RGOX1109	GOX2377	Transcriptional regulator, TetR family	chromosome	2589629	2590234
RGOX1110	GOX2378	Short chain alcohol dehydrogenase	chromosome	2590440	2591294
RGOX1112	GOX2379	Hypothetical protein	chromosome	2591527	2591832
RGOX1114	GOX2380	Hypothetical protein	chromosome	2592450	2591848
RGOX1115	GOX2382	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B (EC 6.3.5.-)	chromosome	2594210	2592756
RGOX1116	GOX2383	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A (EC 6.3.5.-)	chromosome	2595694	2594210
RGOX3221	GOX2384	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C (EC 6.3.5.-)	chromosome	2595981	2595697
RGOX1119	GOX2385	DNA integration/recombination/inversion protein	chromosome	2596051	2596530
RGOX1120	GOX2386	Hypothetical transmembrane protein	chromosome	2597740	2596907
RGOX1121	GOX2387	Xaa-Pro aminopeptidase (EC 3.4.11.9)	chromosome	2599571	2597793
RGOX1122	GOX2388	Putative acetyltransferase (Antibiotic resistance) protein	chromosome	2600089	2599571
RGOX1123	GOX2389	Ribosomal protein L11 methyltransferase	chromosome	2601018	2600116
RGOX1125	GOX2390	DNA helicase II (EC 3.6.1.-)	chromosome	2603240	2601021
RGOX3222	GOX2391	DNA repair protein RadC	chromosome	2603268	2603954
RGOX1126	GOX2392	DNA repair protein RadC	chromosome	2604064	2604711
RGOX1128	GOX2393	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit (EC 4.1.1.21)	chromosome	2605840	2604722
RGOX3223	GOX2394	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit (EC 4.1.1.21)	chromosome	2606319	2605840
RGOX3224	GOX2395	Hypothetical protein	chromosome	2606562	2606365
RGOX3225	GOX2396	Hypothetical protein	chromosome	2607298	2606717
RGOX3226	GOX2397	Small heat shock protein	chromosome	2607969	2607514
RGOX3227	GOX2398	LSU ribosomal protein L31P	chromosome	2608354	2608130
RGOX3228	GOX2399	Large-conductance mechanosensitive channel	chromosome	2608458	2609000
RGOX1133	GOX2400	Hypothetical protein	chromosome	2609003	2609392
RGOX3629	GOX2401	Protein-export membrane protein, SecD/SecE family	chromosome	2610370	2609435
RGOX1135	GOX2402	Protein translocase subunit SecD	chromosome	2611917	2610379
RGOX1138	GOX2403	Putative oxidoreductase (NAD-binding motive)	chromosome	2612077	2613069
RGOX1139	GOX2404	ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2614896	2613091
RGOX1141	GOX2405	Two component response regulator	chromosome	2615698	2614961
RGOX1142	GOX2406	Putative RNA polymerase sigma-E factor (sigma-24) protein 1	chromosome	2615837	2616424
RGOX1143	GOX2407	Putative RNA polymerase sigma-E factor (sigma-24) protein 2	chromosome	2616560	2617132
RGOX3563	GOX2408	Putative sensory transduction histidine kinase	chromosome	2617623	2619377
RGOX3230	GOX2409	Transport ATP-binding protein CydD	chromosome	2619493	2621175
RGOX1150	GOX2410	Transport ATP-binding protein CydD	chromosome	2621175	2622854
RGOX1151	GOX2411	Hypothetical protein	chromosome	2622912	2623316
RGOX1154	GOX2412	ATP-dependent DNA helicase RecQ (EC 3.6.1.-)	chromosome	2623246	2625198
RGOX1156	GOX2413	Hypothetical protein	chromosome	2625759	2625211
RGOX1158	GOX2414	Hypothetical protein	chromosome	2625819	2626316
RGOX3231	GOX2415	NusB family protein	chromosome	2626316	2626795
RGOX1161	GOX2416	Thiamin-monophosphate kinase (EC 2.7.4.16)	chromosome	2626802	2627776
RGOX1164	GOX2417	Hypothetical protein	chromosome	2628997	2627807
RGOX1167	GOX2418	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	chromosome	2629137	2629937
RGOX1170	GOX2419	Glucokinase (EC 2.7.1.2)	chromosome	2630053	2631018
RGOX1173	GOX2420	Hypothetical protein	chromosome	2631770	2632105
RGOX1174	GOX2421	Hypothetical protein	chromosome	2632578	2632168
RGOX3235	GOX2422	Hypothetical protein	chromosome	2632977	2632645
RGOX1178	GOX2423	Hypothetical protein	chromosome	2634431	2632998
RGOX3631	GOX2424	Hypothetical protein	chromosome	2634939	2635322
RGOX3239	GOX2425	Hypothetical protein	chromosome	2636371	2635376
RGOX3240	GOX0578	Transposase (IS12528)	chromosome	2636476	2637270
RGOX3241	GOX2427	Hypothetical protein	chromosome	2638896	2637292
RGOX3243	GOX2428	Hypothetical protein	chromosome	2639417	2638971
RGOX1179	GOX2429	Hypothetical protein	chromosome	2641206	2640055
RGOX1180	GOX2430	Hypothetical protein	chromosome	2641920	2641219
RGOX3244	GOX2431	Hypothetical protein	chromosome	2643046	2641916
RGOX1182	GOX2432	Hypothetical protein	chromosome	2643413	2643051
RGOX1183	GOX2433	Phage-related baseplate assembly protein	chromosome	2644081	2643413
RGOX1184	GOX2434	Hypothetical protein	chromosome	2645249	2644077
RGOX1185	GOX2435	Hypothetical protein	chromosome	2646175	2645456
RGOX1186	GOX2436	Endonuclease (EC 3.1.30.-)	chromosome	2646466	2647194
RGOX1187	GOX2437	Hypothetical protein	chromosome	2648171	2647383

