



Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum* und Rolle des Flavohämoproteins Hmp

Laura Plätzen

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio-und Geowissenschaften
Biotechnologie (IBG-1)

Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum* und Rolle des Flavohämoproteins Hmp

Laura Platzen

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit/Health

Band/Volume 68

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-931-7

INHALTSVERZEICHNIS

1	Summary	1
2	Zusammenfassung	2
3	Einleitung	3
3.1	Die aerobe Atmungskette von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	3
3.2	Die anaerobe Atmungskette von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
4	Ziele der Arbeit	9
5	Material und Methoden	13
5.1	Bakterienstämme.....	13
5.2	Vektoren.....	14
5.3	Oligonukleotide.....	15
5.4	Lösungen.....	17
5.5	Mikrobiologische Methoden.....	18
5.5.1	Kultivierung von Bakterien.....	18
5.6	Analytische Methoden.....	22
5.6.1	Bestimmung des pH-Wertes.....	22
5.6.2	Bestimmung der Nitritkonzentration.....	22
5.6.3	Bestimmung organischer Säuren und Glucosekonzentration mittels HPLC.....	22
5.6.4	Bestimmung von Aminosäuren mittels uHPLC.....	23
5.7	Molekularbiologische Methoden.....	23
5.7.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
5.7.2	Polymerasekettenreaktion.....	25
5.7.3	DNA-Sequenzanalyse.....	26
5.7.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	26
5.7.5	RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	26
5.7.6	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung.....	27
5.7.7	Klonierungen.....	27
5.7.8	Transformation von Bakterien.....	31
5.7.9	qRT-PCR.....	33
5.7.10	DNA-Microarray-Technologie.....	34
5.8	Biochemische Methoden.....	37
5.8.1	Zellaufschluss.....	37
5.8.2	Präparation von Zellmembranen aus <i>C. glutamicum</i>	38
5.8.3	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	38
5.8.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
5.8.5	Analyse von Cytochromen.....	39
5.8.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	40
5.8.7	Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten.....	41

6	Ergebnisse	42
6.1	Konstruktion und Charakterisierung eines <i>C. glutamicum</i> -Stammes mit verstärkter Expression des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - <i>aa</i> ₃ -Superkomplexes	42
6.1.1	Konstruktion des Stammes <i>C. glutamicum</i> SC ^{plus}	42
6.1.2	Wachstum des Stammes <i>C. glutamicum</i> SC ^{plus}	42
6.1.3	Untersuchungen zum Einfluss der Promotoraustausche auf das Transkriptom	45
6.1.4	Untersuchung der Atmungsrate des Stammes SC ^{plus}	50
6.1.5	Untersuchungen zum Cytochrom-Gehalt des Stammes SC ^{plus}	51
6.1.6	Der Einfluss der erhöhten Menge Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - <i>aa</i> ₃ -Superkomplex auf die Lysinproduktion des Lysin-Produktionsstammes DM1945	55
6.2	Einfluss einer veränderten Expressionsstärke der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Gene - der Stamm P _{ur} F ₁ F ₀	56
6.3	Versuche zur heterologen Expression der Cytochrom- <i>cbb</i> ₃ -Oxidase aus <i>B. japonicum</i> in <i>C. glutamicum</i>	61
6.4	Versuche zur Etablierung der anaeroben Nitrat-Ammonifikation in <i>C. glutamicum</i>	65
6.4.1	Das anaerobe Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	65
6.4.2	Versuche zur Expression der Gene für die dissimilatorische Nitritreduktase Nrf aus <i>W. succinogenes</i> in <i>C. glutamicum</i>	66
6.4.3	Heterologe Expression der assimilatorischen Nitritreduktase Nir aus <i>M. smegmatis</i>	68
6.5	Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum und die globale Genexpression von <i>C. glutamicum</i>	70
6.5.1	Einfluss von Nitrat und Nitrit auf das aerobe Wachstum.....	70
6.5.2	Einfluss von Nitrat und Nitrit auf die globale Genexpression	72
6.6	Untersuchungen zur Rolle des Flavohämoproteins Hmp	75
7	Diskussion	81
7.1	Der Einfluss einer erhöhten Produktion des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - <i>aa</i> ₃ -Superkomplexes auf <i>C. glutamicum</i>	81
7.2	Der native Promotor der Gene der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase scheint geeignet für biotechnologische Anwendungen	84
7.3	Versuch der heterologen Expression der Cytochrom- <i>cbb</i> ₃ -Oxidase aus <i>B. japonicum</i>	86
7.4	Die heterologe Expression der Nitritreduktase Nrf aus <i>Wolinella succinogenes</i> und Nir aus <i>Mycobacterium smegmatis</i>	88
7.5	Der Einfluss von Nitrat und Nitrit auf <i>C. glutamicum</i>	89
7.6	Das Flavohämoprotein Hmp in <i>C. glutamicum</i> ist in die Antwort auf nitrosativen Stress involviert.....	90
8	Literaturverzeichnis	93
9	Anhang	103
9.1	Ergänzende Abbildungen	103
9.2	Vektorkarten	104
9.3	Ergänzende Tabellen	114



Gesundheit/Health
Band/Volume 68
ISBN 978-3-89336-931-7

