

Inhaltsverzeichnis

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

10.8	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	29
11	Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsrate	30
12	Bestimmung der Glucosekonzentration	30
12.1	Enzymatisch-photometrische Glucose - Bestimmung.....	30
12.2	Enzymatisch-amperometrische Glucose - Bestimmung.....	32
13	Chromatographische Methoden	33
13.1	Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC	33
13.2	Bestimmung organischer Säuren mittels HPLC.....	36
IV	Ergebnisse	37
1	Rolle der terminalen Cytochrom <i>bd</i> Oxidase für das Wachstum und die Lysinproduktion von <i>Corynebacterium glutamicum</i> Stämmen	37
1.1	Deletion der Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase-Gene <i>cydAB</i> in <i>C. glutamicum</i>	37
1.2	Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 Δ <i>cydAB</i>	38
1.3	Charakterisierung der Mutante MH20-22B Δ <i>cydAB</i>	40
1.4	Charakterisierung der Mutante DM1730 Δ <i>cydAB</i>	43
1.5	Überexpression der Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase-Gene	45
1.6	Überexpression der <i>cydAB</i> -Gene in MH20-22B	48
1.7	Überexpression der <i>cydABDC</i> -Gene in ATCC 13032.....	49
1.8	Überexpression der <i>cydABDC</i> -Gene in <i>C. glutamicum</i> - Lysinproduktionsstämmen.....	51
2	Einfluss der Deletion der F_1F_0-ATP-Synthase auf das Wachstum und die Lysinproduktion von <i>Corynebacterium glutamicum</i>-Stämmen	55
2.1	Konstruktion von ΔF_0 - und ΔF_1F_0 -Mutanten der Stämme 13032 und DM1730.....	55
2.2	Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 ΔF_0	59
2.3	Charakterisierung der Mutante DM1730 ΔF_0	62
2.4	Charakterisierung der Mutante ATCC 13032 ΔF_1F_0	63
2.5	Proteomanalyse von ATCC13032 ΔF_1F_0	64
3	Einfluss einer heterologen Transhydrogenase auf die Aminosäureproduktion	68
3.1	Überproduktion der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB von <i>E. coli</i> in <i>C. glutamicum</i> DM1730	68
3.1.1	Konstruktion eines Stammes zur heterologen Überexpression der <i>pntAB</i> - Gene	68
3.1.2	Charakterisierung des <i>pntAB</i> -Überexpressionsstammes.....	70

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