RGOX1188	GOX2438	Hypothetical protein	chromosome	2649628	2648306
RGOX1189	GOX2439	Hypothetical protein	chromosome	2650344	2650589
RGOX1190	GOX2440	Hypothetical protein	chromosome	2651609	2650758
RGOX1191	GOX2441	Hypothetical protein	chromosome	2652034	2651609
RGOX1193	GOX2442	Hypothetical protein	chromosome	2652273	2652770
RGOX1192	GOX2443	Hypothetical protein	chromosome	2653265	2652756
RGOX1194	GOX2444	Hypothetical protein	chromosome	2653418	2653948
RGOX1195	GOX2445	Putative phage-related protein	chromosome	2654529	2654017
RGOX1196	GOX2446	Hypothetical protein	chromosome	2655077	2654532
RGOX1198	GOX2447	Hypothetical protein	chromosome	2655444	2655022
RGOX1199	GOX2448	Putative phage-related protein	chromosome	2656935	2655457
RGOX1200	GOX2449	Hypothetical protein	chromosome	2657676	2657116
RGOX1201	GOX2450	Hypothetical protein	chromosome	2658670	2657972
RGOX1204	GOX2451	Hypothetical protein	chromosome	2659446	2659033
RGOX1206	GOX2452	Hypothetical protein	chromosome	2659888	2659460
RGOX1207	GOX2453	Hypothetical protein	chromosome	2660094	2659876
RGOX1209	GOX2454	Hypothetical protein	chromosome	2661494	2660097
RGOX1210	GOX2455	Putative phage-related protein	chromosome	2662150	2661536
RGOX1211	GOX2456	Hypothetical protein	chromosome	2663653	2662163
RGOX1212	GOX2457	Phage DNA Packaging Protein	chromosome	2664964	2663660
RGOX1213	GOX2458	Phage Terminase Small Subunit	chromosome	2665480	2664971
RGOX1214	GOX2459	Hypothetical protein	chromosome	2665563	2666129
RGOX1215	GOX2460	Hypothetical protein	chromosome	2667116	2666499
RGOX1216	GOX2461	Hypothetical protein	chromosome	2667179	2667463
RGOX1217	GOX2462	Transcriptional regulator	chromosome	2667635	2668147
RGOX1218	GOX2463	Hypothetical protein	chromosome	2668147	2668578
RGOX1220	GOX2464	Hypothetical protein	chromosome	2670127	2669285
RGOX1221	GOX2465	Putative phage-related protein	chromosome	2671020	2670127
RGOX1223	GOX2466	Hypothetical protein	chromosome	2671692	2671429
RGOX3245	GOX2467	Hypothetical protein	chromosome	2671907	2671692
RGOX3246	GOX2468	Hypothetical protein	chromosome	2672406	2672071
RGOX1224	GOX2469	Hypothetical protein	chromosome	2673165	2672647
RGOX1225	GOX2470	Hypothetical protein	chromosome	2673777	2673244
RGOX1226	GOX2471	Putative transcriptional regulator	chromosome	2673986	2674432
RGOX1228	GOX2472	Phage-related DNA binding protein	chromosome	2674647	2675366
RGOX1230	GOX2473	Hypothetical protein	chromosome	2675369	2675635
RGOX3248	GOX2474	Hypothetical protein	chromosome	2675638	2675814
RGOX1231	GOX2475	Hypothetical protein	chromosome	2675846	2676133
RGOX1232	GOX2476	Hypothetical protein	chromosome	2676133	2676591
RGOX1233	GOX2477	Hypothetical protein	chromosome	2676599	2677459
RGOX1234	GOX2478	Hypothetical protein	chromosome	2677459	2677755
RGOX1235	GOX2479	Phage-related protein	chromosome	2677928	2679019
RGOX3641	GOX1343	Transposase (class III)	chromosome	2679691	2680566
RGOX1238	GOX2481	Hypothetical protein	chromosome	2680810	2681076
RGOX1239	GOX2482	Hypothetical protein	chromosome	2681079	2681381
RGOX1240	GOX2483	Hypothetical protein	chromosome	2681381	2681662
RGOX1241	GOX2484	Hypothetical protein	chromosome	2681662	2682030
RGOX1242	GOX2485	Phage related integrase	chromosome	2682323	2683318
RGOX1243	GOX2487	Outer membrane protein TolC	chromosome	2683610	2685040
RGOX1244	GOX2488	Hypothetical protein	chromosome	2685204	2685593
RGOX3469	GOX2489	Valyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.9)	chromosome	2685652	2688315
RGOX1247	GOX2490	Hypothetical protein	chromosome	2688311	2689186
RGOX1248	GOX2491	Dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9)	chromosome	2691023	2689170
RGOX3614	GOX2492	Alpha-amino acid ester hydrolase (EC 3.1.1.43)	chromosome	2691176	2693119
RGOX1250	GOX2493	Peptide methionine sulfoxide reductase (EC 1.8.4.6)	chromosome	2693211	2693753
RGOX3470	GOX2494	Hypothetical protein	chromosome	2693810	2695189
RGOX1253	GOX2495	Nitrate ABC transporter ATP-binding protein	chromosome	2696515	2695205
RGOX1255	GOX2496	Transport protein	chromosome	2698184	2696544
RGOX1256	GOX2497	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23)	chromosome	2698730	2698278
RGOX1257	GOX2498	Phosphopantothenate-cysteine ligase (EC 6.3.2.5)	chromosome	2700031	2698763
RGOX1258	GOX2499	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	chromosome	2700743	2699958
RGOX1259	GOX2500	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (EC 3.2.2.23)	chromosome	2700774	2701604
RGOX1261	GOX2501	SSU ribosomal protein S20P	chromosome	2701734	2702000
RGOX2814	GOX2502	Hypothetical protein	plasmid1	1366	554
RGOX2816	GOX2503	Hypothetical protein	plasmid1	1668	2759
RGOX2817	GOX2504	Hypothetical protein	plasmid1	2819	3154
RGOX2818	GOX2505	Metal dependent phosphohydrolase	plasmid1	3801	3094
RGOX2819	GOX2506	Hypothetical protein	plasmid1	4243	3812
RGOX3330	GOX2507	Hypothetical protein	plasmid1	4869	4585
RGOX3331	GOX2508	Hypothetical protein	plasmid1	5357	4884
RGOX2823	GOX2509	Hypothetical protein	plasmid1	5955	5428
RGOX2824	GOX2510	Hypothetical protein	plasmid1	6379	6029
RGOX2826	GOX2511	Putative sugar kinase	plasmid1	7038	9239
RGOX2827	GOX2512	Hypothetical protein	plasmid1	9239	10264
RGOX2828	GOX2513	Hypothetical protein	plasmid1	10195	11142
RGOX2830	GOX2514	Transposase (class IV)	plasmid1	12056	11229
RGOX3332	GOX2515	Hypothetical protein	plasmid1	12182	12655
RGOX3333	GOX2516	Hypothetical protein	plasmid1	12741	12995
RGOX2831	GOX2517	Hypothetical protein	plasmid1	13510	14622

RGOX3015	GOX2518	Hypothetical protein	plasmid1	14622	16844
RGOX3016	GOX2519	Hypothetical protein	plasmid1	16834	17979
RGOX3547	GOX2520	Conserved protein similar to ComE operon protein 3	plasmid1	18802	17987
RGOX3334	#NV	Transposase	plasmid1	19192	19662
RGOX2832	GOX2522	Transposase	plasmid1	19665	19970
RGOX2833	GOX2523	DNA helicase II UvrD	plasmid1	22189	20144
RGOX2834	GOX2524	Hypothetical protein	plasmid1	22838	22158
RGOX2837	GOX2525	Hypothetical protein similar to Tlorf40 protein	plasmid1	23820	22852
RGOX2838	GOX2526	Hypothetical protein	plasmid1	24129	24575
RGOX2840	GOX2527	Endonuclease (EC 3.1.30.-)	plasmid1	25354	24524
RGOX2841	GOX2528	Hypothetical protein	plasmid1	26007	25771
RGOX3336	GOX2529	Hypothetical protein	plasmid1	26289	26804
RGOX2843	GOX2530	Hypothetical protein	plasmid1	27322	26792
RGOX3337	GOX2531	Hypothetical protein	plasmid1	27546	27322
RGOX2846	GOX2532	Hypothetical protein similar to Tlorf46 protein	plasmid1	28315	27584
RGOX2847	GOX2533	Hypothetical protein	plasmid1	28353	29069
RGOX2848	GOX2534	Hypothetical protein	plasmid1	29608	28997
RGOX2849	GOX2535	Hypothetical protein	plasmid1	29672	30562
RGOX2851	GOX2536	Hypothetical protein	plasmid1	31613	31008
RGOX2852	GOX2537	Hypothetical protein similar to Tlorf49 protein	plasmid1	33564	31705
RGOX2853	GOX2538	Hypothetical protein	plasmid1	34034	33612
RGOX3340	GOX2539	Hypothetical protein	plasmid1	34532	34227
RGOX3341	GOX2540	Hypothetical protein	plasmid1	34870	34532
RGOX2856	GOX2541	Hypothetical protein	plasmid1	35502	34870
RGOX2857	GOX2542	DNA methylase	plasmid1	40778	35640
RGOX2859	GOX2543	Hypothetical protein	plasmid1	41129	41506
RGOX2860	GOX2544	Transcriptional regulator protein	plasmid1	41502	41996
RGOX2861	GOX2545	Hypothetical protein	plasmid1	42973	42005
RGOX2862	GOX2546	Replication protein A	plasmid1	43690	44901
RGOX2863	GOX2547	Replication protein B	plasmid1	45047	46099
RGOX2864	GOX2548	Plasmid replication protein	plasmid1	47124	46102
RGOX3524	GOX2549	Integrase-like protein	plasmid1	49058	47613
RGOX2867	GOX2550	DNA binding helix-turn helix protein	plasmid1	49426	49136
RGOX2868	GOX2551	Hypothetical protein	plasmid1	49521	49964
RGOX3094	GOX2552	Hypothetical protein	plasmid1	50780	50040
RGOX2869	GOX2553	Hypothetical protein	plasmid1	50798	51448
RGOX2870	GOX2554	Plasmid stability-like protein	plasmid1	51451	51876
RGOX2871	GOX2555	Hypothetical protein	plasmid1	53170	52280
RGOX2873	GOX2556	Putative transcriptional regulator	plasmid1	53883	54233
RGOX3344	GOX2557	Transposase	plasmid1	54191	54757
RGOX2875	GOX2558	Transposase	plasmid1	54760	54984
RGOX2874	GOX2559	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	plasmid1	57869	54981
RGOX2876	GOX2560	Membrane permease, putative cation efflux pump	plasmid1	58903	57872
RGOX3525	GOX2561	CztC protein	plasmid1	60159	58903
RGOX3548	#NV	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	plasmid1	60673	60338
RGOX3345	#NV	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcC	plasmid1	60984	60727
RGOX2879	GOX2564	PemK-like protein	plasmid1	61975	61649
RGOX2880	GOX2565	PemI-like protein	plasmid1	62218	61979
RGOX2881	GOX2566	Hypothetical protein	plasmid1	63098	62364
RGOX2882	GOX2567	Putative type I restriction enzyme	plasmid1	66397	63104
RGOX2883	GOX2568	Type I restriction-modification enzyme S subunit	plasmid1	67635	66430
RGOX2884	GOX2569	Type I restriction enzyme M protein	plasmid1	69145	67622
RGOX2885	GOX2570	Hypothetical protein	plasmid1	69777	69184
RGOX2886	GOX2571	Hypothetical protein	plasmid1	69923	71296
RGOX3348	GOX2572	Hypothetical protein	plasmid1	71396	72505
RGOX2888	GOX2573	Hypothetical protein	plasmid1	72913	73671
RGOX2889	GOX2574	Transposase (IS12528)	plasmid1	73714	74535
RGOX2890	GOX2575	Hypothetical protein	plasmid1	74601	75188
RGOX2891	GOX2576	Hypothetical protein	plasmid1	75747	75310
RGOX2892	GOX2577	Membrane-bound transport protein	plasmid1	77475	76075
RGOX2893	GOX2578	Putative isochorismatase (EC 3.3.2.1)	plasmid1	78090	77527
RGOX2894	GOX2579	Transcriptional regulator, TetR family	plasmid1	78199	78852
RGOX2895	GOX2580	Hypothetical protein	plasmid1	79157	80425
RGOX2896	GOX2581	Hypothetical protein	plasmid1	80952	81350
RGOX2897	GOX2582	Hypothetical protein	plasmid1	81359	81832
RGOX2898	GOX2583	Hypothetical protein	plasmid1	82087	82446
RGOX2899	GOX2584	Hypothetical protein, similar to AGR_pAT_142p	plasmid1	82990	82466
RGOX3349	GOX2585	Transposase	plasmid1	82898	83158
RGOX2900	GOX2586	Transposase	plasmid1	83148	83981
RGOX2901	GOX2587	Hypothetical protein	plasmid1	84316	84993
RGOX2902	GOX2588	Transposase	plasmid1	85904	85161
RGOX3623	GOX2585	Transposase	plasmid1	86164	85904
RGOX3350	GOX2590	Hypothetical protein	plasmid1	86432	86202
RGOX2904	GOX2591	Transposase	plasmid1	87373	86648
RGOX2905	GOX2592	Transposase	plasmid1	88321	87446
RGOX3351	GOX2593	Transposase (class V)	plasmid1	88629	88321
RGOX2907	GOX2594	Putative oxidoreductase transmembrane protein	plasmid1	89704	88697
RGOX2908	GOX2595	Hypothetical protein related to cinnamoyl ester hydrolase	plasmid1	89806	90189
RGOX3353	GOX2596	Hypothetical protein	plasmid1	90527	91009

RGOX3354	GOX2597	Transposase	plasmid1	91656	91063
RGOX2910	GOX2598	DNA polymerase III alpha subunit (N-terminus missing))	plasmid1	91346	94048
RGOX2911	GOX2599	Hypothetical protein	plasmid1	94172	95008
RGOX2912	GOX2600	Hypothetical protein	plasmid1	95756	95400
RGOX2913	GOX2601	Hypothetical membrane protein	plasmid1	96724	95900
RGOX2914	GOX2602	Hypothetical membrane protein	plasmid1	97840	96983
RGOX2916	GOX2603	Replicator initiator RepC	plasmid1	99708	98347
RGOX2917	GOX2604	Hypothetical protein	plasmid1	100715	100089
RGOX2918	GOX2605	Hypothetical protein	plasmid1	101272	100802
RGOX2919	GOX2606	Hypothetical protein	plasmid1	101408	102340
RGOX2920	GOX2607	Hypothetical protein	plasmid1	102472	102789
RGOX3355	GOX2608	Hypothetical protein	plasmid1	103120	102815
RGOX2921	GOX2609	Hypothetical protein	plasmid1	103440	103120
RGOX2922	GOX2610	Hypothetical membrane protein related to TraY	plasmid1	105762	103456
RGOX2923	GOX2611	Hypothetical protein	plasmid1	107444	105771
RGOX2924	GOX2612	Hypothetical protein	plasmid1	108641	107469
RGOX2925	GOX2613	Hypothetical protein	plasmid1	109312	108641
RGOX2926	GOX2614	Hypothetical protein	plasmid1	109413	109658
RGOX2927	GOX2615	Hypothetical protein	plasmid1	109707	110462
RGOX2928	GOX2616	DotI protein	plasmid1	110465	111109
RGOX2929	GOX2617	DotH protein	plasmid1	111113	112036
RGOX2931	GOX2618	DotG protein	plasmid1	112697	113287
RGOX2932	GOX2619	Hypothetical protein	plasmid1	113363	114562
RGOX3358	GOX2620	Hypothetical protein	plasmid1	114735	115109
RGOX3360	GOX2621	Hypothetical protein	plasmid1	115569	116108
RGOX2935	GOX2622	DotO/TraU/IcmB protein	plasmid1	116111	119266
RGOX2936	GOX2623	Conjugal transfer protein TrbG	plasmid1	119266	120231
RGOX2937	GOX2624	Hypothetical protein	plasmid1	120231	121169
RGOX2938	GOX2625	Hypothetical protein related to PilN	plasmid1	121169	122881
RGOX2939	GOX2626	Hypothetical protein	plasmid1	122881	123525
RGOX2940	GOX2627	Hypothetical protein	plasmid1	123525	124706
RGOX2941	GOX2628	Nucleotide binding protein PilQ	plasmid1	124706	126388
RGOX2942	GOX2629	Integral membrane protein PilR	plasmid1	126391	127518
RGOX2943	GOX2630	Hypothetical protein	plasmid1	127559	128080
RGOX3361	GOX2631	Hypothetical protein	plasmid1	128090	128560
RGOX2944	GOX2632	Pili membrane scaffold protein PilV	plasmid1	128565	129908
RGOX2945	GOX2633	Hypothetical protein	plasmid1	129818	130690
RGOX2946	GOX2634	Conjugal transfer protein TrbN	plasmid1	130798	131394
RGOX2947	GOX2635	Hypothetical protein	plasmid1	131403	131837
RGOX2948	GOX2636	DotC/TraI protein	plasmid1	131833	132765
RGOX2949	GOX2637	Hypothetical protein related to IcmP	plasmid1	132768	133898
RGOX3362	GOX2638	Hypothetical protein	plasmid1	133832	134257
RGOX2950	GOX2639	Twitching motility protein PilT	plasmid1	134257	135369
RGOX2952	GOX2640	IcmT protein	plasmid1	135372	135617
RGOX2953	GOX2641	DotL/TrbC/IcmO protein	plasmid1	136430	138676
RGOX2954	GOX2642	Conjugal transfer protein TraA	plasmid1	141924	138724
RGOX2955	GOX2643	Hypothetical protein	plasmid1	142199	141924
RGOX2956	GOX2644	Hypothetical protein	plasmid1	142695	142285
RGOX2959	GOX2645	Transposase	plasmid1	145756	142802
RGOX2960	GOX2646	DNA integration/recombination/inversion protein	plasmid1	145870	146502
RGOX2961	GOX2647	Hydroxyacylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.6)	plasmid1	146641	147963
RGOX2962	GOX2648	Hypothetical protein	plasmid1	147963	148334
RGOX2963	GOX2649	Transcriptional regulator LysR family	plasmid1	148334	149227
RGOX2964	GOX2650	Putative C4-dicarboxylate transport protein	plasmid1	149227	150345
RGOX2965	GOX2651	Hypothetical protein	plasmid1	151257	150673
RGOX2966	GOX2652	Hypothetical protein	plasmid1	152127	151267
RGOX2967	GOX2653	Integral membrane protein	plasmid1	152530	152961
RGOX2968	GOX2654	Integral membrane protein	plasmid1	152978	153418
RGOX3365	GOX2655	Hypothetical protein	plasmid1	153471	153860
RGOX3366	GOX2656	Hypothetical protein	plasmid1	154354	155145
RGOX2971	GOX2657	Putative sulfate-binding protein	plasmid1	155162	156193
RGOX2972	GOX2658	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	plasmid1	156209	157315
RGOX2973	GOX2659	Transposase	plasmid1	158025	158429
RGOX2974	GOX2660	Transposase	plasmid1	158504	158800
RGOX3367	GOX2661	Hypothetical protein	plasmid1	159134	158859
RGOX2975	GOX2662	Hypothetical protein	plasmid1	159412	160317
RGOX2976	GOX2663	Hypothetical protein	plasmid1	160408	161187
RGOX2977	GOX2664	Hypothetical protein	plasmid1	161247	161831
RGOX3368	GOX2665	Hypothetical protein	plasmid1	162217	161999
RGOX2978	GOX2666	Hypothetical protein similar to AGR pTi 204p	plasmid1	162966	162313
RGOX3579	#NV	Conserved hypothetical protein	plasmid2	669	1682
RGOX3581	GOX2668	Transcriptional regulator, MucR family	plasmid2	2185	1691
RGOX3582	GOX2669	Hypothetical protein	plasmid2	2521	2781
RGOX3583	GOX2670	Transposase (class I)	plasmid2	3107	4063
RGOX3584	GOX2671	Hypothetical protein	plasmid2	4356	4072
RGOX3585	GOX2672	Hypothetical protein	plasmid2	4457	4702
RGOX3586	GOX2673	ATP-dependent DNA helicase Rep	plasmid2	4936	5418
RGOX3587	GOX2674	Death on curing protein	plasmid2	5804	6196
RGOX3588	GOX2675	Transposase	plasmid2	6289	6657

RGOX3589	GOX2676	Putative alcohol/aldehyde dehydrogenase	plasmid2	8319	7141
RGOX3590	GOX2677	Transposase (class I)	plasmid2	9438	8482
RGOX3591	GOX2678	Transposase (class II)	plasmid2	10314	9649
RGOX3592	GOX2722	Transposase	plasmid2	10954	11259
RGOX3593	GOX2680	Transposon gamma-delta resolvase	plasmid2	12352	11762
RGOX3594	GOX2681	Hypothetical protein	plasmid2	12540	12824
RGOX3595	GOX2682	Conserved hypothetical protein	plasmid2	12827	13213
RGOX3596	GOX2683	Hypothetical protein	plasmid2	14039	13518
RGOX3597	GOX2684	NAD(P)H-dependent 2-cyclohexen-1-one reductase	plasmid2	14407	15477
RGOX3598	GOX2685	Transposase	plasmid2	16378	15818
RGOX3599	GOX2686	Hypothetical protein	plasmid2	17540	16653
RGOX3626	GOX2687	Transposase (class II)	plasmid2	18883	17807
RGOX3602	GOX2688	Hypothetical protein	plasmid2	19525	18923
RGOX3603	GOX2689	Hypothetical protein	plasmid2	19648	20283
RGOX3604	GOX2690	Hypothetical protein	plasmid2	20645	20956
RGOX3605	GOX2691	Integrase-like protein	plasmid2	20913	22358
RGOX3606	GOX2692	Transposase (IS12528)	plasmid2	22549	23370
RGOX3607	GOX2693	Replication initiation protein RepA	plasmid2	23686	24600
RGOX3608	GOX2694	Plasmid partitioning protein homolog ParA	plasmid2	24744	25421
RGOX3609	GOX2695	Hypothetical protein	plasmid2	26498	25938
RGOX2980	GOX2696	Plasmid stabilization protein	plasmid3	394	813
RGOX3379	GOX2697	Hypothetical protein	plasmid3	1166	1468
RGOX2982	GOX2698	Hypothetical protein	plasmid3	1704	2111
RGOX2984	GOX2699	Hypothetical protein	plasmid3	3922	2156
RGOX3380	GOX2700	Transposon gamma-delta resolvase	plasmid3	4041	4694
RGOX2985	GOX2701	DNA integration/recombination/inversion protein	plasmid3	4740	5411
RGOX3381	GOX2702	Plasmid partitioning protein homolog ParA	plasmid3	5499	6173
RGOX3382	GOX2703	Hypothetical protein	plasmid3	6173	6445
RGOX3383	GOX2704	Replication initiation protein RepA	plasmid3	7610	6513
RGOX2986	GOX2705	Hypothetical protein	plasmid3	8078	8389
RGOX3384	GOX2706	Conserved hypothetical protein	plasmid3	8450	8626
RGOX2988	GOX2707	DNA-binding protein, CopG family	plasmid3	8640	9053
RGOX3385	GOX2708	Hypothetical protein	plasmid3	9116	9304
RGOX2989	GOX2709	Hypothetical protein	plasmid3	9323	9664
RGOX3557	GOX2710	Hypothetical protein	plasmid3	9939	9610
RGOX3386	GOX2711	Conjugal transfer protein, TraD	plasmid3	10282	10046
RGOX2991	GOX2712	Hypothetical protein	plasmid3	10706	10350
RGOX2995	GOX2713	Conjugal transfer protein, TraA	plasmid3	10803	13886
RGOX3565	GOX2714	Transposase (class I)	plasmid4	128	1099
RGOX3549	GOX2715	Hypothetical protein	plasmid4	1784	2266
RGOX3370	GOX2716	Plasmid partitioning protein homolog ParA	plasmid4	2694	3392
RGOX3371	GOX2717	Hypothetical protein	plasmid4	3392	3664
RGOX3624	GOX2718	Transposase (class II)	plasmid4	5174	4098
RGOX3067	GOX2719	Transposase (highly homologous to N-terminus 3556, 3555)	plasmid4	5609	5214
RGOX3372	GOX2720	Hypothetical protein	plasmid4	5899	5735
RGOX3625	GOX2721	Transposase (class II)	plasmid4	6241	7101
RGOX3069	GOX2679	Transposase (fragment)	plasmid4	7390	7695
RGOX3373	GOX2723	Hypothetical protein	plasmid4	7928	7698
RGOX3374	GOX2724	Hypothetical protein	plasmid4	8188	8808
RGOX3375	GOX2725	Hypothetical protein	plasmid4	8943	9167
RGOX3070	GOX2726	Conserved hypothetical protein	plasmid4	9619	9293
RGOX3071	GOX2727	Hypothetical protein	plasmid4	10097	10531
RGOX3074	GOX2728	Transposon gamma-delta resolvase (C-terminus missing)	plasmid4	10822	11472
RGOX3376	GOX2729	Transposase	plasmid4	11608	12078
RGOX3377	GOX2730	Conserved hypothetical protein (fragment)	plasmid4	12081	12236
RGOX3017	GOX2731	Transposase (class IV)	plasmid4	13054	12227
RGOX3415	GOX2732	Replication protein	plasmid5	320	862
RGOX3550	GOX2733	Conserved hypothetical protein	plasmid5	1164	922
RGOX3551	GOX2734	Hypothetical protein	plasmid5	1395	1201
RGOX3416	GOX2735	PemK-like protein	plasmid5	1539	1961

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk für die Übernahme des Hauptreferats, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die stets gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. A. Ehrenreich danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seinem Transkriptionsanalyse-Labor und für die Betreuung dieser Arbeit nach dem Fortgang von Herrn Prof. Deppenmeier in die USA. Ebenso danke ich für die gewährten Freiräume beim Erlernen des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens und für die Durchsicht des Manuskripts der vorliegenden Dissertation.

Für die freundliche Überlassung des Themas der Anreicherung einer membrangebundenen Dehydrogenase gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. U. Deppenmeier, der einem Ruf an die Universität Milwaukee, USA, gefolgt ist.

Auch bei Frau Prof. Dr. R. Schmitz-Streit möchte ich mich sehr herzlich für die Bereitschaft bedanken, trotz Fortgang nach Kiel, das Korreferat meiner Dissertation zu übernehmen. Hinzu kommt mein Dank für die sehr hilfreichen Ratschläge in fachlichen Diskussionen. Ein herzliches Dankeschön auch dafür, dass ich ‚assoziertes Labormitglied‘ sein durfte.

Für die sehr nette Atmosphäre im Labor und die ständige Hilfsbereitschaft möchte ich mich beim derzeitigen Laborteam 255 bedanken. Dieser Dank gilt insbesondere Birgit Veith, u.a. für die Unterstützung beim Erlernen der Microarray-Technologie oder für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein ebenso herzlicher Dank geht an Silke Steckel für die äußerst wertvolle Unterstützung im Labor. Auch dem Laborteam aus 206 mit seinen damaligen Mitarbeitern Frank Falinski, Kai Hofmann, Tina Prust, Marcel Grapp, Hauke Schmidt, Sonja Volland, Ray Hovey und Sabine Lentjes möchte ich für die freundliche Atmosphäre danken.

Für die sehr freundliche Unterstützung bei der Herstellung und Auswertung von licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Gluconobacter oxydans* bin ich Herrn PD Dr. Michael Hoppert äußerst dankbar.

Herrn Dr. Oliver Valerius möchte ich sehr herzlich für die Ermöglichung der Proteinidentifikation mittels nano-ESI MS/MS danken.

Nicht vergessen möchte ich das Werkstatt-Team, das mich immer sehr freundlich bei allen Basteleien unterstützt hat.

Sehr dankbar bin ich auch Claudia und Tinki aus dem ehemaligen Labor 214. Hier freue ich mich besonders über die schönen Freundschaften, die sich quasi am ÄKTA entwickelt haben.

Der Mittwochs-Kochrunde möchte ich ganz herzlich für die genussvollen Abende danken. Ein extra-Dank gilt hier Sonja und Christian für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die anregenden Gespräche außerhalb des Labors.

Ein ganz herzlicher Dank für viele schöne Stunden und für die Aufbauleistung in nicht so schönen Momenten gilt auch meinen Freunden Anja, Bianca, Dani, Karina und Burkhard, Kerstin (vielen Dank auch an Dein Pferd !), Kirsten, Oliver, Rene, Rita und Andreas sowie Uwe.

Meinen größten Dank möchte ich aber meinen Eltern Armin und Elsbeth Hoffmeister sowie meiner Schwester Kathrin nebst Familie aussprechen, die mir in bewundernswerter Weise immer zur Seite standen.

Lebenslauf

<i>Geboren</i>	am 22.08.1971 in Göttingen, Niedersachsen, Deutschland
<i>Schulbildung</i>	1978 – 1982: Grundschule Groß-Ellershausen/Hetjershausen, Göttingen 1982 – 1984: Orientierungsstufe an der Jahnschule, Göttingen 1984 – 1988: Voigt-Realschule, Göttingen 1992 – 1995: Abendgymnasium, Göttingen Mai 1995: Abitur
<i>Berufsausbildung</i>	1988 – 1991: zum Biologielaboranten am Institut für Pflanzenbau und Tierhygiene in den Tropen und Subtropen der Georg-August-Universität Göttingen
<i>Pflichtdienst</i>	1991 – 1992: Zivildienst beim Naturschutzbund Deutschland e.V., Kreisgruppe Göttingen
<i>Arbeitsverträge</i>	1993 – 1994: Institut für angewandte Biotechnologie in den Tropen, Göttingen 1994 – Oktober 1995: Institut für Tierhygiene in den Tropen, Georg-August-Universität Göttingen
<i>Studium</i>	Oktober 1995 – November 1996: Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. November 1996: Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen für das Studienfach Biologie
<i>Diplomvorprüfung</i>	Oktober 1998 mit der Fächerkombination Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
<i>Diplomprüfung</i>	Februar 2001 mit der Fächerkombination Mikrobiologie (Hauptfach), Zoologie und molekulare Genetik
<i>Diplomarbeit</i>	März 2001 – November 2001 am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Titel „Analyse von F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase-Komplexen aus <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk und Herrn PD Dr. U. Deppenmeier
<i>Dissertation</i>	Dezember 2001: Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation