

**Untersuchungen zum Einfluss von pH-Variation
und erhöhter CO₂ Konzentration auf
Stoffwechsel und Aminosäureproduktion mit
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martin Follmann

aus München

Köln, Mai 2008

1. Referent: Herr Prof. Dr. Reinhard Krämer
Institut für Biochemie der Universität zu Köln
2. Referent: Frau Prof. Dr. Karin Schnetz
Institut für Genetik der Universität zu Köln

Tag der Disputation: 23.06.2008

Kurzzusammenfassung

Das grampositive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* wird in großem Umfang zur biotechnologischen Produktion von L-Lysin eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Variation des pH-Wertes sowie von erhöhter CO₂ Konzentration – zwei während der industriellen L-Lysinproduktion häufig auftretende Stressfaktoren – analysiert. Es wurde gezeigt, dass *C. glutamicum* bei externen pH-Werten zwischen pH 6,0 und 9,5 einen relativ stabilen cytoplasmatischen pH-Wert und bei pH-Werten zwischen pH 4,5 und 10 ein relativ konstantes elektrochemisches Protonenpotential aufrechterhält. Die höchsten Wachstumsraten wurden im Bereich der effektiven pH-Homöostase zwischen pH 6,0 und 9,5 mit einem Optimum bei pH 8,0 bis 8,5 beobachtet. Erhöhte CO₂ Konzentrationen hatten bei neutralem pH keinen Einfluss, weder auf das Wachstum, noch auf bioenergetische Parameter oder die Lysinbildung. Bei erniedrigtem pH führte eine Erhöhung der CO₂ Konzentration zu einer massiven Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Lysinbildung. Dabei wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der CO₂ Konzentration direkt eine Absenkung des cytoplasmatischen pH-Wertes nach sich zieht und die Mechanismen der pH-Homöostase bei gleichzeitig erniedrigtem pH und erhöhter CO₂ Konzentration überfordert sind. Es wurden zwei putative Mrp Na⁺/H⁺ Antiporter identifiziert, welche bei erhöhten Na⁺ Konzentrationen essentiell sind und deren Aktivität vermutlich zudem für die pH-Homöostase bei gleichzeitig vorliegendem alkalischem pH und erhöhter Na⁺ Konzentration wichtig ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei erniedrigtem externen pH die Anwesenheit von K⁺ zur Aufrechterhaltung eines neutralen cytoplasmatischen pH-Wertes sowie zum Wachstum notwendig ist. Dabei sind sowohl der interne Kaliumgehalt als auch der Vorgang des Kaliumtransportes, welcher über den putativen Kaliumkanal CgIK erfolgt, ausschlaggebend. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Einstellung des internen pH-Wertes und der Einstellung des Membranpotentials beobachtet und als Modell für die K⁺ abhängige pH-Homöostase vorgeschlagen, dass eine durch K⁺ vermittelte Absenkung des Membranpotentials zu einer Stimulierung von Protonen exportierenden Komponenten und damit zur Anhebung des cytoplasmatischen pH-Wertes führt.

Abstract

The Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* is widely used for the biotechnological production of L-Lysine. In this work the physiological consequences of variations in pH and increased CO₂ concentrations – two common stress factors cells are exposed to during industrial fermentation processes – were analyzed. It was shown that *C. glutamicum* is able to maintain relatively constant values for the cytoplasmic pH at external pH values ranging from pH 6.0 to 9.5 as well as relatively constant values for the electrochemical proton potential at external pH values ranging from pH 4.5 to 10. The highest growth rates were observed in the range of effective pH homeostasis with an optimum at pH 8.0 to 8.5. Increased CO₂ concentrations did not influence cell growth, bioenergetic parameters or the lysine formation at neutral pH. At acidic pH increased CO₂ concentrations led to severe inhibition of growth and lysine production. It was shown that CO₂ lowers the internal pH by exceeding the capacity for pH homeostasis upon simultaneous presence of acidic pH and increased CO₂ concentrations. In addition this work revealed the significance of two Mrp-type antiporters especially at combined high pH and high Na⁺ concentrations. At acidic pH values the pH homeostasis and the ability for growth were found to depend on the presence of K⁺. Both the internal K⁺ content and the K⁺ transport mediated via the putative K⁺ channel CgIK are essential for the maintenance of the internal pH at a neutral value. A direct correlation between the membrane potential and the cytoplasmic pH was observed. It was suggested that a depolarization of the membrane potential caused by K⁺ stimulates the activity of proton exporting components, leading to an increase in the internal pH.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
2. Industrielle L-Lysinfermentation	2
3. Bakterielle Anpassungen an pH-Stress	3
4. Einfluss von CO ₂	10
5. Ziele der Arbeit.....	12
II. Material und Methoden	13
1. Bakterienstämme und Plasmide.....	13
1.1 Bakterienstämme	13
1.2 Plasmide	15
1.3 Oligonukleotide	15
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	16
2.1 Nährmedien	16
2.1.1 Vollmedien für <i>E. coli</i>	16
2.1.2 Vollmedien für <i>C. glutamicum</i>	16
2.1.3 Minimalmedien für <i>C. glutamicum</i>	17
2.1.4 Antibiotika	18
2.2 Kultivierungsbedingungen	19
2.2.1 Stammhaltung und Vorkulturen	19
2.2.2 Kultivierung auf Agarplatten.....	19
2.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben.....	19
2.2.4 Kultivierung in Mikrotiterplatten.....	20
2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor	20
2.2.5.1 Biorektorausstattung.....	20
2.2.5.2 Begasung des Bioreaktors.....	21
2.2.5.3 <i>batch</i> -Fermentationen im Bioreaktor	22
3. Molekularbiologische Techniken.....	22
3.1 Präparation chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>	22
3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA.....	23
3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
3.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	24
3.5 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	25

3.6	Plasmidpräparation aus <i>C. glutamicum</i>	25
3.7	Ligation und Spaltung von Plasmiden und PCR-Fragmenten.....	25
4.	Techniken zur Manipulation von Zellen	26
4.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	26
4.2	Konstruktion von Insertionsmutanten.....	27
5.	Biochemische Techniken	28
5.1	Bestimmung des spezifischen bakteriellen Cytoplasmavolumens und Silikonölzentrifugation.....	28
5.2	Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes.....	29
5.2.1	Bestimmung des pH-Gradienten anhand der Verteilung einer schwachen Säure bzw. einer schwachen Base	29
5.2.2	Bestimmung des internen pH-Wertes mittels BCECF	31
5.3	Bestimmung des Membranpotentials.....	32
5.4	Bestimmung der protonenmotorischen Kraft (PMK)	33
5.5	Bestimmung der internen Konzentrationen an ATP, ADP und AMP	33
5.6	Bestimmung der internen Konzentrationen an NAD, NADH, NADP und NADPH.....	36
5.7	HPLC-Analyse zur Bestimmung von L-Lysin	38
6.	Bioinformatische Ansätze	39
6.1	Ähnlichkeitssuche	39
III.	Ergebnisse	40
1.	Einfluss externer Stressfaktoren	40
1.1	Analyse von pH-Variation	40
1.1.1	pH-Homöostase in <i>C. glutamicum</i>	40
1.1.2	PMK-Homöostase in <i>C. glutamicum</i>	42
1.1.3	Wachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert	43
1.1.4	Analyse von pH-Variation unter Fermentationsbedingungen	45
1.2	Analyse von erhöhter CO ₂ Konzentration	49
1.2.1	Einfluss von erhöhter CO ₂ Konzentration bei neutralem pH-Wert	49
1.2.2	Charakterisierung des Stammes DM1946	51
1.2.3	Etablierung der Zuluftsteuerung zur CO ₂ Stress Applikation im Biotechnikum	53
1.2.4	Einfluss von erhöhter CO ₂ Konzentration bei niedrigem pH-Wert	56
1.2.5	Der Einfluss von CO ₂ auf den cytoplasmatischen pH-Wert	58

2. Identifizierung und Charakterisierung wichtiger Komponenten der pH-Homöostase	60
2.1 Untersuchungen zur Beteiligung von Aminosäure-Decarboxylasen, der Urease, der F ₁ F ₀ -ATPase sowie von Zwei-Komponenten-Systemen an der pH-Stress Antwort	60
2.2 Beteiligung von Kationen/Protonen Antiportern	64
2.2.1 Ionenspezifität der pH-Homöostase bei alkalischem pH	64
2.2.2 Kationen/Protonen Antiporter in <i>C. glutamicum</i>	65
2.2.2.1 Beteiligung der Kationen/Protonen Antiporter bei der Na ⁺ Homöostase...	66
2.2.2.2 Beteiligung der Kationen/Protonen Antiporter bei der pH-Homöostase	68
2.3 Die Funktion von K ⁺ bei niedrigem pH	72
2.3.1 <i>C. glutamicum</i> benötigt zur pH-Homöostase und zum Wachstum bei sauren Bedingungen die Anwesenheit von K ⁺	72
2.3.2 Die Funktion von CgIK bei der pH-Homöostase	73
2.3.3 Der Einfluss von K ⁺ auf den internen pH-Wert, das Membranpotential und die protonenmotorische Kraft	78
2.4 Analyse des Transkriptoms und des Proteoms nach pH-Variation	79
IV. Diskussion	85
1. Analyse von pH-Variation und erhöhter CO₂ Konzentration.....	85
1.1 <i>C. glutamicum</i> ist moderat alkali-tolerant und zeigt sehr effektive PMK-Homöostase und weniger effektive pH-Homöostase.....	85
1.2 In <i>C. glutamicum</i> sind die Mechanismen der pH-Homöostase bei gleichzeitig niedrigem pH und erhöhter CO ₂ Konzentration überfordert	88
1.3 Einfluss auf die Lysinbildung	90
2. Identifizierung und Charakterisierung wichtiger Komponenten der pH-Stress Antwort	92
2.1 Die Kationen/Protonen Antiporter CpaA und CpaB sind für die Na ⁺ Homöostase essentiell	97
2.2 Sowohl der interne Kaliumgehalt als auch der durch CgIK vermittelte Kaliumtransport sind in <i>C. glutamicum</i> für die pH-Homöostase essentiell.....	100
V. Zusammenfassung	105
VI. Anhang.....	107
VII. Literaturverzeichnis	112

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
BTM	Biotrockenmasse
CCCP	Carbonylcyanid-M-Chlorophenylhydrazon
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
K_m^R	Resistenz gegen Kanamycin
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
OD_{600}	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
pCO_2	Kohlendioxidpartialdruck
pH	pH-Wert
pH_{ex}	externer pH-Wert
pH_{in}	interner pH-Wert
PMK	protonenmotorische Kraft
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TPP	Tetraphenylphosphoniumbromid
$\Delta\Psi$	Membranpotential
ΔpH	pH-Gradient
vvm	Gasvolumen pro Flüssigkeitsvolumen pro Minute (Einheit der Begasungsrate)

I. Einleitung

1. *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein grampositives, apathogenes Bodenbakterium und gehört zur Gruppe der Actinomyceten. Es wurde 1957 in einem breit angelegten *Screening*-Programm zur Isolierung L-Glutamat ausscheidender Mikroorganismen in Bodenproben aus dem Ueno Zoo in Tokyo entdeckt (KINOSHITA *et al.*, 1957) und stellt heute neben *Escherichia coli* den wirtschaftlich bedeutendsten Aminosäureproduzenten im biotechnischen Großmaßstab dar (PARK *et al.*, 1997). Dies verdankt *C. glutamicum* einerseits seiner Eigenschaft, Aminosäuren in großen Mengen in das umgebende Nährmedium auszuscheiden und andererseits seiner hohen „Benutzerfreundlichkeit“: *C. glutamicum* besitzt die Klassifikation GRAS („*generally regarded as safe*“) und zeichnet sich durch schnelles Wachstum, das Erreichen hoher Zelldichten und seine geringen Ansprüche an die Qualität der dazu benötigten Nährstoffe aus (KALINOWSKI, 2003). Daher lassen sich zur Produktion von hochwertigen L-Aminosäuren Abfallstoffe aus der Zuckerindustrie wie Melasse oder Maisquellwasser einsetzen. So werden mit Hilfe optimierter Produktionsstämme jährlich sehr große Mengen an L-Glutamat und L-Lysin sowie deutlich geringere Mengen an L-Leucin, L-Isoleucin, L-Glutamin und L-Alanin hergestellt (LEUCHTENBERGER, 1996; EGGELING und SAHM, 1999; HERMANN, 2003). Zudem werden Versuche unternommen, *C. glutamicum* zur Produktion weiterer Stoffe wie z.B. Tryptophan (IKEDA und KATSUMATA, 1999), Valin (BLOMBACH *et al.*, 2008), Cadaverin (MIMITSUKA *et al.*, 2007) oder Riboflavin (KOIZUMI *et al.*, 2000) einzusetzen.

Unabhängig vom biotechnologischen Aspekt hat *C. glutamicum* aufgrund des großen Repertoires an gut etablierten molekularbiologischen Methoden eine gewisse Bedeutung als Modellorganismus für eng verwandte aber deutlich schwerer zu handhabende Humanpathogene wie *C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* (MINNIKIN, 1982; STACKEBRANDT *et al.*, 1997).

2. Industrielle L-Lysinfermentation

Während L-Glutamat als Geschmacksverstärker in Nahrungsmitteln wie Kartoffelchips und Würzsaucen eingesetzt wird, findet die für Wirbeltiere essentielle Aminosäure L-Lysin als Futtermittelzusatz in der Tierernährung Anwendung, vor allem in der Schweinemast (SUSENBETH, 1995). Da pflanzliche Mastmittel auf Weizen- oder Maisbasis relativ arm an L-Lysin sind, kann der Proteinnährwert des Futters durch die gezielte Zugabe von L-Lysin stark erhöht werden. Andere wichtige Futtermitteladditive sind D,L-Methionin, L-Threonin und L-Tryptophan. Mit einer Jahresproduktion von ca. 600 000 Tonnen und einem jährlichen Wachstum von 7 bis 8% stellt L-Lysin jedoch die wirtschaftlich wichtigste biotechnologisch produzierte Aminosäure in der Tierernährung dar (KELLE *et al.*, 2005).

Um die Produktionskosten zu minimieren, finden die industriellen L-Lysinfermentationen in sehr großen Bioreaktoren mit bis zu 750 m³ Reaktorvolumen statt (KELLE *et al.*, 2005). Dabei werden die Zellen des Produktionsstamms einer Reihe von externen Stressfaktoren ausgesetzt. Besonders wichtige Faktoren sind Stress durch Änderungen der Temperatur, durch hyperosmotische Bedingungen (bedingt durch hohe Substratkonzentrationen), durch lokale Schwankungen des pH-Wertes und Stress durch steigenden CO₂ Partialdruck (pCO₂). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt über eine durch pH-Sonden kontrollierte Zufuhr von Säure und Base. Aufgrund der begrenzten Mischleistungen von Bioreaktoren im Großmaßstab – die Mischzeit bis zu einer Homogenität von 95% kann leicht 100 Sekunden überschreiten (KELLE *et al.*, 2005) – kommt es jedoch lokal zu großen pH-Schwankungen. Der pCO₂ steigt im Verlauf einer Fermentation, da die aerob wachsenden Zellen CO₂ als Respirationsprodukt freisetzen, welches sich im Medium des Bioreaktors anreichern kann. Gerade bei sehr großen Bioreaktoren gelingt durch die geringe Durchmischung das Austreiben des produzierten Kohlendioxids nicht ausreichend gut (HERMANN, 2003). Zudem ist die Löslichkeit von CO₂ proportional zum CO₂ Partialdruck (pCO₂) und große Bioreaktoren weisen in der Nähe des Reaktorbodens hohe hydrostatische Drücke und dementsprechend hohe pCO₂ auf, die zu einer starken Erhöhung des gelösten Anteils von CO₂ führen (McINTYRE and McNEIL, 1997).

Diese Stresssituationen können sich auf die intrazellulären Bedingungen und die Produktausbeute auswirken. Aus der genauen Kenntnis der physiologischen Veränderungen nach Einwirkung dieser Stressfaktoren sowie der relevanten

Anpassungsmechanismen können jedoch Ansatzpunkte zur gezielten Prozess- und Stammoptimierung abgeleitet werden. Während für *C. glutamicum* bereits Untersuchungen über den Stress durch Temperaturänderungen und sehr detailliert über den Stress durch hyperosmotische Bedingungen vorliegen (MORBACH und KRÄMER, 2008), wurde für *C. glutamicum* der Stress durch pH-Variation und erhöhten pCO₂ bisher kaum untersucht.

3. Bakterielle Anpassungen an pH-Stress

Es gibt über die Anpassungen an pH-Stress für viele Bakterien, einschließlich azidophiler und alkalophiler Bakterien sehr ausführliche Untersuchungen. An dieser Stelle sollen wichtige Erkenntnisse über die Anpassungen neutrophiler Bakterien vorgestellt werden.

Bakterien müssen den internen pH-Wert stets in dem Bereich halten, in dem die funktionale und strukturelle Integrität der cytoplasmatischen Proteine gewährleistet ist (PADAN, 2005). Daher ist die Fähigkeit zur internen pH-Homöostase – also die Fähigkeit, den internen pH-Wert trotz größerer Änderungen des externen pH-Wertes neutral zu halten – der Schlüssel zur Toleranz gegenüber sehr sauren bzw. sehr alkalischen externen Bedingungen. Es konnte beispielsweise für *E. coli* gezeigt werden, dass trotz Änderungen des externen pH-Wertes zwischen pH 5 und pH 9 der interne pH-Wert in dem engen Bereich zwischen pH 7,4 und pH 7,8 gehalten wird (SLONCZEWSKI und FOSTER, 1996).

Für die pH-Homöostase gibt es sowohl passive als auch aktive Mechanismen. Die Hauptkomponenten der passiven Homöostase sind einerseits die Cytoplasmamembran, welche so gut wie undurchlässig für Protonen ist und andererseits die Pufferkapazität des Cytoplasmas, bedingt durch Nukleinsäuren und die Aminosäureseitenketten der Proteine. Für die Pufferkapazität des Cytoplasmas wird ein Wert von ca. 50 – 100 nmol Protonen pro pH-Einheit und mg Zell-Protein bei einem internen pH-Wert von ca. 7 angenommen (BOOTH, 1985).

Die aktiven Mechanismen, zu denen insbesondere die Stabilisierung des internen pH-Wertes durch den kontrollierten Transport von Protonen über die Zellmembran gehört, werden im Folgenden für saure und alkalische Bedingungen separat beschrieben.

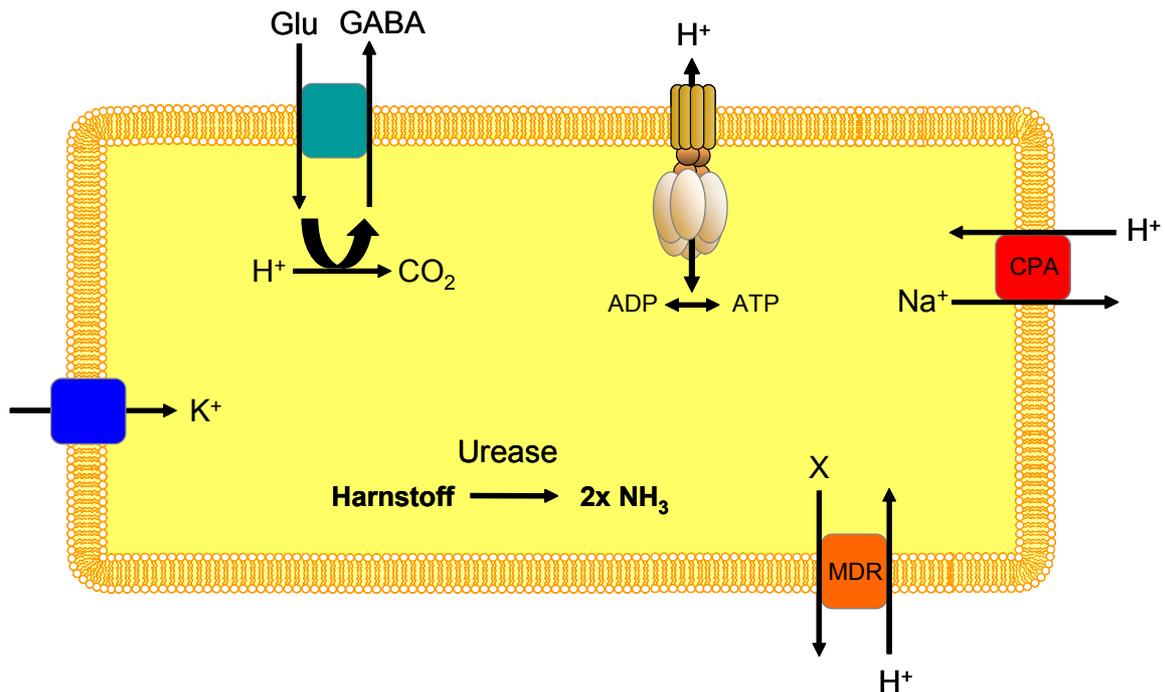


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Wirkprinzips bakterieller Systeme der aktiven pH-Homöostase. Aminosäure-Decarboxylasen (als Beispiel ist das Gad System gezeigt), K^+ Transportprozesse und die Urease sind bei niedrigen pH-Werten von Bedeutung. Für die F_1F_0 -ATPase wird eine Beteiligung in erster Linie bei sauren, jedoch auch bei alkalischen Bedingungen diskutiert. Kationen/Protonen Antiporter (CPA) sowie *multi drug resistance transporter* (MDR) sind bei alkalischen pH-Werten von Bedeutung (Erklärungen im Text).

Anpassungsmechanismen an niedrige pH-Werte

Die wichtigsten Reaktionen von Bakterien auf Säurestress umfassen die verstärkte Chaperon- und DNA-Reparatur-Aktivität, Änderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran sowie aktive Mechanismen zum Export von Protonen aus dem Cytoplasma (COTTER und HILL, 2003).

Die erhöhte Chaperon- und DNA-Reparatur-Aktivität dient bei einem Absinken des cytoplasmatischen pH-Wertes dem Schutz wichtiger zellulärer Komponenten. Wenn *E. coli*-Zellen abrupt in einen sauren Puffer (pH 3) überführt werden, kommt es im Cytoplasma zu einer Destabilisierung von Proteinen, was durch Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität nach einer solchen Stressbehandlung nachgewiesen werden konnte. Zellen, die allerdings durch Wachstum bei pH 5,8 an Säurestress präadaptiert waren, zeigten im Gegensatz zu Zellen, die bei neutralem pH gewachsen waren, eine kaum verringerte β -Galactosidase-Aktivität, obwohl der cytoplasmatische pH-Wert in beiden Fällen auf 4,5 bis 5 sank. Die höhere Aktivität der β -Galactosidase der präadaptierten Zellen wurde von BOOTH *et al.* (2002) mit einer verstärkten Aktivität von Chaperonen erklärt, die im Gegensatz zu den nicht

präadaptierten Zellen die Proteine vor Denaturierung und damit vor Inaktivierung schützen. Diese Vermutung wird durch eine Induktion der für Chaperone kodierenden Gene *dnaK* und *groEL/groES* unter Säurestress-Bedingungen unterstützt (OLSON, 1993). Zur Regulation dieser Anpassung ist bekannt, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren sowie der auch den Übergang in die stationäre Phase regulierende Sigmafaktor RpoS beteiligt sind (BOOTH *et al.*, 2002).

Bakterien verändern die Zusammensetzung der Zellmembran so, dass sich die Permeabilität für Protonen weiter verringert (BOOTH, 1999). Es wurden bei *Streptococcus mutans* Zellen, die bei pH 5 gewachsen waren, höhere Level an einfach ungesättigten Fettsäuren festgestellt, als bei Zellen, die bei pH 7 gewachsen waren. An Säure adaptierte Zellen von *Listeria monocytogenes* zeigten sich gegenüber einigen Ionophoren sowie gegenüber dem Bakteriocin Nisin toleranter als nicht adaptierte Zellen (DATTA und BENJAMIN, 1997). Es wurde vorgeschlagen, dass die zunehmende Bildung der Fettsäuren C_{14:0} und C_{16:0} und die abnehmende Produktion von C_{18:0} Fettsäuren für die gesteigerte Toleranz gegenüber Bakteriocinen sowie gegenüber Säurestress verantwortlich sind.

Für den aktiven Export von Protonen bzw. die aktive Neutralisierung des Cytoplasmas werden besonders die F₁F₀-ATPase, die Urease, Aminosäure-Decarboxylasen sowie K⁺ Transportprozesse hervorgehoben (Abb. 1.1).

Die F₁F₀-ATPase kann entweder unter Verbrauch der protonenmotorischen Kraft (PMK) ATP generieren oder unter Verbrauch von ATP Protonen exportieren. Erste Hinweise über die Bedeutung der F₁F₀-ATPase bei der Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes stammen aus Untersuchungen über *Enterococcus hirae* (ehemals *Streptococcus faecalis*). Dieser Organismus besitzt keine Atmungskette und ist nicht in der Lage, durch oxidative Phosphorylierung ATP zu synthetisieren, zur ATP-Generierung nutzt er die Glykolyse (KOBAYASHI *et al.*, 1985). Dennoch besitzt er eine ATPase, und es wurde geschlossen, dass diese einzig der Regulation des internen pH-Wertes dient (HAROLD *et al.*, 1970). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge der gebildeten ATPase sowie deren Aktivität bei niedrigen pH-Werten erhöht ist und dass Zellen, in denen die verstärkte Bildung der ATPase bei pH-Stress inhibiert ist, den cytoplasmatischen pH-Wert nur eingeschränkt kontrollieren können (KOBAYASHI *et al.*, 1985). Zudem sind Mutanten dieses Organismus, in denen das Gen für die Alpha-Untereinheit des ATPase-Komplexes zerstört ist, nicht in der Lage, bei einem externen pH-Wert von 6 zu

wachsen. Durch Transformation dieser Mutanten mit einem Plasmid, welches eine korrekte Kopie dieses Gens enthält, kann dieser Phänotyp jedoch komplementiert werden (SUZUKI *et al.*, 1993). Die F_1F_0 -ATPase hat aber auch für die Säuretoleranz von anderen grampositiven Bakterien große Bedeutung (COTTER und HILL, 2003). Beispielsweise wurde für *Listeria monocytogenes* gezeigt, dass Zellen, die mit N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) behandelt wurden – einem Inhibitor der F_1F_0 -ATPase – viel empfindlicher gegenüber einer Inkubation bei pH 3 waren als unbehandelte Zellen (DATTA und BENJAMIN, 1997). Für *Mycobacterium smegmatis* wurde gezeigt, dass der pH-Gradient bei einem externen pH-Wert von 5 durch Zugabe von DCCD zerstört wurde (RAO *et al.*, 2001). Allerdings muss in diesem Zusammenhang auch erwähnt werden, dass die DCCD-Behandlung infolge der Inaktivierung der F_1F_0 -ATPase auch den internen ATP-Pool und damit alle ATP-abhängigen Prozesse stark beeinflusst.

Des Weiteren werden von Bakterien häufig die Protonen verbrauchenden Reaktionen von Aminosäure-Decarboxylasen genutzt, um den internen pH-Wert bei Säurestress stabil zu halten. Dabei wirkt die Decarboxylase stets gemeinsam mit einem entsprechenden Antiporter. Die Decarboxylase ersetzt die α -Carboxylgruppe der Aminosäure durch ein Proton aus dem Cytoplasma und der Antiporter exportiert das decarboxylierte Produkt im Austausch gegen eine neue Aminosäure. Dies bewirkt zweierlei: Der interne pH-Wert wird erhöht, weil ein Proton verbraucht wird und der externe pH-Wert wird ebenfalls leicht erhöht, weil das exportierte decarboxylierte Produkt weniger sauer ist als die importierte Aminosäure (COTTER und HILL, 2003). Bekannte Beispiele für dieses System sind Decarboxylasen für Glutamat, Lysin, Arginin und Ornithin sowie die entsprechenden Antiporter (COTTER und HILL, 2003 und SLONCZEWSKI und FOSTER, 1996). In *E. coli* tragen Decarboxylasen für Glutamat, Arginin und Lysin gemeinsam zur pH-Homöostase bei (SLONCZEWSKI und FOSTER, 1996 und GUT *et al.*, 2006). GUT und Mitarbeiter unterstrichen für *E. coli* kürzlich die herausragende Bedeutung der Glutamat-Decarboxylase (GadB). Dabei zeigten sie, dass GadB ein allosterisch reguliertes Enzym ist, das sowohl durch Protonen als auch durch Chlorid-Ionen, welche in hohen Konzentrationen im Magen (den *E. coli* auf dem Weg in den Darm passieren muss) vorhanden sind, aktiviert wird (GUT *et al.*, 2006). Für grampositive Bakterien wurde bisher ausschließlich das GAD System (Glutamat-Decarboxylase und Glutamat/gamma-Aminobuttersäure (GABA) Antiporter) im Zusammenhang mit der

pH-Homöostase erwähnt (COTTER und HILL, 2003). Dabei wurde vorgeschlagen, dass das GAD System neben der pH-Homöostase auch der ATP-Generierung dient. Hierbei wurde betont, dass der Austausch von Glutamat und GABA (Glu^- Import und GABA^0 Export) zum Transmembranpotential und der Decarboxylierungsschritt zum pH-Gradienten beiträgt. Die so generierte PMK kann zur ATP-Synthese genutzt werden, wobei davon ausgegangen wird, dass drei Decarboxylierungs- und Antiportschritte genügend PMK für ein Molekül ATP generieren. Diese Hypothese konnte durch experimentelle Daten unterstützt werden (HIGUCHI *et al.*, 1997).

Daneben trägt zur pH-Homöostase bei grampositiven Bakterien auch die aktive Produktion von basischen Substanzen bei. Am häufigsten beschrieben ist dabei die Bildung von Ammoniak (NH_3) durch die Urease, welche die Hydrolyse von Harnstoff zu zwei Molekülen NH_3 und einem Molekül CO_2 katalysiert. Dabei bindet NH_3 jeweils ein Proton, woraufhin Ammonium (NH_4^+) entsteht und der interne pH-Wert steigt (STINGL *et al.*, 2002 und COTTER und HILL, 2003).

Neben den bisher genannten Mechanismen wird insbesondere die Bedeutung von K^+ -Transportprozessen betont. Für *Streptococcus mutans* wurde gezeigt, dass bei einem externen pH-Wert von 5 der cytoplasmatische pH-Wert in Abwesenheit von K^+ 5,5 und in Anwesenheit von 25 mM K^+ im Medium 6,14 beträgt (DASHPER und REYNOLDS, 1992). Diese Beobachtungen wurden ebenso für andere Bakterien veröffentlicht. Der genaue Mechanismus dieser K^+ abhängigen pH-Homöostase ist jedoch bislang unverstanden.

Anpassungsmechanismen an alkalische pH-Werte

Die Reaktionen von Bakterien auf basische externe pH-Werte beinhalten in Entsprechung zu den oben genannten Gründen ebenfalls eine verstärkte Chaperon- und DNA-Reparatur-Aktivität sowie Änderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran. Als Mechanismen zur Aufrechterhaltung der pH-Homöostase werden zum einen die vermehrte Produktion von metabolischen Säuren durch Aminosäure Deaminasen und durch Zucker-Fermentation genannt, vor allem aber aktive Mechanismen zum Import von Protonen in das Cytoplasma (PADAN *et al.*, 2005).

Als am aktiven Import von Protonen beteiligte Membrankomponenten werden die F_1F_0 -ATPase, Kationen/Protonen Antiporter (CPA) sowie *multi drug resistance* (MDR) Transporter aufgeführt (Abb. 1.1).

Für die F_1F_0 -ATPase wird neben Säurestress auch eine Beteiligung bei alkalischem pH diskutiert. In diesem Zusammenhang wird betont, dass über die F_1F_0 -ATPase bei der ATP-Synthese Protonen in das Cytoplasma importiert werden und eine erhöhte Aktivität einen erhöhten Protonenimport bedeutet. So zeigte eine Analyse des Transkriptoms von *E. coli*, dass die F_1F_0 -ATPase während des Wachstums bei pH 8,7 induziert wird (MAURER *et al.*, 2004). Ebenso wird unter diesen Bedingungen die durch *cyd* kodierte terminale Oxidase verstärkt gebildet, welche keine Protonen exportiert. Im Gegensatz dazu sind die Gene für zwei Komplexe der Atmungskette, welche Protonen nach außen pumpen, reprimiert. Hieraus wurde gefolgert, dass *E. coli* auf diese Weise möglichst viele Protonen im Cytoplasma zurückhält und so den internen pH-Wert stabilisiert (PADAN *et al.*, 2005).

Von besonderer Bedeutung für die pH-Regulation bei alkalischen pH-Werten sind jedoch nach Ansicht einiger Autoren Kationen/Protonen Antiporter, welche Kationen (meist Na^+ Ionen) exportieren und Protonen in das Cytoplasma importieren. So wird in *E. coli* durch äußere alkalische Bedingungen der Na^+/H^+ Antiporter NhaA induziert. Zusätzlich wurde schon vor einiger Zeit gezeigt, dass die Aktivität von NhaA auf biochemischer Ebene durch den pH-Wert reguliert wird (TAGLICHT *et al.*, 1993). Unterhalb von pH 6,5 zeigt NhaA keine Aktivität, was einer Übersäuerung des Cytoplasmas entgegenwirkt. Mit alkalischer werdendem pH-Wert steigt die Aktivität zur Aufrechterhaltung eines neutralen internen pH-Wertes stark an, bei einem *shift* zu pH 8,5 erhöht sich V_{Max} um drei Größenordnungen. Der pK-Wert dieser pH-abhängigen Antwort liegt bei pH 7,6, dem *set point* für den internen pH-Wert. Kürzlich wurde die Kristall-Struktur der inaktiven Form bei niedrigem pH-Wert aufgeklärt (HUNTE *et al.*, 2005). Diese Untersuchung unterstützt die Argumente für die besondere Bedeutung von NhaA bei der pH-Regulation und gibt zudem Hinweise darauf, wie NhaA den pH-Wert perzeptieren könnte und wie durch den pH-Wert induzierte Konformationsänderungen die Aktivität beeinflussen könnten.

Allerdings gibt es auch die Auffassung, dass Na^+/H^+ Antiporter wie NhaA für die Na^+ -Homöostase aber nicht für die pH-Homöostase verantwortlich sind (BOOTH, 1999). Mutanten, die durch Deletion keine NhaA-Aktivität mehr besitzen, weisen zwar eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkalischem pH auf, allerdings nur in Anwesenheit von erhöhten Na^+ Konzentrationen. In Abwesenheit von Na^+ zeigen NhaA Deletionsmutanten auch bei alkalischem pH-Wert keinen Wachstumsphänotyp (PADAN *et al.*, 1989). In dieser Argumentation wird weiter angeführt, dass es in

Mutanten ohne funktionelle Na^+/H^+ Antiporter unter alkalischen Bedingungen zu einem intrazellulären Anstieg der Na^+ -Konzentration kommt und die Sensitivität dieser Mutanten gegenüber alkalischem pH-Wert durch die Toxizität von Na^+ und nicht durch mangelnde pH-Homöostase verursacht wird (BOOTH, 1999).

In einer anderen Arbeit wurde für *E. coli* noch ein weiteres für die Alkalitoleranz bedeutendes Transportprotein vorgestellt: Der *multi drug resistance* Transporter MdfA, welcher im Antiport gegen Protonen toxische Substanzen exportiert. In dieser Arbeit wurde dargelegt, dass Mutanten ohne MdfA eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkalischem pH-Wert aufweisen und *mdfA*-überexprimierende Zellen eine außerordentlich hohe Resistenz gegenüber alkalischem pH-Wert zeigen (Wachstum bis pH 10) (LEWINSON *et al.*, 2004). Allerdings wurden diese Resultate bei Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe bislang nicht bestätigt (persönliche Mitteilung Jeannine Nettekoven).

Eine Variation des externen pH-Wertes betrifft aber nicht nur den cytoplasmatischen pH-Wert und die Stabilität der Zellkomponenten, sondern hat auch entscheidenden Einfluss auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Bereitstellung von ATP. Bakterien nutzen die protonenmotorische Kraft (PMK) zur Regenerierung von ATP. Die PMK setzt sich aus dem chemischen Gradienten der Protonen über die Membran (bei neutralem pH-Wert einwärts gerichtet) und dem elektrischen Membranpotential (innen negativ) zusammen. Daher kann sie als Funktion des externen pH-Werts bzw. des pH-Gradienten beschrieben werden. Mit saurer werdenden externen Bedingungen steigt der pH-Gradient, mit alkalischer werdendem pH sinkt er bzw. kehrt sich um. Bakterien reagieren hierauf durch Anpassung des Membranpotentials, um einen konstanten Wert für die PMK aufrecht zu erhalten (MEYER-ROSBURG, 1996). Der molekulare Mechanismus hierfür ist bislang unverstanden.

Alle aktiven Reaktionen auf pH-Stress setzen voraus, dass die Zelle die pH-Änderung wahrnehmen kann. Allerdings ist bis heute unverstanden, wie Bakterienzellen den externen beziehungsweise internen pH-Wert wahrnehmen und in die zelluläre Antwort umsetzen. Da der pH-Wert den Protonierungszustand der Aminosäureseitenketten von Proteinen verändert, können diese direkt als Sensoren dienen. Somit könnten Membranproteine mit extrazellulärer Domäne (z.B. die

Sensordomäne von Zwei-Komponenten) den pH-Wert der Umgebung messen, wobei durch Änderung des Protonierungszustands eine Signalkaskade ausgelöst werden könnte. Entsprechend könnten cytoplasmatische Proteine Sensoren für den internen pH-Wert sein.

Für *C. glutamicum* wurden noch keine Anpassungsmechanismen an niedrige oder hohe pH-Werte beschrieben, ebenso wenig ist über die Komponenten der aktiven pH-Homöostase bislang bekannt. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde jedoch eine Microarray-Analyse der Anpassung an Stress durch Milchsäure bei pH 5,7 vorgestellt (JAKOB *et al.*, 2007). Dabei wurde eine mögliche Funktion des Transkriptionsfaktors SigB bei niedrigem pH diskutiert, da die Expression von *sigB* bei pH 5,7 im Vergleich zu pH 7,5 erhöht war und eine SigB Mutante bei pH 5,7 signifikant langsames Wachstum zeigte. Weitergehende Untersuchungen hierzu liegen jedoch nicht vor.

4. Einfluss von CO₂

Hohe CO₂ Konzentrationen wirken auf eine Reihe von Mikroorganismen toxisch (DIXON und KELL, 1988). Hierzu gibt es viele vor allem beschreibende Untersuchungen mit pathogenen Bakterien und dieser Effekt wird in der Lebensmittelindustrie genutzt, um eine Verlängerung der Haltbarkeit z.B. von Fleischprodukten zu erzielen. Der wachstumshemmende Effekt schwankt jedoch erheblich bei verschiedenen Mikroorganismen. Zudem ist der Mechanismus hierfür noch nicht endgültig geklärt, es werden folgende Möglichkeiten diskutiert (EKLUND, 1984; JONES und GREENFIELD, 1982; BÄUMCHEN *et al.*, 2007): Das lipidlösliche CO₂ könnte sich zum einen in die Membranen einlagern und so deren Funktionen stören. Dieser so genannte „anästhetische“ Effekt könnte die Zellteilung und Transportprozesse beeinflussen. Zum anderen könnte CO₂ den cytoplasmatischen pH-Wert senken und so die Stabilität von Proteinen beeinflussen. Des Weiteren könnte CO₂ auch durch direkte Anlagerung an Enzyme deren Struktur und Aktivität verändern (z.B. durch Carbamat-Bildung).

Auf der anderen Seite spielt CO₂ bzw. HCO₃⁻ (das Hydrogencarbonat Ion ist das eigentliche Co-Substrat) als Substrat für den Metabolismus eine wichtige Rolle und wird für anaplerotische Reaktionen benötigt. Obwohl während der Respiration CO₂

gebildet wird, sind viele Bakterien zusätzlich auf die Versorgung mit atmosphärischem CO₂ angewiesen (KUSIAN *et al.*, 2002). Dies ist auch bei der Kultivierung von *C. glutamicum* von praktischer Bedeutung. Frisch inokulierte Zellen zeigen bei einer Zellkonzentration von unter 0,1 g/l eine sehr lange *lag*-Phase, da das wenige vom Katabolismus gebildete CO₂ aufgrund des geringen Diffusionswiderstands der Cytoplasmamembran für CO₂ die Zellen und ebenso mit der Abluft das Medium verlassen kann. Diese *lag*-Phase lässt sich jedoch deutlich verkürzen, indem mit höherer Zelldichte angeimpft wird (so dass insgesamt mehr CO₂ gebildet wird) oder indem dem Medium Calciumcarbonat zugesetzt wird (Erfahrungen aus der Laborroutine).

Ein besonders hoher Bedarf an anaplerotischen Reaktionen besteht während der Lysinproduktion, um die für die Lysinsynthese entnommenen Intermediate zu ersetzen. Oxalacetat stellt in diesem Zusammenhang ein Schlüsselintermediat dar, da es als Vorstufe für die Lysinsynthese fungiert. An der Synthese von Oxalacetat über die Anaplerose sind zwei Enzyme beteiligt: die Pyruvat Carboxylase und die Phosphoenolpyruvat Carboxylase. Beiden Enzymen kommt hinsichtlich der Produktivität bei der Lysinsynthese eine wichtige Funktion zu. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Überproduktion der Pyruvat Carboxylase in einem Lysin produzierenden Stamm zu einer Steigerung der Lysinproduktionsrate führt (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2001). Da beide Enzyme für die Synthese von Oxalacetat HCO₃⁻ benötigen, wird davon ausgegangen, dass es in einem Lysinproduktionsstamm zu einem stark erhöhten intrazellulären Bedarf an HCO₃⁻ kommt.

CO₂ stellt zum einen also einen Stressfaktor dar, wird andererseits aber gerade bei der Lysinproduktion für anaplerotische Auffüllreaktionen des Citratzyklus benötigt.

Kürzlich erschien eine Arbeit über den Einfluss von CO₂ auf die spezifische Wachstumsrate von *C. glutamicum* (BÄUMCHEN *et al.*, 2007). Dabei zeigte sich *C. glutamicum* erstaunlich unempfindlich gegenüber erhöhten CO₂ Konzentrationen. In dieser Arbeit wurde das Wachstum auf Minimalmedium einmal mit Lactat und einmal mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht, wobei die Wachstumsraten in kontinuierlicher Kultur mit einem Turbidostaten gemessen wurden. Bei Wachstum auf Lactat bewirkte eine Erhöhung der CO₂ Konzentration in der Zuluft auf bis zu 26% eine Steigerung der spezifischen Wachstumsrate um bis zu 28%. Höhere Konzentrationen führten zwar zu einer Abnahme der Wachstumsrate,

allerdings wurden selbst bei Begasung mit 81% CO₂ noch 86% der Wachstumsrate bei Begasung mit Luft (0,04% CO₂) erreicht. Bei Wachstum auf Glucose hatte eine Erhöhung der CO₂ Konzentration auf bis zu 15% keinen signifikanten Einfluss, während eine Erhöhung auf über 20% einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum hatte (BÄUMCHEN *et al.*, 2007). Es wurden allerdings keine biochemischen oder molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt, um diese Effekte zu erklären.

5. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollten zum einen die Auswirkungen einer Veränderung des pH-Wertes im Medium sowie von erhöhter CO₂ Konzentration analysiert werden. Dazu sollte untersucht werden, inwiefern das Wachstum, die Lysinproduktion sowie wichtige bioenergetische Parameter wie das elektrochemische Protonenpotential, die Energieladung sowie der Redox-Status von diesen Stressfaktoren betroffen sind. Dabei sollte insbesondere die Fähigkeit von *C. glutamicum* zur internen pH-Homöostase sowie zur Homöostase der protonenmotorischen Kraft beschrieben werden. Hierzu mussten die notwendigen Vorrichtungen zur Applikation der Stressfaktoren und die biochemischen Methoden zur Bestimmung der bioenergetischen Parameter etabliert werden. Anschließend sollten Mechanismen und Komponenten identifiziert werden, die bei der pH-Homöostase physiologisch bedeutsam sind. Hinweise auf beteiligte Komponenten sollten aus Analogien zu bereits bekannten Systemen sowie anhand der Ionenabhängigkeit der pH-Homöostase in *C. glutamicum* abgeleitet werden. Gene für vermutlich wichtige Komponenten sollten ausgeschaltet werden. Mit den rekombinanten Stämmen sollten anschließend Experimente durchgeführt werden, um die beteiligten Komponenten und Mechanismen zu charakterisieren. Um außerdem Hinweise auf weitere, bislang nicht beschriebene Komponenten zu erhalten, sollten Analysen des Transkriptoms und des Proteoms (in Zusammenarbeit mit Kollegen der Universitäten Bochum und Bielefeld) nach Variation des pH-Wertes durchgeführt werden.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

1.1 Bakterienstämme

Die Tabelle 2.1 gibt die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämme sowie relevante Geno- und Phänotypen (Km^R: Resistenz gegenüber Kanamycin) wieder.

Tab. 2.1: Verwendete *E. coli* und *C. glutamicum*-Stämme und ihre Eigenschaften

Gattung	Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz/Quelle
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	Wildtyp	ABE <i>et al.</i> , 1967
	DM1868	ATCC 13032 mit LysCT311I, Austausch von Prolin gegen Serin an Position 311 in LysC	EVONIK DEGUSSA GmbH (Essen, BRD)
	DM1946 (ATCC21527)	Patentstamm der Firma KYOWA HAKKO in Japan. Dieser Stamm ist durch <i>random</i> Mutagenese entstanden	EVONIK DEGUSSA GmbH (Essen, BRD)
	ATCC 13032 <i>Cgl0267</i> ::pDrive	ATCC 13032 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl0267</i> , Km ^R	JOLKVER, 2008
	ATCC 13032 <i>Cgl2731</i> ::pDrive	ATCC 13032 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl2731</i> , Km ^R	JOLKVER, 2008
	ATCC 13032 <i>Cgl1436</i> ::pDrive	ATCC 13032 mit pDrive-Insertion in <i>Cgl1436</i> , Km ^R	diese Arbeit
	ATCC 13032_pEKEx	ATCC 13032 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEX, Km ^R	diese Arbeit
	ATCC 13032 <i>ureD</i> ::pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>ureD</i> , Km ^R	NOLDEN <i>et al.</i> , 2000

II. Material und Methoden

	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR1</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR1</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR2</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR2</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR3</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR3</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR5</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR5</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR6</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR6</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR7</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR7</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR8</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR8</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR9</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR9</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>cgfSR10</i>	ATCC 13032 mit Deletion der <i>cgfSR10</i> Gene	KOCAN und SCHAFFER <i>et al.</i> , 2005
	ATCC 13032 Δ <i>mtrAB</i>	ATCC 13032 mit Deletion der Gene <i>mtrA</i> und <i>mtrB</i>	MÖKER <i>et al.</i> , 2004
	ATCC 13032 Δ <i>mtrB</i>	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>mtrB</i>	MÖKER <i>et al.</i> , 2007
	ATCC 13032 Δ <i>Cgl0712</i>	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>Cgl0712</i>	BECKER, 2007
	ATCC 13032 Δ <i>Cgl0777</i>	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>Cgl0777</i>	BECKER, 2007
	ATCC 13032 Δ <i>Cgl0712</i> , Δ <i>Cgl0777</i>	ATCC 13032 mit Deletion der Gene <i>Cgl0712</i> und Δ <i>Cgl0712</i>	BECKER, 2007

	ATCC 13032 Δ Cgl0777_ pEKExCgl0777	ATCC 13032 mit Deletion des Gens Cgl0777, Komplementation mit pEKExCgl0777, Km ^R	BECKER, 2007
	ATCC 13032 Cgl1082::pDrive	ATCC 13032 mit pDrive- Insertion in Cgl1082, Km ^R	BECKER, 2007
	ATCC 13032 Cgl0590::pDrive	ATCC 13032 mit pDrive- Insertion in Cgl0590, Km ^R	BECKER, 2007
<i>E. coli</i>	DH5 α (mcr)	<i>endA1 supE44 thi-1 λ</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 Φ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>mcrA</i> Δ (<i>mmr hsdRMS mcrBC</i>)	GRANT <i>et al.</i> , 1990

1.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Eigenschaften (Ap^R: Resistenz gegen Ampicillin; Km^R: Resistenz gegen Kanamycin)

Plasmid	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pEKEEx	Km ^R , <i>lacI^q</i> , <i>ptac</i> , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector	SCHÄFER <i>et al.</i> , 1994
pDrive_Cgl1436	Km ^R , Ap ^R , <i>p lpp/lac'</i> , f1 ori; 3850 bp, mit internem Fragment von Cgl1436	FOLLMANN, 2004

1.3 Oligonukleotide

In Tabelle 2.3 sind die verwendeten Oligonukleotide (Primer) inklusive deren Basensequenzen aufgeführt. Die Primer wurden von QIAGEN (Hilden) bezogen und in Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l gelöst.

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Basensequenz (5' - 3')
Cgl1436_3'	CAG CTT ATC GAC GTT CTC
Cgl1436_5'	GTG ATT AGG TCG CAG ATG

Kontroll-1436	CAA GCA TCC GGT CAA TGT
pDrive-reverse	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
pDrive-40universal	GTT TTC CCA GTC ACG ACG

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Nährmedien

2.1.1 Vollmedien für *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden standardmäßig in LB (Luria Bertani)-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l; nach SAMBROOK *et al.*, 1989) kultiviert. Diesem Medium konnten 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden.

Für die Herstellung superkompetenter (*E. coli*-) Zellen wurden zudem noch TB-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂; mit KOH auf pH 6,7 eingestellt) und SOB-Medium (2,5 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt) benötigt. Außerdem wurde SOC-Medium (wie SOB mit 20 mM Glucose) für die Transformation der (*E. coli*-) Zellen verwendet.

2.1.2 Vollmedien für *C. glutamicum*

Zur Kultivierung von *C. glutamicum* wurde BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion; DIFCO/BD, Detroit, USA) als Flüssigmedium (37 g/l H₂O) benutzt. Für die Kultivierung auf Agarplatten wurden dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco) zugesetzt.

Die Anzucht zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation durch Elektroporation erfolgte in 100 ml LB-Medium, das die Wachstumsinhibitoren Isonicotinsäurehydrazid (4 g/l), Glycin (25 g/l) und Tween-80 (1 g/l) enthielt (HAYNES und BRITZ, 1989). Die Regeneration der Zellen erfolgte in BHIS-Medium (37 g/l Brain-Heart-Infusion, 0,5 M Sorbitol).

2.1.3 Minimalmedien für *C. glutamicum*

Bei Kultivierungen in Mikrotiterplatten und in Schüttelkolben sowie bei einigen Kultivierungen im Fermenter wurde MMI (Mineralsalzmedium I, modifiziert nach KASE und NAKAYAMA, 1972) verwendet. Zur Herstellung dieses Mediums wurde eine Stammlösung angefertigt und autoklaviert, die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Harnstoff, KH_2PO_4 und K_2HPO_4 enthielt. Sollte kaliumfrei kultiviert werden, wurden K_2HPO_4 und KH_2PO_4 äquimolar durch 2,29 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 1,63 g/l Na_2HPO_4 ersetzt. Sollte das Medium erhöhte Konzentrationen von NaCl, KCl oder Sorbitol enthalten, wurden die entsprechenden Substanzen in den gewünschten Endkonzentrationen zugegeben. Die restlichen Bestandteile wurden getrennt angesetzt und sterilisiert. Auch diesem Medium konnten 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden. Die Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung des MMI Mediums.

Tab. 2.3: Zusammensetzung des Mineralsalzmediums I (modifiziert nach KASE und NAKAYAMA, 1972)

Substanz	Konzentration
<u>Stammlösung</u>	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l
Harnstoff	5 g/l
KH_2PO_4	2 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	2 g/l
	Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0
Glukose	40 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
CaCl_2	0,01 g/l
<u>Spurenelementlösung</u>	
FeSO_4	10 mg/l
MnSO_4	10 mg/l
ZnSO_4	1 mg/l
CuSO_4	0,2 mg/l
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/l
H_3BO_3	0,09 mg/l
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,06 mg/l
$\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,009 mg/l
Biotin	200 µg/l

Bei standardisierten Fermentationen im Typ II Modus wurde Typ II/III Medium (R. TAKORS, EVONIK DEGUSSA GmbH, persönliche Mitteilung) verwendet. Zur

II. Material und Methoden

Herstellung dieses Mediums wurden Citronensäure Monohydrat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Lösung I) sowie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 und Na_2SO_4 (Lösung II) getrennt voneinander angesetzt und anschließend vereinigt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,8 (NaOH) wurde diese Stammlösung im Fermenter autoklaviert. Die restlichen Bestandteile wurden getrennt angesetzt, sterilisiert und dem Grundmedium unmittelbar vor der Kultivierung zugesetzt. Die Tabelle 2.4 zeigt die Zusammensetzung des Typ II/III Mediums.

Tab. 2.4: Zusammensetzung des Typ II/III Mediums

Substanz	Konzentration
<u>Stammlösung</u>	
Citronensäure Monohydrat	0,363 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0,916 g/l
K_2SO_4	0,688 g/l
Na_2SO_4	0,206 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,204 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0089 g/l
	Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 6,8
Glukose	50 g/l
Thiamin HCl	0,375 mg/l
<u>Spurenelemente</u>	
ZnSO_4	1 mg/l
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	1,628 mg/l
Biotin 2 %	0,023 g/l

2.1.4 Antibiotika

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz bei *E. coli* und *C. glutamicum* wurde Kanamycin in destilliertem Wasser gelöst, steril filtriert und den sterilen Medien (für Agarplatten auf ca. 50 °C abgekühlt) in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben. Nach der Elektroporation wurden BHI-Agarplatten mit nur 15 µg/ml Kanamycin verwendet. Nach Bildung sichtbarer Kolonien erfolgte deren Überimpfung und Kultivierung auf BHI-Agarplatten mit 25 µg/ml Kanamycin.

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Stammhaltung und Vorkulturen

Zur Stammhaltung wurden Gefrierkulturen in Roti®-Store Cryoröhrchen (Roth, Karlsruhe) angelegt. Diese wurden bei -80 °C aufbewahrt und zum Animpfen von Agarplatten verwendet. Diese Stammhaltungsplatten wurden zwischen 24 und 48 h bei 30 °C (für *C. glutamicum*) bzw. 37 °C (für *E. coli*) inkubiert, dann bei 4 °C gelagert und in Abständen von ca. 30 Tagen erneuert.

Für Vorkulturen von *C. glutamicum* Stämmen wurden stets 5 ml Vollmedium im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie beimpft und 7-8 h unter Schütteln inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden je 10 ml Minimalmedium auf eine $OD_{600\text{nm}}$ von 0,2 - 0,5 angeimpft und über Nacht geschüttelt. Die Übernachtskulturen dienten wiederum zum Animpfen von frischem Minimalmedium auf eine $OD_{600\text{nm}}$ von 0,5 bis 1. Diese Kulturen wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und konnten nun für verschiedene Experimente verwendet werden. Für Fermentationen im Typ II Modus wurden diese Kulturen bei einer OD_{600} von 15 aliquotiert (je 13 ml) und in Gegenwart von 10% (v/v) sterilem Glycerin bei -80 °C eingefroren. Für eine Fermentation im Typ II Modus wurden dann jeweils 13 ml als Inoculum benutzt.

2.2.2 Kultivierung auf Agarplatten

Für Wachstumstests auf Festmedium wurden je 5 μl Kultur aus exponentieller Phase in verschiedenen Verdünnungen (von $OD_{600\text{nm}}=1$ bis $OD_{600\text{nm}}=10^{-5}$) auf Agarplatten getropft, bei 30 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten photographiert.

2.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung im Schüttelkolben erfolgte bei 30 °C (für *C. glutamicum*) oder 37 °C (für *E. coli*) und einer Schüttelfrequenz von 125 rpm. Es kamen 100-, 250-, 500-, und 2000-ml Schüttelkolben mit seitlichen Schikanen zum Einsatz, die bei Wachstumstests mit jeweils 10, 25, 50 oder 200 ml Kulturflüssigkeit befüllt waren. Die Zelldichte konnte durch die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt werden, wofür das Spektrometer Novaspec II von Pharmacia Biotech Inc. (Uppsala, Schweden) benutzt wurde. Anhand der gemessenen OD_{600}

konnte durch die folgenden Korrelationen auf die Biomassekonzentration (BTM) [g/l] und die Zellkonzentration [μl^{-1}] geschlossen werden.

$$\text{BTM} = 0,36 \times \text{OD}_{600} \text{ [g/l]}$$

Gleichung 1: Korrelation von BTM zu OD_{600}

$$\text{Zellkonzentration} = 6,8 \cdot 10^5 \times \text{OD}_{600} \text{ [\mu l}^{-1}\text{]}$$

Gleichung 2: Korrelation von Zellzahl zu OD_{600}

2.2.4 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Die Kultivierung in Mikrotiterplatten erfolgte bei 30 °C in 96-well Rotilabo[®]-Mikrosetplatten (Roth, Karlsruhe). Als Schüttler wurde der Titramax 101 (Heidolph, Schwabach) verwendet. Bei 3 mm Schütteldurchmesser betrug die Schüttelfrequenz 1200 rpm und das Kulturvolumen 200 μl pro well. Die Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,1 - 0,5 angeimpft. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten wurden die Platten mit einer gasdurchlässigen Breathe-Easy Membran (DiversifiedBiotech, Boston, USA) abgedeckt. Die Zelldichte wurde anhand der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 602 nm bestimmt, wofür das Plattenlesegerät VICTOR 1420 Multilabel Counter (Wallac, jetzt PerkinElmer in Wellesley, Massachusetts, USA) benutzt wurde. Anhand der empirisch ermittelten Korrelation (Gleichung 3) zwischen diesen und den OD_{600} -Werten des Spektrometers Novaspec II wurden diese Werte für eine bessere Vergleichbarkeit mit Kultivierungen in Schüttelkolben in OD_{600} -Werte umgerechnet.

$$\text{OD}_{600} = 3,02 \times \text{OD}_{\text{Wallac}}^3 - 0,86 \times \text{OD}_{\text{Wallac}}^2 + 3,12 \times \text{OD}_{\text{Wallac}} - 0,244$$

Gleichung 3: Korrelation OD_{600} zu $\text{OD}_{\text{Wallac}}$

2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor

2.2.5.1 Bioreaktorausstattung

Zur Kultivierung im gerührten Bioreaktor dienten 2-Liter-Fermenter nebst angeschlossener Biostat[®] B Reglereinheit (Sartorius BBI Systems, Melsungen). Die Temperaturregulation der Bakterienkultur wurde über einen wassergefüllten

Außenmantel des Fermenters realisiert. Verschiedene Anschlussstutzen (DN 19 & DN 25) wurden für die Installation einer pO_2 Sonde (Mettler Toledo, Gießen), einer Gelelektrolyt-pH Elektrode (Mettler Toledo, Gießen) und einer Temperatursonde (Sartorius BBI Systems, Melsungen) benutzt. Die Zuluft wurde dem Bioreaktor durch einen $0,2 \mu m$ Sterilfilter des Typs Midisart[®]2000 (Sartorius BBI Systems, Melsungen) zugeführt. Die Abluft wurde durch einen Kühler geleitet und ebenfalls sterilfiltriert. Zur Analyse der Zellen und des Reaktorinhalts wurden Proben durch Überdruck aus dem Bioreaktor mittels eines in 70 % (w/v) Ethanol tauchenden Schlauchstücks steril entnommen.

2.2.5.2 Begasung des Bioreaktors

Um den Einfluss von erhöhten CO_2 Konzentrationen zu untersuchen, sollte die CO_2 Konzentration in der Zuluft variiert und die O_2 Konzentration konstant gehalten werden. Dies wurde durch den Einsatz einer Gasmischbatterie erreicht, welche aus drei Massendurchflussreglern und einer Steuereinheit (Westphal, Haan) besteht (Schema in Abb. 2.1). Ein Regler arbeitet mit Luft und einer maximalen Durchflussrate von 2,6 l/min, einer mit reinem Kohlendioxid und einer maximalen Flussrate von 1,3 l/min und der dritte mit reinem Sauerstoff und einer maximalem Flussrate von 0,5 l/min.

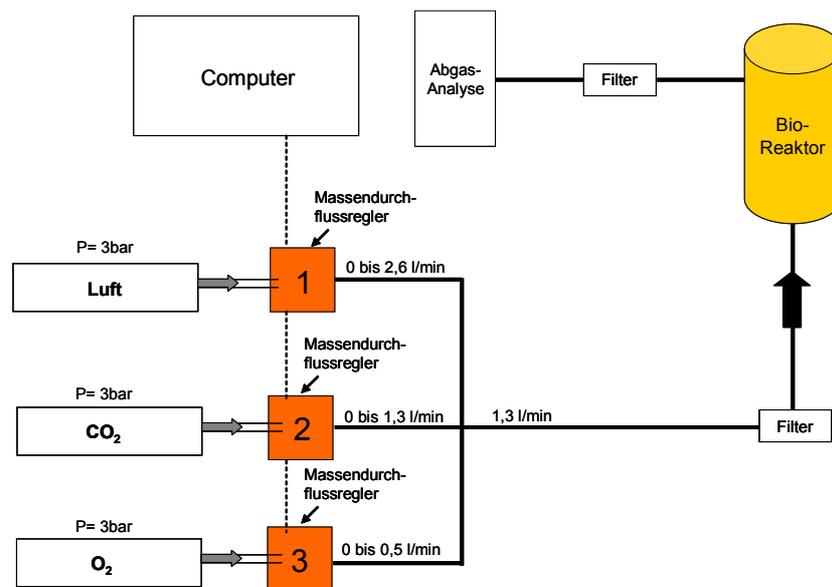


Abb. 2.1: Schematische Abbildung der Gasmischanlage.

Durch unterschiedliche Einstellungen dieser Regler konnten bei einer gleich bleibenden Durchflussrate von 1,3 l/min (entspricht bei 1,3 l Kulturflüssigkeit einer spezifischen Begasungsrate von 1 vvm) beliebige CO₂ Konzentrationen zwischen 0,04 und 79 % (v/v) bei einer konstanten O₂ Versorgung von 20,95 % (v/v) appliziert werden, was erfolgreich mit einer Abgasanalytik getestet wurde. Diese Anlage wurde nach dem Vorbild einer ähnlichen Anlage aus der Arbeitsgruppe Prof. Büchs (RWTH Aachen) konzipiert. Es standen zwei Anlagen zur parallelen Steuerung von zwei Fermentern zur Verfügung.

2.2.5.3 batch-Fermentationen im Bioreaktor

Bei sämtlichen Fermentationen betrug das Arbeitsvolumen 1,3 l. Die Temperatur wurde bei 30 °C konstant gehalten. Um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde eine Rührerdrehzahl von 1200 rpm und eine Begasungsrate von 1 vvm gewählt. Hiermit wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) stets über 30 % Sättigung gehalten werden, so dass die Zellen zu keiner Zeit einer Sauerstofflimitierung ausgesetzt waren. Der pH-Wert der Kultur wurde durch automatische Zugabe von 15 % H₂SO₄ und 5 M NaOH auf einen gewünschten Wert zwischen pH 6 und pH 9 eingestellt. Für die Analyse des O₂- und CO₂-Gehalts in der Abluft wurde das Gerät URAS 10E (Hartmann & Braun, Ratingen) verwendet. Die Datenerfassung und die Datenverarbeitung erfolgten mit Hilfe des Softwarepaketes MFCS (Sartorius BBI Systems, Melsungen).

3. Molekularbiologische Techniken

3.1 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die *C. glutamicum*-Zellen wurden über Nacht in 5 ml BHI-Medium angezogen. Nach der Zentrifugation (4000 x g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen in 3 ml der Lösung B1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose, 20 mg/ml Lysozym und 30 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C wurden 400 µl 10 %ige-SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Nach 2 min wurden 5 mg Proteinase K zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml einer Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol-Mischung (25:24:1) zugesetzt und durch Invertieren des Gefäßes mit dem

Ansatz vermischt. Nach der Zentrifugation (4000 x g, 4 °C, 4 min) wurden 2 ml des Überstandes in ein 15-ml-Röhrchen überführt und mit 3 ml absolutem Ethanol vermischt. Die ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugation (4000 x g, Raumtemperatur, 25 min) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 6 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4000 x g, Raumtemperatur, 5 min). Schließlich wurde die ausgefällte DNA zunächst an der Luft getrocknet und dann in 300 µl H₂O gelöst.

3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Mit Hilfe des Photometers (Novaspec II, Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden) wurde eine Konzentrationsbestimmung der in Wasser gelösten DNA durchgeführt. Dazu wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt die Verunreinigung der Probe mit Proteinen an. Er sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,3 liegen. Die Konzentration der DNA in der Lösung kann nach folgender Formel ermittelt werden:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times V \times F$$

Gleichung 4: Konzentrationsbestimmung der DNA

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA)

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) und Operon (Qiagen, Hilden) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde mit einem Master-Mix (Qiagen, Hilden), der sowohl die DNA-Polymerase als auch die dNTPs enthält, durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl wurde wie folgt zusammengestellt:

- | | |
|--------------------------|-------|
| - Master-Mix | 25 µl |
| - Primer 1 (100 pmol/µl) | 1 µl |
| - Primer 2 (100 pmol/µl) | 1 µl |

- Chromosomale DNA 2 μ l
- H₂O ad 50 μ l

Die *annealing*-Temperatur für die PCR-Amplifikation ergab sich aus der Sequenz der jeweiligen Primer: für ein Adenin oder Thymin wurden 2 °C berechnet, für ein Cytosin oder Guanin wurden 4 °C berechnet.

Die PCR wurde in den Thermocyclern Mastercycler[®] personal bzw. Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburg) oder in Gene Amp[®] PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, USA) durchgeführt.

Einer 5-minütigen Initialdenaturierung bei 94 °C folgten 30 Zyklen der eigentlichen Amplifizierung. Das Standard-Amplifizierungsprogramm umfasste folgende Schritte:

Denaturierung	(94 °C)
<i>Annealing</i>	(<i>annealing</i> -Temperatur der Oligonucleotide, 30 sek)
Elongation	(68 °C, 1 min pro 500 Basen zu amplifizierenden Fragments bei der AccuTaq-Polymerase oder 72 °C, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments beim Master-Mix)

Im Anschluss an die 30 Zyklen kam ein 5-minütiger Schritt bei 68 °C bzw. 72 °C. Schließlich wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA und für Restriktionsanalysen wurde die DNA in TAE-Agarosegelen (0,8 %ig zum Nachweis von Nukleotidsträngen > 500 bp) aufgetrennt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Spannung bei der elektrophoretischen Auftrennung betrug 5 V/cm (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Proben wurden mit einem 6 x Gel-Beladungspuffer (0,25 % Bromphenol Blau, 40 % (w/v) Saccharose in Wasser) 1:5 vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente in der Regel der Lambda DNA/Eco91I (*Bst*II) Marker 15 (MBI Fermentas, Vilnius), von dem ca. 5 μ l aufgetragen wurden. Die DNA wurde bei Bedarf mit Hilfe des QIAquick[™] Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) oder NucleoSpin[®] Extract (Macherey & Nagel, Düren) nach der Anleitung der Hersteller aus dem Agarosegel isoliert und in 30 μ l (zur Konzentrierung) oder in 50 μ l H₂O eluiert.

3.5 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Macherey & Nagel Nucleo-Spin[®] Plasmid Quick Pure Kits durchgeführt. Diese Methode kombiniert die alkalische Lyse der Bakterienzelle mit der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine Kieselgel-Membran, die sich in einer kleinen Säule befindet. Die Präparation erfolgte nach Arbeitsanweisung, allerdings erfolgte die Elution in 30-50 µl H₂O. Die auf diese Weise erhaltene DNA konnte aufgrund ihrer Sauberkeit für weitere Experimente verwendet werden.

3.6 Plasmidpräparation aus *C. glutamicum*

Das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) wurde für die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* benutzt. Die Präparation erfolgte weitgehend nach der Arbeitsanweisung. Allerdings wurden 2 ml Übernacht-Kultur abzentrifugiert und das Pellet wurde in 500 µl Puffer P1, der 15 mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend 90 min bei 37 °C geschüttelt. Sowohl von Puffer P2 als auch von Puffer N3 wurde die doppelte Menge an Lösung in den folgenden Arbeitsschritten eingesetzt. Die Elution erfolgte auch bei dieser Plasmid-Präparation in 30 – 50 µl H₂O.

3.7 Ligation und Spaltung von Plasmiden und PCR-Fragmenten

Für die Ligation von PCR-Produkten mit dem Klonierungsvektor pDrive wurde das QIAGEN PCR CLONING KIT (Qiagen, Hilden) verwendet. Der Vorteil dieses Kits besteht darin, dass der Vektor, pDrive, bereits einen 3' T-Überhang besitzt. Da die *Taq*-Polymerase (s. 2.3.6) 3' A-Überhänge an die PCR-Fragmente anhängt, konnten die PCR-Fragmente direkt in pDrive ligiert werden, ohne vorher restriktionsverdaut zu werden.

Der Ansatz 1 µl pDrive Cloning Vektor (50 ng/µl)
 4 µl PCR-Produkt
 5 µl 2x Ligation Master Mix,

wurde kurz gemischt und anschließend im Wasserbad bei 16 °C für 2 h inkubiert.

Für die analytische Spaltung von Plasmiden wurde das Enzym EcoRI und der entsprechende Puffer (NEB, Schwalbach) verwendet. Die Restriktionsansätze wurden wie folgt pipettiert:

Der Ansatz	2 µl 10 x EcoRI-Puffer
	3 µl Plasmid DNA
	0,5 µl EcoRI Enzym
	14,5 µl H ₂ O

wurde kurz gemischt, bei 37 °C für 90 bis 120 min inkubiert und über ein 0,8 %iges Agarose-Gel aufgetrennt.

4. Techniken zur Manipulation von Zellen

4.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden nach INOUE *et al.* (1990) hergestellt. Dabei wurden die Zellen tagsüber in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser Vorkultur abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) in einen 2 l-Schüttelkolben mit Schikanen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 22 °C und 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag sollte die OD₆₀₀ ca. 0,6 betragen. Dann wurde die Kultur samt 2 l-Kolben für 15 min auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen in kleinere Gefäße (z.B. 50 ml „Falcon Tubes“) überführt und bei 4500 x g und 4 °C 15 min (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) abzentrifugiert wurden, wurde das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH (KOH) = 6,7) resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4500 x g, 4 °C, 10 min) und das Pellet in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden dann 1,4 ml DMSO portionsweise hinzugefügt und die Kultur wurde ein weiteres Mal für 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 – 5 µl Plasmid-DNA vermischt und 30 – 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 – 45 sec bei 42 °C im Wasserbad und einer kurzen Inkubation (ca. 2 min) auf Eis wurde dem Ansatz 450 (bei einem 50 µl-Ansatz) bzw. 900 µl (bei einem 100 µl-Ansatz) SOC-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) hinzugefügt. Die Zellen wurden

direkt danach für 60 min bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf LB-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen.

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach LIEBL *et al.* (1989) hergestellt. Dafür wurden 100 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren (4 g/l Isonicotinsäurehydrazid, 25 g/l Glycin und 1 g/l Tween 80; s. 2.3.1 b) in einem 2 l-Kolben mit einer *C. glutamicum*-Vorkultur, bei der die Zellen über Nacht bei 30 °C in BHI-Medium inkubiert wurden, auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft. Die Inkubation dieser Kultur erfolgte bei Raumtemperatur unter Schütteln bei 200 Upm über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Zellen, nachdem sie 10 min auf Eis standen, bei 4500 x g und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach viermal in eiskaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen und anschließend in 1 ml der 10 %-igen Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese konnten dann bei –80 °C bis zur Transformation aufbewahrt werden. Für die Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 – 8 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand (peQLab, Erlangen) überführt. Die Zellen wurden hierauf in einem Gene-Pulser (Biorad) durch einen Elektropuls von 2,5 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Sofort nach dem Puls wurde mit BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) auf 1 ml aufgefüllt. Der Inhalt der Küvette wurde danach in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und für 6 min bei 46 °C inkubiert (Hitzeschock). Die Zellen wurden dann 90 – 120 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und schließlich auf BHI-Platten mit Kanamycin ausgestrichen.

4.2 Konstruktion von Insertionsmutanten

Eine Insertionsmutante wurde konstruiert, um ein Gen spezifisch zu unterbrechen. Es wurden zunächst Primer verwendet, die innerhalb des Gens – etwa 100 bp vom Anfang und vom Ende entfernt – binden können. Nach einer PCR wurde das entstandene Fragment in den Vektor pDrive ligiert, der ein Kanamycin-Resistenz-Gen enthält. Die elektrokompetenten Zellen wurden nun durch das Plasmid per Elektroporation transformiert. Durch homologe Rekombination wurde das Fragment mit dem Plasmid in die genomische DNA der Zelle eingebaut. So erhielt die Zelle ihre Resistenz. Die Sequenz des Gens war durch das Plasmid unterbrochen und begann

hinter dem Plasmid wieder mit den Basen des ursprünglichen PCR-Fragments. Damit war das Gen nicht mehr lesbar und es konnte kein Protein synthetisiert werden. Zellen des Insertionsstamms mussten immer mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert werden, da sonst das eingefügte Plasmid nicht in dem Konstrukt bleibt und wieder der Wildtyp entsteht.

5. Biochemische Techniken

5.1 Bestimmung des spezifischen bakteriellen Cytoplasmavolumens und Silikonölzentrifugation

Die Bestimmung des Cytoplasmavolumens wurde nach einer modifizierten Methode der Verteilung eines permeablen radioaktiven Isotops ($^3\text{H}_2\text{O}$) und eines nichtpermeablen radioaktiven Isotops (Inulin- ^{14}C -carboxylsäure) in der Zelle und im Vergleich dazu im Medium durchgeführt (ROTTENBERG, 1979). Dazu wurden 0,7 ml Aliquots von Zellsuspensionen in exponentieller Phase bei einer OD_{600} von 3 bis 5 mit 10 μl einer Gebrauchslösung der markierten Sonden 1 min bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Dieser Testansatz (0,71 ml) enthielt dann 0,39 μCi $^3\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μCi Inulin- ^{14}C -carboxylsäure und zwischen 0,75 und 1,25 mg Biotrockenmasse. Um diese Biomassekonzentration im Testansatz unabhängig von der tatsächlich vorhandenen Biomassekonzentration im Fermentationsmedium zu gewährleisten, wurden – sofern notwendig – die Zellen einem Zentrifugationsschritt unterworfen und dann wieder in demselben Medium bzw. in Puffer auf die notwendige Konzentration verdünnt oder angereichert. Nach der Inkubation wurden dreimal je 200 μl des Testansatzes in Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) pipettiert, die mit 30 μl 20 %iger Perchlorsäure und 70 μl Silikonöl der Dichte $d = 1,04 \text{ g/cm}^3$ (Wacker, Burghausen) vorbeladen waren. Diese wurden 30 s in einer Microfuge E (Beckman Instruments, München) zentrifugiert, wodurch die schnelle Trennung der Zellen vom Medium sowie das sofortige Abstoppen des Stoffwechsels erfolgten (KLINGENBERG und PFAFF, 1967). Nach der Zentrifugation wurden je 100 μl des Überstands (zellfreies Medium) abgenommen und in Szintillationsgefäße überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden nun in der mittleren Phase (Silikonölphase) durchtrennt. Die Spitzen – welche das Zellpellet enthielten – wurden jetzt mit der Öffnung nach unten in einem Eppendorfgefäß 1 min bei 13000 x g

zentrifugiert. Nach Entfernung der Spitzen mit Hilfe von Einmalinjektions-Kanülen (Henke-Sass-Wolf GmbH, Tuttlingen) wurden die Pellets in je 200 µl Wasser resuspendiert und in Szintillationsgefäße überführt. Diese sowie die Szintillationsgefäße mit den Überständen wurden nun mit je 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Ecoszint, Roth, Karlsruhe) versetzt und geschüttelt. Die Zerfälle pro Minute (dpm) von $^3\text{H}_2\text{O}$ und Inulin- ^{14}C -carboxylsäure wurden nun mit dem Flüssig-Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Instruments GmbH, München) ausgezählt. Das spezifische Cytoplasmavolumen wurde mit den ermittelten Werten nach folgender Gleichung (ROTTENBERG, 1979) berechnet:

$$V_C = \frac{V_{\text{Probe}} \times \left(\frac{A_{[^3\text{H}]Pellet}}{A_{[^3\text{H}]Überstand}} - \frac{A_{[^{14}\text{C}]Pellet}}{A_{[^{14}\text{C}]Überstand}} \right)}{\text{BTM}}$$

Gleichung 5: Berechnung des spezifischen Cytoplasmavolumens

V_C = spezifisches Cytoplasmavolumen [µl/mg]
 A = gemessene Aktivität [dpm]
BTM = Biotrockenmasse

Kontrollmessungen mit reinen ^3H - und ^{14}C -Proben zeigten, dass das hierzu verwendete Programm (Nr. 11) zwar die Anzahl der Zerfälle des tatsächlich vorhandenen radioaktiven Isotops richtig wiedergibt, jedoch 0,7 % der ^3H -Counts auch fälschlicherweise als ^{14}C -Counts und 2 % der ^{14}C -Counts als negative ^3H -Counts angegeben werden. Daher wurden die angegebenen Werte vor der Auswertung folgendermaßen korrigiert: Der ^3H -Wert wurde um 2 % des ^{14}C -Wertes vergrößert, der ^{14}C -Wert um 0,7 % des ^3H -Wertes vermindert.

5.2 Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes

5.2.1 Bestimmung des pH-Gradienten anhand der Verteilung einer schwachen Säure bzw. einer schwachen Base

Der pH-Gradient wurde durch die Bestimmung der Verteilung einer schwachen Säure bzw. einer schwachen Base über die Zellmembran berechnet (ROTTENBERG, 1979 und KASHKET, 1985). Die Methode basiert auf der Annahme, dass die Membran für die jeweilige neutrale Form frei permeabel, für das Ion jedoch impermeabel ist.

II. Material und Methoden

Für den Fall, dass der interne pH-Wert über dem externen lag, wurde [¹⁴C]-markierte Benzoessäure als Sonde eingesetzt. Unter der Annahme, dass die Säure innerhalb und außerhalb der Zelle die gleiche Dissoziationskonstante ($pK_S \sim 4,2$) aufweist und die ionisierte Form unter den gegebenen Bedingungen ($pH_{ex} > pK_S + 1$) den weitaus größten Anteil stellt, kann von der Gesamtverteilung der Benzoessäure (nur die Gesamtkonzentrationen sind der Messung zugänglich) direkt auf die Verteilung des Benzoats geschlossen und der pH-Gradient berechnet werden:

$$\Delta pH = pH_{in} - pH_{ex} = \log \left(\frac{[Beonzoat]_{in}}{[Benzoat]_{ex}} \right)$$

Gleichung 6: Bestimmung des pH Gradienten bei $pK_S + 1 < pH_{ex} < pH_{in}$

Wenn der externe pH-Wert nicht um mindestens eine Einheit größer als der pK_S -Wert der Sonde war, befand sich ein signifikanter Anteil der Säure in der undissoziierten Form und konnte nicht vernachlässigt werden. Hier ergab sich der interne pH-Wert aus:

$$pH_{in} = \log \left(\frac{[Benzoessäure_{total}]_{in}}{[Benzoessäure_{total}]_{ex}} (10^{pK_S} + 10^{pH_{ex}}) - 10^{pK_S} \right)$$

Gleichung 7: Bestimmung des pH Gradienten bei $pK_S + 1 > pH_{ex} < pH_{in}$

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Benzoatkonzentration wurden 0,7 ml Aliquots von Zellsuspensionen in exponentieller Phase bei einer OD_{600} von 3 bis 5 mit 20 μ l einer Gebrauchslösung der markierten Sonde 1 min bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Dieser Testansatz (0,72 ml) enthielt dann ca. 15 μ M [¹⁴C]-markierter Benzoessäure (spezifische Aktivität der Gebrauchslösung: 3,12 mCi/mmol) und zwischen 0,75 und 1,25 mg Biotrockenmasse. Die Zellen wurden anschließend durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt und die Überstände und die Sedimente wurden für die Bestimmung der internen und externen Benzoatkonzentrationen aufgearbeitet (siehe 5.1). Unabhängig vom pH-Gradienten bindet die Sonde auch unspezifisch an der Zelloberfläche und im Zellinneren. Daher wurde zur Korrektur die Bestimmung der internen Benzoatkonzentration auch mit Zellen durchgeführt, die zuvor mit CCCP (50 μ M) deenergetisiert worden waren. Der so ermittelte Wert für die

unspezifisch gebundene interne Benzoat-Menge wurde von dem entsprechenden Wert der unbehandelten Zellen abgezogen. Mit Hilfe der parallel durchgeführten Volumenbestimmungen konnten schließlich die interne Benzoatkonzentration und der pH-Gradient nach den oben angegebenen Formeln berechnet werden.

Für den Fall, dass der interne pH-Wert unter dem externen lag, wurde [¹⁴C]-markiertes Methylammonium ($pK_S = 10,65$) als Sonde verwendet. Aus denselben Überlegungen wie bei der Benzoesäure kann der pH-Gradient durch die folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\Delta pH = pH_{ex} - pH_{in} = \log \left(\frac{[Methylammonium^+]_{in}}{[Methylammonium^+]_{ex}} \right)$$

Gleichung 8: Bestimmung des pH Gradienten bei $pK_S - 1 > pH_{ex} > pH_{in}$

$$pH_{in} = -\log \left(\frac{[Methylammonium_{total}]_{in}}{[Methylammonium_{total}]_{ex}} (10^{-pK_S} + 10^{-pH_{ex}}) - 10^{-pK_S} \right)$$

Gleichung 9: Bestimmung des pH Gradienten bei $pK_S - 1 < pH_{ex} > pH_{in}$

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Methylammoniumkonzentrationen erfolgte wie oben beschrieben (15 μ M [¹⁴C]-markiertes Methylammonium Endkonzentration bei einer spezifischen Aktivität der Gebrauchslösung von 3,3 mCi/mmol). Allerdings wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) in einer Endkonzentration von 0,022 % verwendet, da CCCP bei alkalischen pH-Werten nicht schnell genug wirkt.

5.2.2 Bestimmung des internen pH-Wertes mittels BCECF

Für die Bestimmung von pH_i mittels BCECF wurden Zellen aus der exponentiellen Phase gewaschen und bei pH 7,5 30 min bei 30 °C und 200 rpm mit BCECF/AM (2',7'-bis-(Carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein/ Acetoxymethylester) (2 μ M Endkonzentration) unter Lichtabschluss inkubiert. Da die phenolischen Hydroxylgruppen des Farbstoffs als Acetoxymethylester derivatisiert sind, diffundiert BCECF/AM in das Cytoplasma. Dort wird der Farbstoff durch Esterasen hydrolysiert

und damit zu einem pH-Indikator. Außerdem ist der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff BCECF nun nicht mehr lipophil, weswegen er im Cytoplasma akkumuliert. Nach gründlichem Waschen konnte der interne pH mit einem Fluorimeter (Aminco-Bowman Series2 Spectrometer, Spectronic Instruments) bestimmt werden. Dabei wurde der Farbstoff BCECF bei zwei Wellenlängen angeregt. Die Emission bei 535nm nach Anregung bei 490nm ist pH-abhängig, jene nach Anregung bei 450nm ist pH-unabhängig. Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde das Verhältnis der Fluoreszenzsignale aus 490/440 nm gebildet, wodurch die Messungen unabhängig werden von ungleichmäßigen BCECF Konzentrationen oder Unterschieden in der optischen Dichte. Für die Bestimmung der notwendigen Kalibriergerade wurden Zellen in Puffern mit verschiedenen pH-Werten zwischen pH 6,5 und 7,5 in Anwesenheit von Entkopplern und Ionophoren (50 μM CCCP, 5 μM Nigericin und 20 μM Valinomycin) resuspendiert, um den internen pH-Wert dem eingestellten externen pH-Wert anzugleichen. Die erhaltenen Fluoreszenzverhältnisse wurden den entsprechenden pH-Werten zugeordnet.

5.3 Bestimmung des Membranpotentials

Zur Bestimmung des elektrischen Potentials über die Cytoplasmamembran wurde das [^{14}C]-markierte lipophile Kation TPP^+ als Sonde eingesetzt (ROTTENBERG, 1979 und KASHKET, 1985). Diese Sonde kann die Cytoplasmamembran durchdringen und wird in Anwesenheit eines elektrischen Potentials über diese Membran (innen negativ) in der Zelle bis zur Gleichgewichtseinstellung akkumuliert. Im Gleichgewicht entspricht das chemische Potential der Sonde dem elektrische Potential über der Membran. Daher kann das elektrische Potential mit Hilfe der experimentell bestimmbaren intra- und extrazellulären Sondenkonzentration nach folgender Formel berechnet werden:

$$\Delta\psi = (-2,303 RT/F) \log ([\text{TPP}^+]_{\text{in}}/[\text{TPP}^+]_{\text{ex}})$$

Gleichung 10: Bestimmung des Membranpotentials pH

F = Faraday'sche Konstante ($9,6 \times 10^4 \text{ A s mol}^{-1}$)

R = allgemeine Gaskonstante ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = Absolute Temperatur in Kelvin

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Sondenkonzentrationen im Gleichgewicht wurden 1,0 ml Aliquots von Zellsuspensionen in exponentieller Phase

bei einer OD_{600} von 3 bis 5 mit 10 μl einer Gebrauchslösung der markierten Sonde 1 min bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Dieser Testansatz (1,01 ml) enthielt dann ca. 5 μM [^{14}C]-markiertes TPP^+ (spezifische Aktivität der Gebrauchslösung: 0,995 mCi/mmol) und zwischen 0,75 und 1,25 mg Biotrockenmasse. Die Trennung der Zellen vom Medium erfolgte durch Silikonölzentrifugation. Da hierbei ein Teil des unspezifisch an die Zellen gebundenen TPP^+ in der Ölphase verbleibt, wurden nicht die Aktivität in der Pelletfraktion, sondern die Aktivitäten im Gesamtansatz (Zellsuspension vor dem Zentrifugationsschritt) und im Überstand gemessen. Die in der Pelletfraktion befindliche TPP^+ -Menge ergab sich aus der Differenz zwischen der TPP^+ -Menge im Gesamtansatz und der im Überstand ($\text{TPP}^+_{\text{Pellet}} = \text{TPP}^+_{\text{gesamt}} - \text{TPP}^+_{\text{Überstand}}$). Zur Korrektur des unspezifisch an anionische Gruppen auf der Zelloberfläche und im Zellinneren gebundenen TPP^+ wurde diese Bestimmung auch mit Zellen durchgeführt, die durch einen Ionophorenmix aus Valinomycin (20 μM Endkonzentration) und Nigericin (5 μM Endkonzentration) zuvor deenergetisiert worden waren.

5.4 Bestimmung der protonenmotorischen Kraft (PMK)

Die Bestimmungen des Membranpotentials und des pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran ermöglichten die Berechnung der PMK nach folgender Gleichung:

$$\Delta p \text{ (PMF)} = \Delta\psi - z \Delta\text{pH}$$

Gleichung 11: Berechnung der protonenmotorischen Kraft (PMF)

Δp = elektrochemisches Protonenpotential (PMF) in mV

$\Delta\psi$ = Membranpotential in mV

z = 2,3 RT/F ~ 61 mV bei 30 °C

5.5 Bestimmung der internen Konzentrationen an ATP, ADP und AMP

Die Bestimmung der internen Adeninnukleotide erfolgte mit dem Luciferin/Luciferase System über die Messung der Lichtemission (modifiziert nach LUNDIN *et al.*, 1976 und SCHIMZ *et al.*, 1981). Die Messungen liefen nach folgendem Reaktionsprinzip ab:

II. Material und Methoden



Dabei ist die Lichtemission proportional zur ATP-Menge. Da der verwendete Luciferin/Luciferase-Rohextrakt jedoch keine zeitlich konstante Lichtemission liefert, wurde statt der Emissionsrate die Lichtemission während der ersten 20 Sekunden (oder länger) nach Start der Reaktion bestimmt. Die Proportionalität des Messwertes zum ATP-Gehalt der Probe wurde mit Hilfe eines internen ATP-Standards überprüft. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die ATP-Menge im Standard deutlich höher ist als die ATP-Menge in der Probe. Außerdem mussten die Messwerte innerhalb des linearen Bereichs einer am selben Tag erstellten Eichreihe liegen. Die ATP-Menge im Ansatz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ATP-Menge} = C_{\text{Probe}} * \text{ATP-Menge}_{\text{IS}} / (C_{\text{IS}} - C_{\text{Probe}}) \quad \text{Gleichung 12: Bestimmung der ATP-Menge}$$

C_{Probe} = Counts bei Probe

C_{IS} = Counts bei Probe mit internem Standard

ATP_{IS} = als interner Standard zugegebene ATP-Menge

Zur Bestimmung von ADP wurde dieses in Anwesenheit von Phosphoenolpyruvat enzymatisch durch die Pyruvatkinase zu ATP umgesetzt und dann ebenfalls entsprechend des oben genannten Prinzips als ATP nachgewiesen. Die ADP-Menge ergab sich aus der Differenz zwischen der ATP-Menge vor und nach der Überführung des gesamten ADPs in ATP. Zur Bestimmung von AMP wurde durch den Einsatz der Myokinase zunächst das gesamte AMP in ADP überführt, welches anschließend zu ATP umgesetzt wurde. Die AMP-Menge ergab sich aus der Differenz aus ATP + ADP und der Gesamtmenge aller Adeninnukleotide. Aufgrund der durchgeführten Volumenbestimmungen konnten die internen Konzentrationen berechnet werden.

Extraktion und Probenvorbereitung

Die Nukleotide wurden durch Mischung der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert (KRÄMER *et al.*, 1990 und LEFEBVRE *et al.*, 1988). Dafür wurden 40 µl Aliquots von Zellsuspensionen unmittelbar nach Entnahme in 360 µl DMSO

II. Material und Methoden

eingespritzt, sofort mit 1,4 ml eiskaltem Wasser vermischt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei – 20 °C aufbewahrt.

Durchführung der ATP-Bestimmung

Für die ATP-Bestimmung wurden die unbehandelten Extrakte eingesetzt. Die Bestimmungsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

- 10 bis 100 µl Extrakt
- 800 bis 890 µl Testpuffer
 - 50 mM Tris, pH 7,4 mit H₂SO₄
 - 3,5 mM MgSO₄ x 7 H₂O
 - 2,5 mM K₂SO₄
 - 0,6 mM EDTA

Start durch Injektion von

- 100 µl Luciferin/Luciferase
 - Suspension von 50 mg Lyophilisat in 8 ml,
 - unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt.
 - (Sigma, Buffered Firefly Lantern Extract)

Durchführung der ADP-Bestimmung

Die Überführung des gesamten ADPs der Extrakte in ATP erfolgte in folgendem Reaktionsansatz:

- 500 µl Extrakt
- 45 µl PEP Puffer
 - 50 mM Phosphoenolpyruvat
 - 500 mM MgSO₄ x 7 H₂O
 - 2 M KCl
 - 100 mM Tris, pH 7,5 mit H₂SO₄
 - 5 µl Pyruvatkinase (2000 U/ml)

Nach 5 bis 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der ATP-Gehalt dieser Proben nach dem oben beschriebene Verfahren bestimmt.

Durchführung der AMP-Bestimmung

Die Überführung des gesamten ADPs und AMPs der Extrakte in ATP gelang in folgendem Reaktionsansatz:

- 500 µl Extrakt
- 45 µl PEP Puffer
 - 50 mM Phosphoenolpyruvat
 - 500 mM MgSO₄ x 7 H₂O
 - 2 M KCl
 - 100 mM Tris, pH 7,5 mit H₂SO₄
 - 5 µl Pyruvatkinase (2000 U/ml)
 - 10 µl Myokinase (1800 U/ml)

Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der ATP-Gehalt dieser Proben nach dem oben beschriebene Verfahren bestimmt.

5.6 Bestimmung der internen Konzentrationen an NAD, NADH, NADP und NADPH

Die internen Nicotinamid-adenin-dinukleotid Konzentrationen wurden mit Hilfe des zyklischen Tests gemessen (BERNOFSKY und SWAN, 1973).

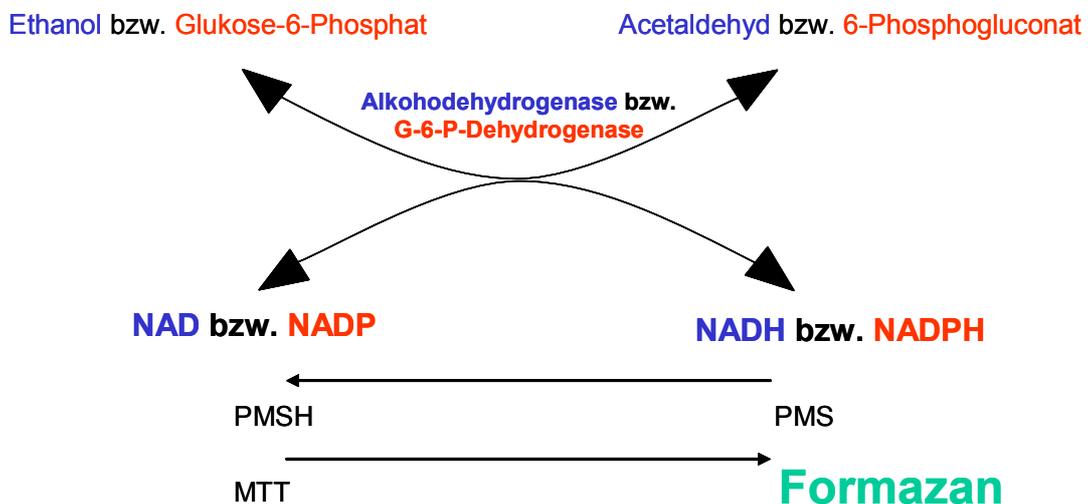


Abb. 2.2: Reaktionsprinzip der Bestimmung von NAD, NADH, NADP und NADPH. PMS(H) steht für 5-Methylphenazinium-methylsulfat, oxidiert/reduziert. MTT steht für Thiazoly-Blau, 3-(4',5'-dimethyl-thiazolyl-2-)-2,4-(diphenyltetrazoliumbromid)

Dabei wurden die Coenzyme zunächst in einer enzymkatalysierten Reaktion reduziert. Die Reoxidation führte im Anschluß über zwei nicht enzymatische Schritte zur Reduktion von Thiazolyl-Blau (MTT) und damit zur Bildung eines Formazans, das bei 570 nm photometrisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.2). Da die

II. Material und Methoden

Konzentration des zu bestimmenden Coenzym unter dem K_M -Wert des Eingangsenzyms lag und die enzymkatalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktionsfolge darstellte, war die der Messung zugängliche Bildungsrate des Formazans der Coenzymkonzentration direkt proportional.

Die Eichung der Messung erfolgte mit Hilfe von NAD- bzw. NADPD-Standardlösungen. Der Einsatz entweder der NAD-spezifischen Alkoholdehydrogenase oder der NADP-spezifischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erlaubte die Differenzierung zwischen NAD und NADP. Zur separaten Quantifizierung von oxidiertes und reduziertes Form kam ein saurer und alkalischer Zellaufschluss zum Einsatz: Je nach pH-Wert ist nur die eine Form stabil, während die andere zerfällt. Bei saurem pH-Wert sind die oxidierten Formen stabil, bei alkalischem pH-Wert die reduzierten.

Für die saure Extraktion wurde 1 ml einer Zellsuspension in exponentieller Phase mit 100 μ l einer vorgelegten 1 M HClO₄-Lösung vermischt (\rightarrow pH 1), 10 min bei 55 °C inkubiert und anschließend mit 90 μ l einer 2M KOH-Lösung neutralisiert (\rightarrow pH 7). Für die alkalische Extraktion wurde 1 ml der Zellsuspension mit 200 μ l einer 1M KOH-Lösung (50 % v/v EtOH) vermischt (\rightarrow pH 12), 10 min bei 55 °C inkubiert und mit 12 μ l einer 1 M HCl-Lösung neutralisiert (\rightarrow pH 7). Die pH-Werte wurden jeweils mit pH-Teststreifen bestimmt. Der Extraktionserfolg wurde mit Hilfe von Standard-Lösungen der Nicotinamid-adenin-dinukleotide (je 1 μ M) überprüft. Dabei wurden die Aktivitäten der NAD-abhängigen Alkoholdehydrogenase bzw. der NADP-abhängigen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [$10^{-3} \Delta E570 \text{ min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$] für die Standardnukleotide, welche den Extraktionsprotokollen unterworfen bzw. nicht unterworfen worden waren, gemessen. Die Aktivität (Kontrollwert), bei der das Nukleotid keiner Extraktion unterworfen worden war, wurde als 100 % definiert. Diese Kontrollmessungen zeigten, dass im Fall der oxidierten Formen nach saurer Extraktion noch nahezu 100 % der Kontrollaktivität gemessen wurden, während nach alkalischer Extraktion keine Aktivität mehr messbar war. Umgekehrt konnten die reduzierten Formen nach alkalischer Extraktion noch vollständig nachgewiesen werden, während sie bei der sauren Extraktion völlig zerstört wurden.

Aufgrund der durchgeführten Volumenbestimmungen konnten die internen Konzentrationen berechnet werden.

Katalytischer Test

- 500 μ l Testpuffer
 - 0,2 M Glycylglycin
 - 0,2 M Nicotinsäureamid, pH 7,4
- 100 μ l PMS (4 mg/ml)
- 25 μ l MTT (5 mg/ml)
 - o **NAD(H)-Bestimmung**
 - 40 μ l EtOH
 - 50 μ l Extrakt
 - 275 μ l H₂O
 - Start durch Zugabe von 10 μ l Alkoholdehydrogenase (4500 U/ml)
 - o **NADP(H)-Bestimmung**
 - 25 μ l 15 mM Glukose-6-Phosphat
 - 10 μ l 5 mM MgSO₄
 - 50 μ l Extrakt
 - 280 μ l H₂O
 - Start durch Zugabe von 10 μ l Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (140 U/ml)
- Messung von $\Delta E/\text{min}$ bei 570 nm über einen Zeitraum von 1 min

5.7 HPLC-Analyse zur Bestimmung von L-Lysin

Um die externen Konzentrationen an L-Lysin im Fermentationsmedium zu bestimmen, wurden 1 ml Aliquots der Fermentationsbrühe 20 min bei 11 000 x g zentrifugiert und die Überstände verwahrt. Die Bestimmung von L-Lysin in den zellfreien Überständen erfolgte mit Hilfe der HPLC („high performance liquid chromatography“). Es wurde eine HPLC-Anlage HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, BRD) mit angeschlossenen Fluoreszenzdetektor der Serie HP 1100 verwendet. Das in den Proben enthaltene L-Lysin wurde der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 fachem Überschuss an o-Phtaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B. V. Oud-Beijerland, NL) unterzogen. Dabei werden primäre Aminosäuren zu fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert (LINDROTH und MOPPER, 1979), deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm

detektiert werden kann. Die Auftrennung erfolgte über eine „reversed phase“ Säule RP-18 (Vorsäule Multospher: 40 x 4 mm von CS Chromatographie, Langerwehe; Trennsäule Nucleodur RP-18: 125 x 4 mm von Macherey-Nagel, Düren) bei 35 °C und einem Fluss von 0,8 ml/min. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Puffer A (50 % Methanol, 50 % Acetonitril) und Puffer B (95 % 40 mM Na⁺-acetatpuffer pH = 6,5 mit 0,06 % Na⁺-azid; 5 % Puffer A) verwendet. Die Mischung wurde gemäß eines Gradientenprogramms während des Laufs von 100 % Puffer A auf 0 % Puffer A geändert. Durch eine automatisch ermittelte Kalibrierungsreihe, der sechs definierte L-Lysinkonzentrationen von 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM und 1000 zugrunde lagen, konnten die *Peak*-Flächen der Proben direkt in die entsprechende Konzentration umgerechnet werden.

6. **Bioinformatische Ansätze**

6.1 **Ähnlichkeitssuche**

Die Datenbanksuche nach übereinstimmenden Sequenzen wurde online bei diversen *Websites* durchgeführt. Zur Suche eines Gens innerhalb des *C. glutamicum*-Genoms wurden die *Websites*:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?

oder

<http://gib.genes.nig.ac.jp>

verwendet. Bei der Ähnlichkeitssuche von *C. glutamicum*-Sequenzen zu Genen anderer Organismen wurde das „Blast-Tool“ von NCBI verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

III. Ergebnisse

1. Einfluss externer Stressfaktoren auf Stoffwechsel und Lysinproduktion

In diesem ersten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen der externen Stressfaktoren untersucht. Zunächst wurde pH-Stress ausführlich analysiert, indem der Einfluss externer pH-Variationen auf den cytoplasmatischen pH-Wert, die protonenmotorische Kraft (PMK) sowie auf das Wachstumsverhalten beschrieben wurde. Anschließend wurden unter Fermentationsbedingungen die Auswirkungen von pH-Variation auf wichtige bioenergetische Parameter wie die PMK, die Energieladung und den Redox-Status in wachsenden Zellen sowie der Einfluss auf die Lysinbildung untersucht.

Im Anschluss wurde zunächst der alleinige Einfluss einer erhöhten CO₂ Konzentration und danach der Einfluss von erhöhter CO₂ Konzentration bei gleichzeitig erniedrigtem pH analysiert.

1.1 Analyse von pH-Variation

1.1.1 pH-Homöostase in *C. glutamicum*

Bakterien müssen den cytoplasmatischen pH-Wert trotz größerer Änderungen des pH-Wertes der Umgebung stets in engen Grenzen halten. Um die Fähigkeit zur pH-Homöostase in *C. glutamicum* untersuchen zu können, wurden zunächst die notwendigen biochemischen Methoden zur Bestimmung des internen pH-Wertes etabliert. Voraussetzung war die Messung des internen Zellvolumens mittels [¹⁴C]-markierter Inulincarboxylsäure und [³H]-markiertem H₂O (ROTTENBERG, 1979). Der pH-Gradient wurde dann bei pH-Werten < 7,5 anhand der Verteilung von [¹⁴C]-markierter Benzoesäure und bei pH-Werten > 7,5 anhand der Verteilung von [¹⁴C]-markiertem Methylammonium bestimmt (ROTTENBERG, 1979). *C. glutamicum* besitzt mit AmtA und AmtB zwei Transportproteine, welche unter Stickstoffmangelbedingungen gebildet werden und aktiv Methylammonium importieren (MEIER-WAGNER, 2001 und WALTER, 2008). Bei ausreichender Stickstoffversorgung werden *amtA* und *amtB* jedoch nicht exprimiert und Kontrollmessungen mit der $\Delta amtA/B$ Mutante sowie Bestimmungen der

Sondenverteilung in Abhängigkeit vom externen pH-Wert, von der Zeit sowie von der Konzentration an Methylammonium zeigten, dass die Akkumulation von Methylammonium unter diesen Bedingungen nur entlang des pH-Gradienten und nicht aufgrund von aktivem Transport erfolgt.

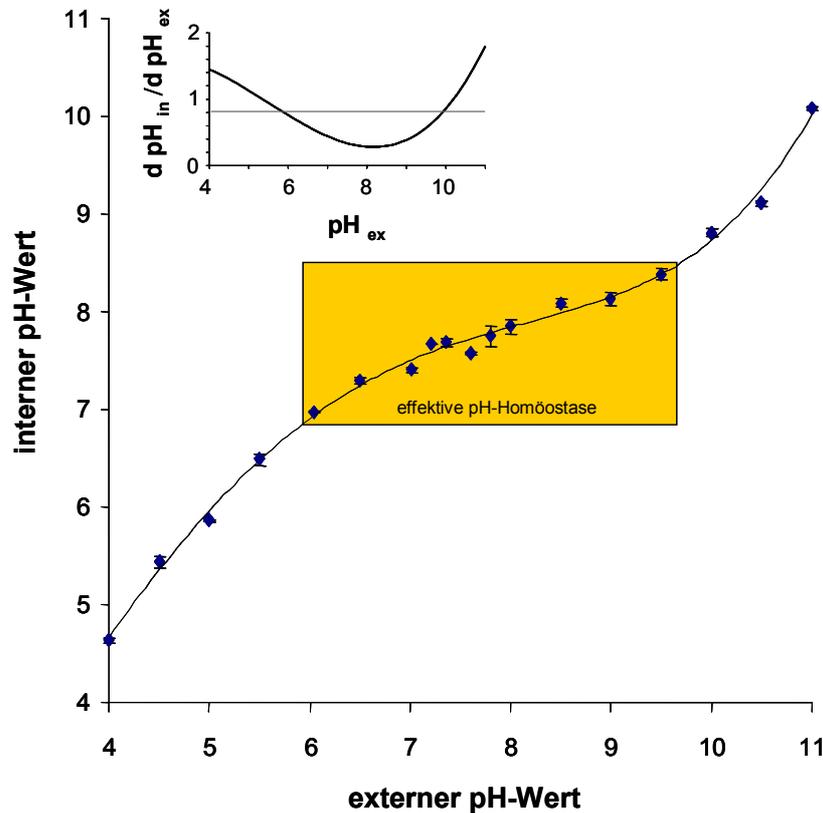


Abb. 3.1: Die pH-Homöostase in *C. glutamicum*. Für die Messungen wurden Wildtyp-Zellen aus exponentieller Phase in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten in Anwesenheit von 25 mM NaCl, 25 mM KCl und 10 mM Glukose resuspendiert. Die internen pH-Werte wurden nach 5minütiger Inkubation bei 30°C unter Rühren bestimmt. Die Ableitung dieser Funktion (oben links) zeigt die Änderung von pH_{in} pro Änderung von pH_{ex} , also $\Delta pH_{in}/\Delta pH_{ex}$ in Abhängigkeit vom externen pH-Wert.

Die cytoplasmatischen pH-Werte in Wildtyp-Zellen wurden bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 4 und 11 bestimmt. Wie aus Abbildung 3.1 hervorgeht, ist *C. glutamicum* in der Lage, bei externen pH-Werten zwischen ungefähr 6 und 9,5 den internen pH-Wert zwischen 7 und 8,3 zu halten. Dieser Bereich wurde als der Bereich der effektiven pH-Homöostase definiert. Bei niedrigeren und höheren pH-Werten gelingt diese Homöostase weniger gut oder bricht zusammen. Die Abbildung 3.1 zeigt die Ableitung dieser Funktion, also $\Delta pH_{in}/\Delta pH_{ex}$ in Abhängigkeit vom externen pH-Wert. Dabei bedeuten Werte unter 1, dass sich der interne pH-Wert

weniger stark ändert als der externe pH-Wert. Für $\Delta p H_{in}/\Delta p H_{ex}$ ergeben sich zwischen pH 6 und 9,5 Werte unter 0,8. Das Minimum dieser Ableitung liegt bei pH 8,2. Bei externen pH-Werten unter 5,5 und über 10,2 bricht die pH-Homöostase zusammen, die internen pH-Werte sinken bzw. steigen ungebremst und für $\Delta p H_{in}/\Delta p H_{ex}$ ergeben sich Werte über 1.

1.1.2 PMK-Homöostase in *C. glutamicum*

Eine Variation des externen pH-Wertes betrifft jedoch nicht nur den internen pH-Wert, sondern auch die protonenmotorische Kraft (PMK), welche sich aus dem chemischen Gradienten von Protonen ($\Delta p H$) und dem elektrischen Potential ($\Delta \Psi$) zusammensetzt. Um die Werte für die PMK in *C. glutamicum* bestimmen zu können, wurde die Messung des Membranpotentials mittels [^{14}C]-markiertem TPP^+ (ROTTENBERG, 1979) etabliert. Nun wurden die Werte für den pH-Gradienten, für das Membranpotential und die daraus resultierenden Werte für die PMK in Wildtyp-Zellen bei pH-Werten zwischen pH 4,5 und 11 bestimmt (Abb. 3.2).

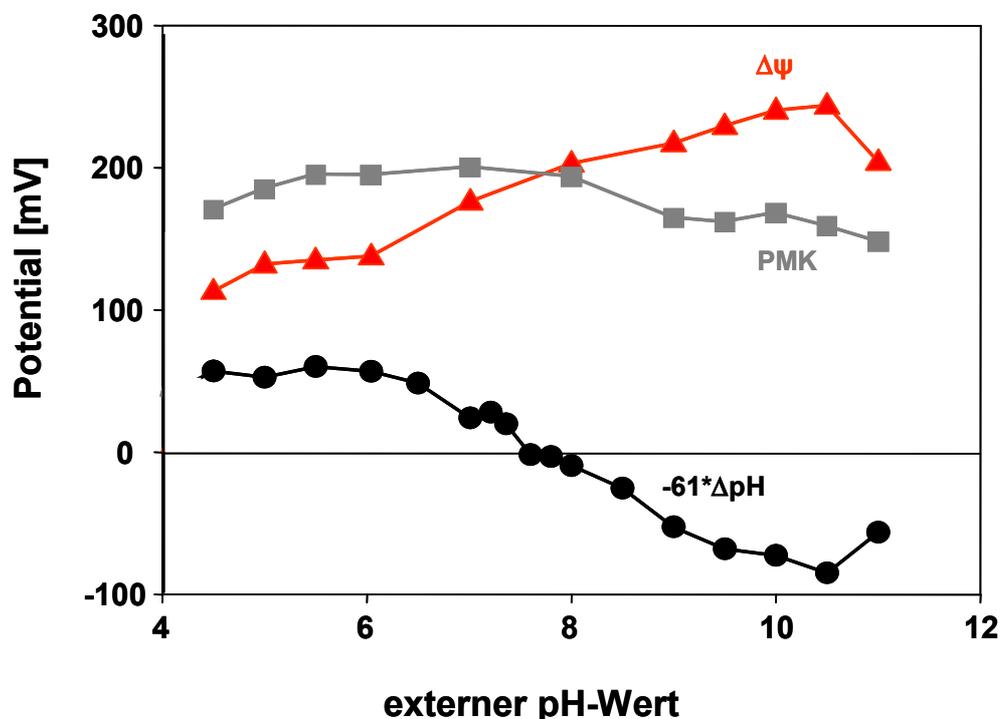


Abb. 3.2: Der pH-Gradient $\Delta p H$, das Membranpotential $\Delta \Psi$ (innen negativ) und die PMK in mV. Der chemische Gradient der Protonen konnte nach $-RT/nF \log_e [H^+]_{out}/ [H^+]_{in} \approx -61 * \Delta p H$ in mV angegeben werden. Für die Messungen wurden Wildtyp-Zellen aus exponentieller Phase in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten in Anwesenheit von 25 mM NaCl, 25 mM KCl und 10 mM Glukose resuspendiert.

Zwischen pH 6 und 10,5 sinkt der chemische Protonengradient von außen nach innen mit alkalischer werdendem pH und kehrt sich ungefähr bei pH 7,5 um. Zur selben Zeit steigt das elektrische Potential von ungefähr 120 mV bei pH 6 auf 220 mV bei pH 10,5. Hieraus ergeben sich relativ konstante Werte für die PMF, die ab pH 8 nur leicht absinken. Da unter pH 6 keine effektive pH-Homöostase mehr stattfindet, nimmt hier der Protonengradient nicht mehr zu. Entsprechend bleibt auch das Membranpotential unverändert. Zwischen pH 10,5 und pH 11 steigt der interne pH-Wert aufgrund der zusammengebrochenen pH-Homöostase um eine ganze Einheit an, so dass der Protonengradient (hier von innen nach außen) wieder sinkt, entsprechend sinkt auch das Membranpotential von 220 auf 200 mV. Zusammengenommen ergeben sich hieraus relativ konstante Werte für die PMK zwischen pH 4,5 und pH 10.

1.1.3 Wachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert

Zur Analyse des Wachstums bei vielen verschiedenen pH-Werten wurde zunächst die Kultivierung von *C. glutamicum* in Mikrotiterplatten (96 wells) etabliert. Um den spezifischen Einfluss des pH-Wertes zu untersuchen, wurden MMI-Grundlösungen mit pH-Werten zwischen pH 4 und 11 hergestellt. Die pH-Werte wurden mit geeigneten Puffersubstanzen anfangs eingestellt, wobei sich die pH-Bereiche überlappten, um den spezifischen Einfluss einer Puffersubstanz erkennen zu können. Das Wachstum wurde dokumentiert und die spezifischen Wachstumsraten wurden innerhalb der ersten 4 bis 6 Stunden der Kultivierungen ermittelt, da in diesem Zeitraum die eingestellten pH-Werte relativ konstant blieben. Die Abbildung 3.3 zeigt die spezifischen Raten des Wildtyps bei den unterschiedlichen pH-Werten und Puffersubstanzen.

Es gibt Puffersubstanzen wie beispielsweise Tris im alkalischen oder Citrat im sehr sauren Bereich, welche nicht geeignet sind, da sie einen vom pH-Wert unabhängigen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben (Tris ist als substituiertes Amin in der deprotonierten Form vermutlich membrangängig und könnte bei alkalischem pH im Cytoplasma akkumulieren; Citrat könnte Eisen komplexieren und außerdem als zelleigene Verbindung eine Citrat-spezifische Genexpression induzieren). Die hier verwendeten Puffersubstanzen scheinen jedoch keinen oder nur geringen Einfluss zu haben, denn das Wachstum in ungepuffertem Medium bei einem anfangs eingestellten pH von 7 und 8 ist nur unwesentlich schneller als in

gepufferten Medien mit denselben pH-Werten. Zudem überschneiden sich die Wachstumsraten bei den einzelnen Puffersubstanzen recht gut.

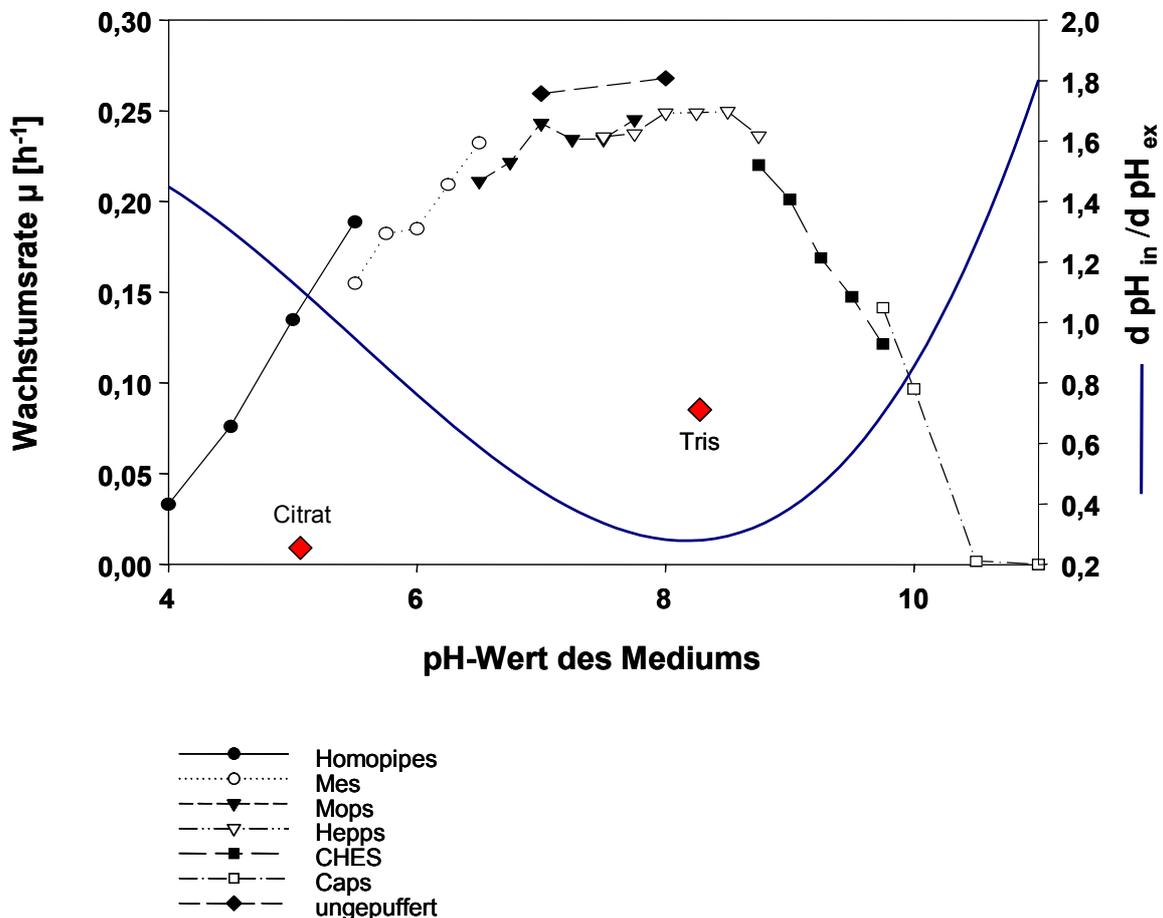


Abb. 3.3: Die spezifischen Wachstumsraten (Mittelwerte von Vierfachbestimmungen) des Wildtyps bei den verschiedenen pH-Werten und Puffersubstanzen (Endkonzentration im Wachstumsmedium jeweils 250 mM). Die Raten wurden mit der Fähigkeit zur pH-Homöostase korreliert, indem $\Delta\text{pH}_{in}/\Delta\text{pH}_{ex}$ mit aufgetragen wurde (aus Abb. 3.1, rechte Y-Achse). Außerdem sind die Wachstumsraten bei pH 8,5 mit Tris und bei pH 5 mit Citrat (rot) gezeigt.

Die Wachstumsraten ergeben eine Optimumskurve mit den höchsten Raten von über $0,17\text{ h}^{-1}$ im Bereich der effektiven pH-Homöostase zwischen pH 6 und 9,5 und einem Optimum bei leicht alkalischen pH-Werten zwischen pH 8 und 8,5. Diese Raten wurden mit der Fähigkeit zur pH-Homöostase korreliert, indem die Änderung des internen pH-Wertes in Abhängigkeit von der Änderung des externen pH-Wertes mit aufgetragen wurde. Je geringer der Quotient $d\text{pH}_{in}/d\text{pH}_{ex}$, desto effektiver die pH-Homöostase. Die Änderung des internen pH-Wertes ist im Bereich des schnellsten Wachstums (nämlich bei pH 8,25) minimal. Bei pH-Werten von über 9,5 fallen die Wachstumsraten mit alkalischer werdendem pH steil ab, ebenso rapide bricht die pH-

Homöostase zusammen. Im Gegensatz dazu fallen die Wachstumsraten ab pH 7 mit sinkendem pH langsamer ab, wie auch die Fähigkeit zur pH-Homöostase langsamer abnimmt.

1.1.4 Analyse von pH-Variation unter Fermentationsbedingungen

Nach der Analyse der bioenergetischen Parameter pH_i , $\Delta\Psi$ und PMK sowie der Beschreibung des Wachstums nach Veränderung von pH_{ex} sollten nun Experimente durchgeführt werden, die den Einfluss von pH-Variation unter Produktionsbedingungen klären. Dazu wurde von der EVONIK DEGUSSA GmbH der Lysinproduktionsstamm DM1868 bereitgestellt. Dieser Stamm wurde aus dem Wildtyp durch gerichtete Mutagenese entwickelt und besitzt als einzige Veränderung die für alle Lysinproduzenten typische Aufhebung der *feedback*-Inhibierung der Aspartatkinase (E.C. 2.7.2.4) durch Lysin, was zu einer erhöhten Lysinausscheidung führt (bis zu 8,54 g L-Lysin pro Liter nach 24h, persönliche Mitteilung B. BATHE). Hinsichtlich anderer Parameter verhält sich dieser Stamm wie der Wildtyp und zeigt im Gegensatz zu anderen Lysinproduzenten keine pleiotropen Effekte.

Dieser Stamm wurde im gerührten Bioreaktor, d.h. unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes durch kontrollierte Zugabe von Säure und Base unter optimaler Sauerstoffversorgung kultiviert. Dabei sollte nach Applikation der pH-Variation der Einfluss auf die Energieladung, den Redox-Status, die PMK sowie die Lysinbildung in wachsenden Zellen untersucht werden. Hierfür war es notwendig, zunächst die notwendigen Methoden zur Bestimmung der cytoplasmatischen Konzentrationen an ATP, ADP und AMP mittels dem Luciferin/Luciferase System (LUNDIN *et al.*, 1976 und SCHIMZ *et al.*, 1981) sowie zur Bestimmung der internen Konzentrationen an NAD(P)(H) mit Hilfe des zyklischen Tests (BERNOFSKY und SWAN, 1973) zu etablieren. Um die Komponenten der PMK (ΔpH und $\Delta\Psi$) zuverlässig in wachsenden Zellen aus dem Fermenter bestimmen zu können, mussten die Messungen unmittelbar nach Probennahme durchgeführt werden. Daher wurde im Biotechnikum ein innerbetrieblicher Überwachungsbereich eingerichtet, in dem der Umgang mit den notwendigen radioaktiv markierten Sonden erlaubt und somit eine schnelle Messung dieser Parameter möglich sind.

Es wurden *batch*-Fermentationen durchgeführt, bei denen nach 13 Stunden Kultivierung bei pH 7 ein *pH-shift* zu pH 6, pH 8, pH 8,5 oder kein *pH-shift*

III. Ergebnisse

vorgenommen wurde. Die Abbildung 3.4 zeigt das Zellwachstum und die Lysinbildung bei diesen Fermentationen.

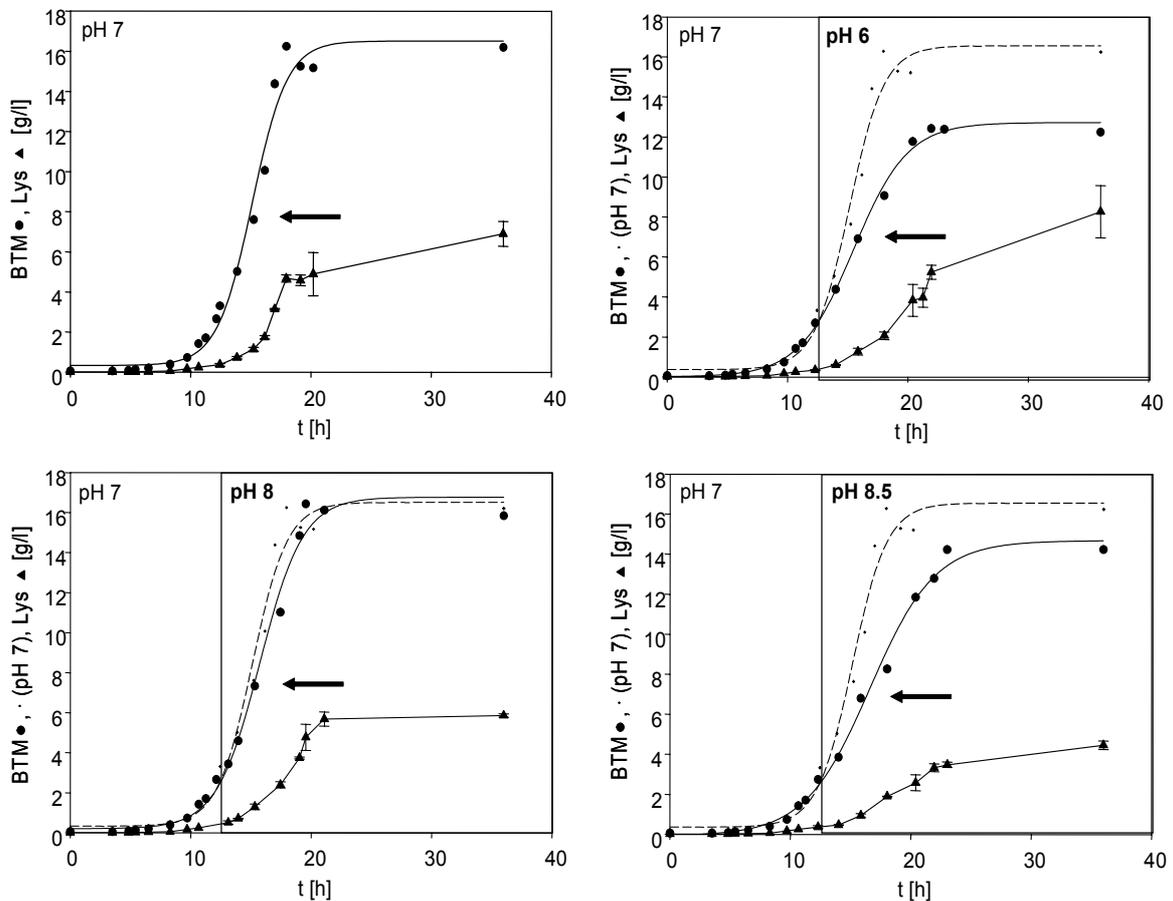


Abb. 3.4: Wachstum und Lysinbildung des Stamms DM1868 bei den unterschiedlichen Fermentationen in dem Produktionsmedium Typ II. Dargestellt sind die Biotrockenmasse (Punkte) und die externe Lysinkonzentration (Dreiecke) in g/l. Außerdem ist bei den Fermentationen mit pH-*shift* zum Vergleich auch die Wachstumskurve ohne pH-*shift* (kleine Punkte, gestrichelte Linie) gezeigt. Jeweils drei Stunden nach dem pH-*shift* (angezeigt durch die Pfeile) wurden Proben genommen, um den physiologischen Zustand der wachsenden Zellen zu charakterisieren.

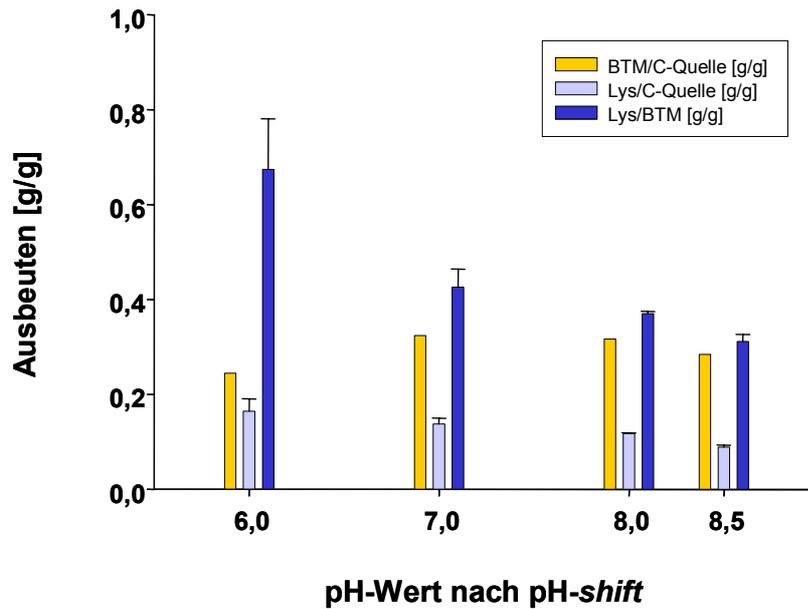


Abb. 3.5: Ausbeuten nach 36 h Kultivierung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach dem *shift*.

Die pH-Variationen beeinflussten sowohl das Wachstum als auch die Lysinbildung. Die Abbildung 3.5 zeigt die Ausbeuten für die Biomasse und für Lysin nach 36 Stunden Kultivierung. Die Biomasse/Substrat-Ausbeute war am höchsten bei pH 7, nach *shifts* zu pH 8 und 8,5 leicht verringert und am niedrigsten nach *shift* zu pH 6. Die Lysin/Substrat-Ausbeute war jedoch am höchsten nach *shift* zu pH 6. Durch die erniedrigte Biomasse-Ausbeute und die erhöhte Lysin-Ausbeute ergab sich daher nach *shift* zu pH 6 eine stark erhöhte Lysin/Biomasse-Ausbeute, was eine erhöhte Aktivität der Zellen bei der Produktbildung bedeutet.

Jeweils drei Stunden nach dem pH-*shift* wurden Proben genommen, um den physiologischen Zustand der wachsenden Zellen zu charakterisieren. Dabei wurden interne pH-Werte zwischen 6,85 bei pH 6 und 8,02 bei pH 8,5 gemessen und wie unter 1.12 beschrieben durch Anpassung des Membranpotentials relativ konstante Werte für die PMK bestimmt (Daten nicht gezeigt). Wie aus Abbildung 3.6 hervorgeht, waren die internen Konzentrationen an ATP, ADP und AMP in keiner Probe signifikant verändert, weswegen sich für die Energieladung jeweils konstante Werte um 0,7 ergaben. Zudem wurden konstante interne Konzentrationen an NAD, NADH, NADP und NADPH bestimmt, wodurch sich in allen Fällen ebenfalls stabile Werte für den katabolen Reduktionsgrad von ca. 0,5 und für anabolen Reduktionsgrad von ca. 0,7 ergaben (Abb. 3.7).

Diese Analyse von pH-Variation wurde auch mit Wildtyp-Zellen durchgeführt, wobei auch in Wildtyp-Zellen nach moderater pH-Variation stabile Werte für die PMK, für die Energieladung und für den Redox-Status bestimmt wurden. Zudem waren die absoluten Werte für diese energetischen Parameter in beiden Stämmen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

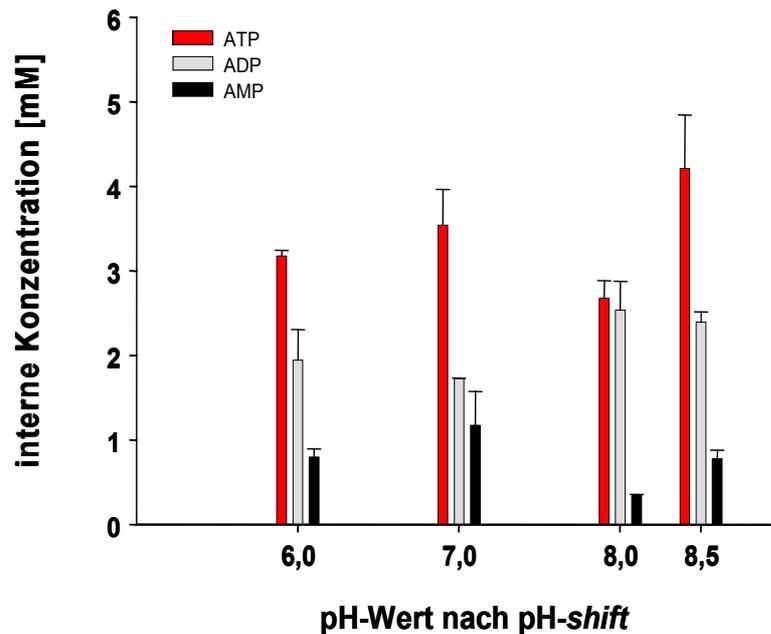


Abb. 3.6: Die internen Konzentrationen an ATP, ADP und AMP in wachsenden Zellen drei Stunden nach dem pH-shift. Die Energieladung E ist ein rein phänomenologischer Wert und errechnet sich aus $E = ([ATP]_{in} + 0,5 [ADP]_{in}) / ([ATP]_{in} + [ADP]_{in} + [AMP]_{in})$. Für die Energieladung ergab sich bei pH 6 ein Wert von 0,70, bei pH 7 ein Wert von 0,68, bei pH 8 ein Wert von 0,71 und bei pH 8,5 ein Wert von 0,73.

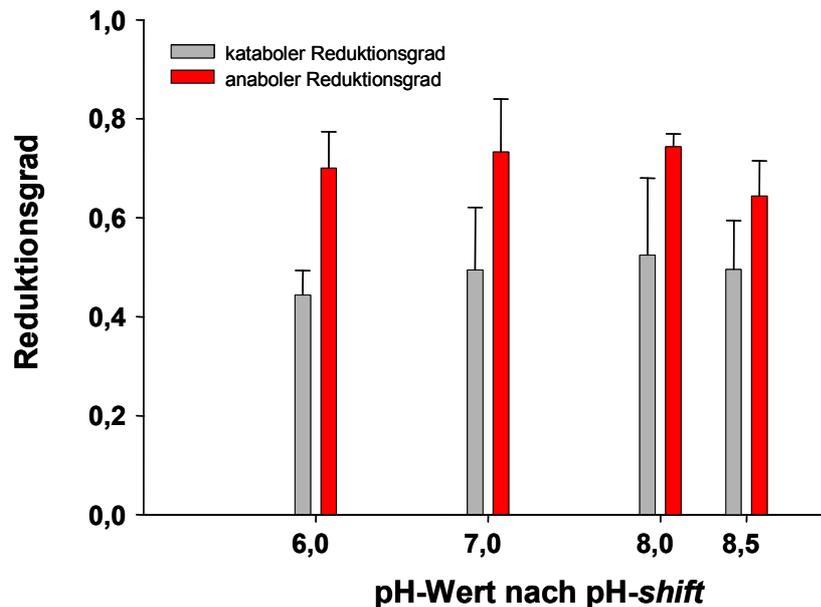


Abb. 3.7: Der katabole und der anabole Reduktionsgrad in wachsenden Zellen drei Stunden nach dem pH-shift. Der katabole Reduktionsgrad errechnet sich aus $R_{\text{Kat}} = \frac{[\text{NADH}]_{\text{in}}}{([\text{NAD}]_{\text{in}} + [\text{NADH}]_{\text{in}})}$. Für R_{Kat} ergab sich bei pH 6 ein Wert von 0,44, bei pH 7 ein Wert von 0,49, bei pH 8 ein Wert von 0,52 und bei pH 8,5 ein Wert von 0,49. Der anabole Reduktionsgrad errechnet sich aus $R_{\text{Ana}} = \frac{[\text{NADPH}]_{\text{in}}}{([\text{NADP}]_{\text{in}} + [\text{NADPH}]_{\text{in}})}$. Für R_{Ana} ergab sich bei pH 6 ein Wert von 0,70, bei pH 7 ein Wert von 0,73, bei pH 8 ein Wert von 0,74 und bei pH 8,5 ein Wert von 0,64.

1.2 Analyse von erhöhter CO₂ Konzentration

1.2.1 Einfluss von erhöhter CO₂ Konzentration bei neutralem pH-Wert

Auf eine Reihe von Mikroorganismen wirkt CO₂ wachstumshemmend. Dieser Effekt wird in der Lebensmittelindustrie genutzt, um eine Verlängerung der Haltbarkeit besonders von Fleischprodukten zu erreichen (DIXON und KELL, 1988). Dementsprechend könnte der während der Produktfermentation auftretende erhöhte pCO₂ für *C. glutamicum* einen Stressfaktor darstellen. Auf der anderen Seite bedeutet ein erhöhter pCO₂ auch eine höhere Verfügbarkeit von HCO₃⁻. Während der Lysinproduktion kommt es wegen der verstärkten Anaplerose zu einem erhöhten Bedarf an HCO₃⁻, daher könnte ein erhöhter pCO₂ hinsichtlich der Lysinproduktion einen positiven Effekt haben (siehe Einleitung).

Um den Einfluss von erhöhtem pCO₂ zu untersuchen, wurden mit dem Stamm DM1868 *batch*-Fermentationen bei verschiedenen CO₂ Konzentrationen in der Zuluft durchgeführt. Dabei wurde für ein *screening* nach sinnvollen CO₂ Konzentrationen

zunächst die fedbatch-pro® Anlage von DASGIP im Forschungszentrum Jülich (IBT-1) genutzt. Mit dieser Anlage ist es möglich, die CO₂ Konzentrationen in der Zuluft zu variieren und die O₂ Konzentrationen gleichzeitig konstant zu halten. Während industrieller Fermentationen zur Lysinproduktion kommt es im Bioreaktor zu CO₂ Konzentrationen von 3 bis 10 %. Um diesen Bereich sicher abzudecken, wurden als CO₂ Konzentrationen in der Zuluft 0,04 % (v/v) (Kontrolle), 5 % und 20 % gewählt und die O₂ Konzentrationen immer bei 21 % (v/v) gehalten. Die Gaszusammensetzung des Luftgemischs wurde zudem unabhängig durch eine Abgasanalytik überprüft. Durch kontrollierte Zugabe von Säure und Base wurde der pH-Wert des Mediums bei pH 7 gehalten. Bei den *batch*-Fermentationen wurden das Wachstum und die Lysinbildung dokumentiert sowie die Energieladung und der Redox-Status der wachsenden Zellen bestimmt, mit folgendem Ergebnis: Die erhöhten CO₂ Konzentrationen in der Zuluft hatten keinen messbaren Einfluss, weder auf die Energieladung und den Redox-Status noch auf das Wachstum oder die Lysinproduktion. Die Komponenten der PMK konnten bei diesen Fermentationen jedoch nicht bestimmt werden, da die Verwendung der hierfür notwendigen radioaktiv markierten Sonden in diesem Teil des FZ Jülich nicht möglich war. Aus den Ergebnissen dieser Fermentationen wurden die nachfolgenden Schlussfolgerungen gezogen:

Möglicherweise können diese Erkenntnisse über den Einfluss von erhöhter CO₂ Konzentration auf den Stamm DM1868 nicht ohne weiteres auf industriell genutzte Produktionsstämme übertragen werden. Daher wurde in Absprache mit der EVONIK DEGUSSA GmbH nun der weiter entwickelte Lysinproduzenten DM1946 verwendet. Dieser Stamm (ATCC21527) ist ein Patentstamm der Firma KYOWA HAKKO in Japan und wurde laut Patent (US 3,708,395) durch *random* Mutagenese-Runden mit anschließendem *screening* erhalten. Als erhöhte CO₂ Konzentration sollten stets 20 % (v/v) in der Zuluft appliziert werden, da der interessierende Bereich von 3 bis 10 % sicher abgedeckt ist und andererseits noch keine sehr toxischen Effekte zu erkennen waren. Außerdem sollte der Einfluss einer erhöhten CO₂ Konzentration bei gleichzeitig niedrigem pH-Wert untersucht werden, weil gerade diese Stresskombination während der industriellen Produktion auftritt. Hierbei sollte insbesondere der Einfluss auf den internen pH-Wert und auf das Membranpotential ermittelt werden.

1.2.2 Charakterisierung des Stammes DM1946

Um zunächst den Stamm DM1946 zu charakterisieren, wurde sein Wachstum in Mikrotiterplatten bei unterschiedlichen pH-Werten mit dem Wachstum des Wildtyps verglichen. Dabei fiel auf, dass der Stamm DM1946 über einen ebenso weiten pH-Bereich wachsen konnte wie der Wildtyp, die Wachstumsraten waren bei sehr sauren oder sehr alkalischen Bedingungen mit denen des Wildtyps vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass die Komponenten der pH-Stress Antwort in diesem Stamm nicht grundsätzlich beeinträchtigt sind. Allerdings wuchs der Stamm DM1946 generell (außer bei den sehr extremen pH-Werten) deutlich langsamer als der Wildtyp, was durch die Lysinüberproduktion in diesem Stamm bedingt sein könnte. Außerdem wurde in dem pH-Bereich zwischen pH 5,5 und 9,5 der zusätzliche Einfluss von erhöhter Osmolarität – eine für *C. glutamicum* gut untersuchte Stressbedingung – getestet, um die allgemeine Stresstoleranz dieses Stammes zu testen.

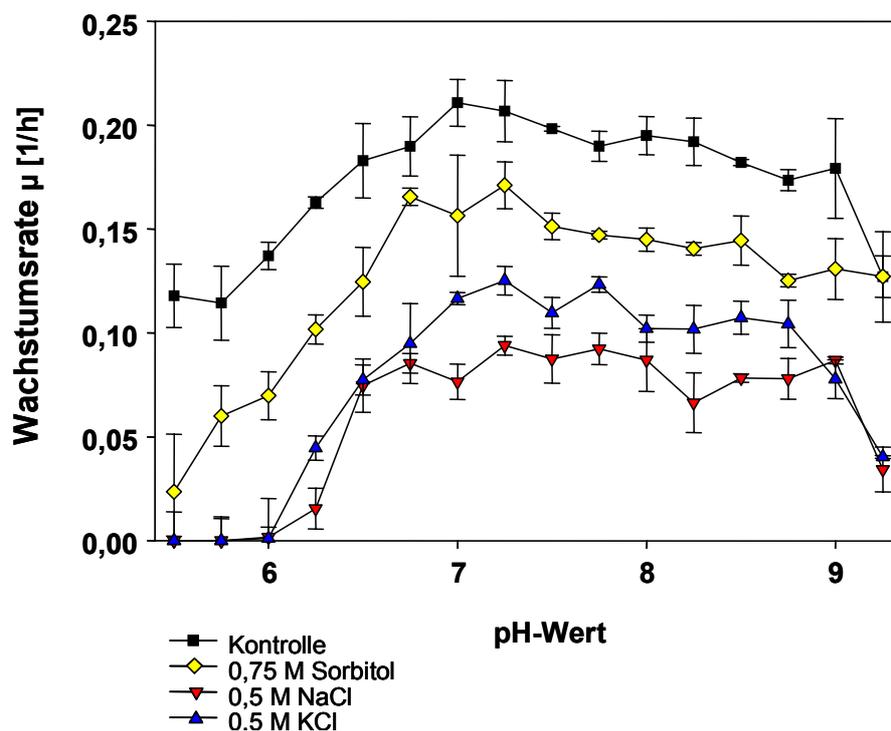


Abb. 3.8: Die Wachstumsraten des Stammes DM1946 bei den unterschiedlichen Bedingungen.

Zur Erhöhung der Osmolarität wurden die Salze NaCl und KCl (je 0,5 M Endkonzentration) und die nicht-ionische Substanz Sorbitol (0,75 M Endkonzentration) verwendet. Dabei wurde die Osmolalität der Medien jeweils um

ca. 1 osmol/kg erhöht. Die Abbildung 3.8 zeigt die Wachstumsraten bei den unterschiedlichen Bedingungen. Der wachstumsinhibierende Effekt durch die erhöhte Osmolarität war bei Sorbitol über den gesamten pH-Bereich deutlich geringer als bei KCl und bei KCl etwas geringer als bei NaCl. Auch in dieser Hinsicht verhält sich der Stamm DM1946 wie der Wildtyp, welcher auch bei erhöhter Osmolarität durch Sorbitol schneller wächst als bei entsprechend erhöhter Osmolarität durch NaCl oder KCl (Daten nicht gezeigt).

Nach 24 Stunden wurden die Ausbeuten an Biomasse und Lysin bestimmt, woraus die biomassespezifischen Lysin-Ausbeuten berechnet wurden (Abb. 3.9). Letztere waren unter Kontrollbedingungen sowie bei erhöhten Salzkonzentrationen über einen weiten pH-Bereich relativ stabil und bei leicht erniedrigtem pH (zwischen pH 6 und pH 7) etwas erhöht. Diese Ausbeuten waren besonders bei gleichzeitig tiefem pH und 0,75 M Sorbitol hoch. Hier wurden bei pH 6 ca. 3 g Lysin pro g BTM erreicht.

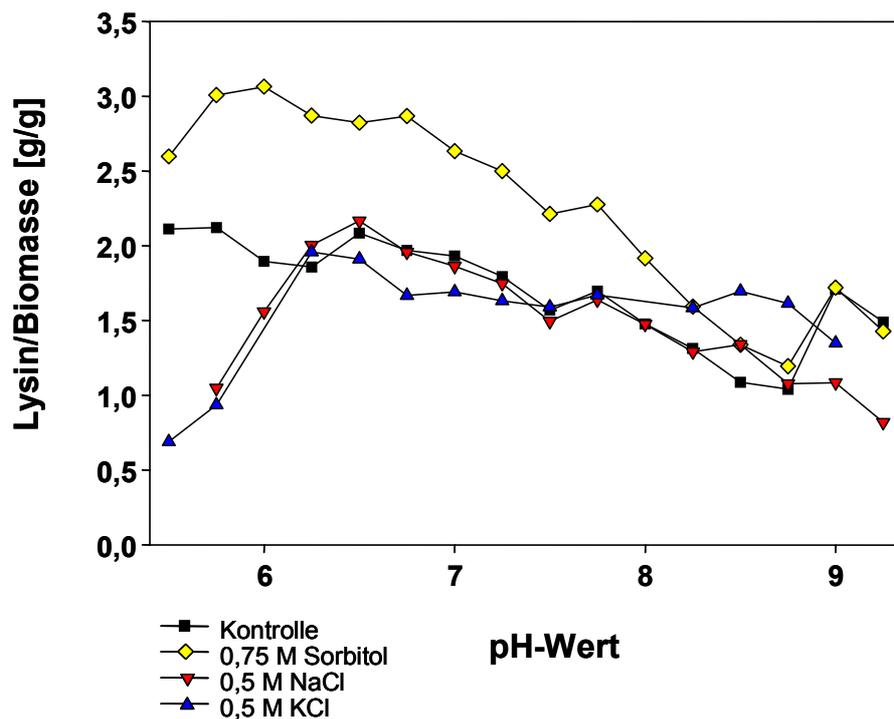


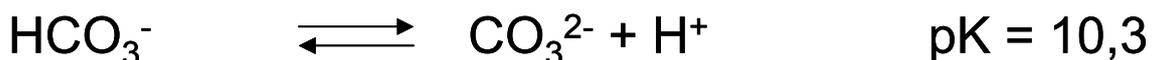
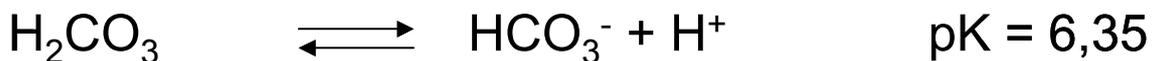
Abb. 3.9: Die biomassespezifischen Lysin-Ausbeuten des Stamms DM1946 nach 24 Stunden Kultivierung in Mikrotiterplatten.

1.2.3 Etablierung der Zuluftsteuerung zur CO₂ Stress Applikation im Biotechnikum

Da der interne pH-Wert und das Membranpotential von wachsenden Zellen im Biotechnikum der Arbeitsgruppe Prof. Krämer bestimmt werden sollten, mussten dort zunächst die notwendigen Vorbereitungen zur Applikation von erhöhter CO₂ Konzentration durchgeführt werden. Um unterschiedliche CO₂ Konzentration bei konstanter O₂ Versorgung einstellen zu können, wurde eine Gasmischanlage installiert. Dabei kontrollieren Massendurchflussregler die Zufuhr von Luft, CO₂ und O₂. Durch unterschiedliche Einstellungen dieser Regler können bei gleich bleibender Durchflussrate in der Zuluft unterschiedliche CO₂ Konzentrationen bei konstanter O₂ Konzentration appliziert werden (siehe 2.2.5.2). Dies wurde durch eine Abgasanalytik getestet, welche zu diesem Zweck in das Fermenterleitsystem eingebunden wurde. Eine sehr wichtige Frage war hierbei, inwieweit sich das eingeblasene CO₂ im Medium löst und damit tatsächlich auf die Zellen wirkt oder ob es mit der Abluft sofort wieder ausgetrieben wird. Hierzu wurden folgende Überlegungen angestellt:

In reinem Wasser (T= 30°C) ist die Löslichkeit von CO₂ direkt vom CO₂ Partialdruck abhängig und mit ca. 27 mmol bar⁻¹ l⁻¹ relativ hoch (30-mal höher als die von O₂). Daher sollte sich bei ausreichender Durchmischung das gesättigte Gleichgewicht einstellen. Dies würde bedeuten, dass sich in reinem Wasser bei 20 % CO₂ (entspricht 0,2 bar pCO₂) in der Zuluft maximal 5,4 mmol/l CO₂ lösen können.

Bei der Lösung von CO₂ stellt sich ein Gleichgewicht unter Bildung von Kohlensäure ein. Diese ist eine schwache zweiprotonige Säure, welche ihre Protonen in zwei Dissoziationsstufen an Wasser oder andere Basen abgibt (MOSTAFA *et al.*, 2003).



Die Kohlensäure selbst kann als Komponente im Medium vernachlässigt werden, da die Reaktion von CO₂ zu H₂CO₃ sehr langsam und die Rückreaktion zu CO₂ und die Dissoziation in die Ionen deutlich schneller sind.

Die Konzentrationen von CO_2 , HCO_3^- und CO_3^{2-} hängen stark vom pH-Wert ab. Bei pH 6,35 liegen CO_2 und HCO_3^- zu gleichen Teilen vor, der Anteil von CO_3^{2-} ist zu vernachlässigen. Mit alkalischer werdendem pH steigt der Anteil von HCO_3^- bis auf ein Maximum von 98 % bei pH 8,3 an (und dann je 1 % von CO_2 und CO_3^{2-}). Die Wasserlöslichkeiten der Ionen HCO_3^- und CO_3^{2-} sollten deutlich höher sein als jene von CO_2 . Hieraus folgt, dass der Gesamteintrag von CO_2 (inklusive der Dissoziationsprodukte von H_2CO_3) mit steigendem pH-Wert zunimmt.

In einer Bakteriekultur sind weitere Faktoren von Bedeutung. Einerseits sinkt die Löslichkeit von CO_2 mit steigender Temperatur und steigender Salzkonzentration (BURTON, 1986). Andererseits können komplexe organische Moleküle CO_2 binden und die CO_2 Löslichkeit im Medium erhöhen (JONES und GREENFIELD, 1982). Wichtig ist hierbei die Bildung von Carbamaten und Kolloiden. Bei der Bildung von Carbamaten reagiert das gelöste CO_2 mit freien Aminogruppen von Proteinen. Kolloide entstehen, wenn H_2CO_3 mit positiv geladenen Gruppen an Proteinen Dipolbindungen ausbildet. Beide Prozesse verändern das Dissoziationsgleichgewicht zu Gunsten der Aufnahme von CO_2 in die Kultur. Aufgrund der hohen Lipidlöslichkeit von CO_2 erhöhen die Cytoplasmamembranen der Zellen die Aufnahme von CO_2 ebenfalls (BURTON, 1986). Einen weiteren wichtigen Faktor stellen enzymatische Reaktionen dar, bei denen CO_2 bzw. HCO_3^- gebildet oder verbraucht wird.

Der tatsächliche CO_2 Eintrag in eine Bakterienkultur ist aufgrund der vielen Faktoren somit nur schwer theoretisch zu quantifizieren. Um den praktischen CO_2 Eintrag mit der aufgebauten Anlage zu testen, wurde zunächst ein definierter Kalium-Phosphat Puffer im Fermenter mit unterschiedlichen CO_2 Konzentrationen begast. Dabei wurde der Verlauf des pH-Wertes in Abhängigkeit von der CO_2 Konzentration in der Zuluft beobachtet (Abb. 3.10).

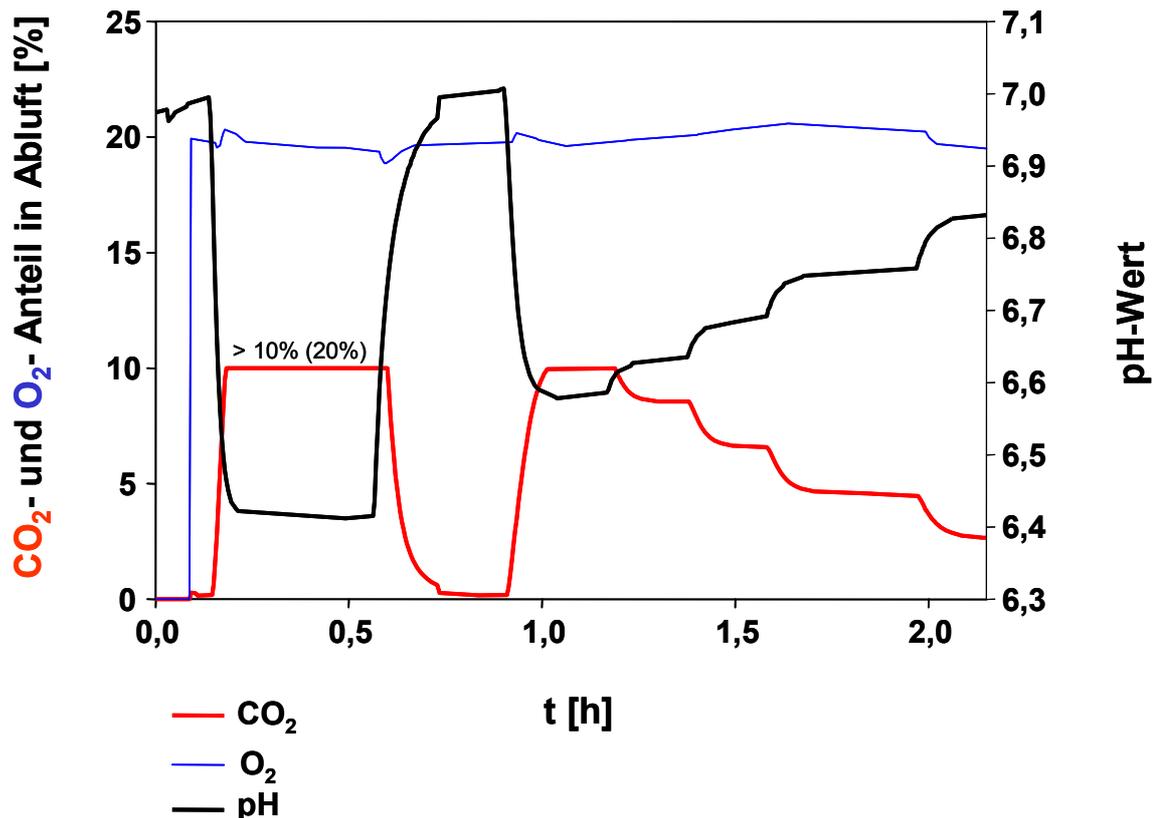


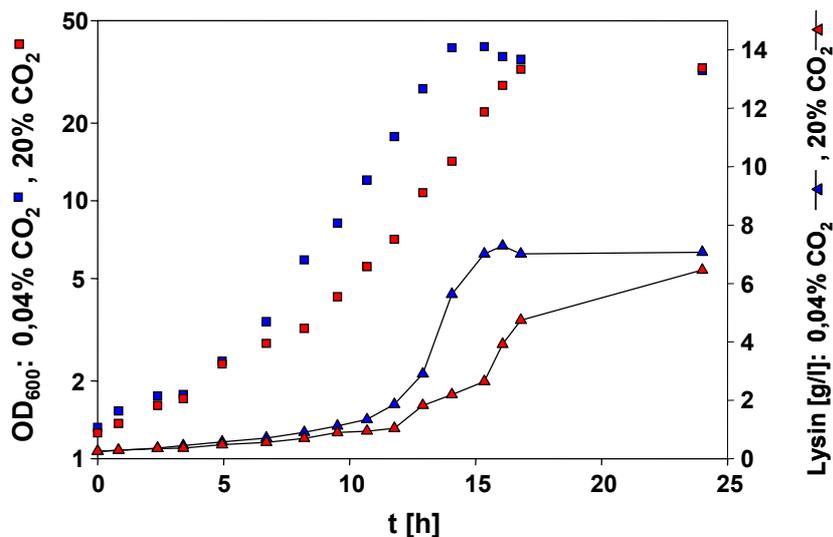
Abb. 3.10: Ein Kalium-Phosphat Puffer (30 mM, pH 7) wurde bei einer Begasungsrate von 1 vvm, 30°C und einer Rührerdrehzahl von 1200 rpm mit unterschiedlichen CO₂ Konzentrationen und konstanter O₂ Konzentration in der Zuluft begast. Die Abbildung zeigt die von der Abgasanalyse gemessenen CO₂ und O₂ Konzentrationen in der Abluft sowie die Entwicklung des pH-Wertes. Da die Abgasanalyse nur CO₂ Konzentrationen zwischen 0 und 10 % messen kann, wurde bei der anfangs eingestellten CO₂ Konzentration von 20 % (von t [h] = 0,2 bis 0,6) nur der Maximalwert von 10 % angezeigt. Sämtliche eingestellten CO₂ Konzentrationen bis max. 10 % wurden von der Abgasanalyse jedoch exakt bestätigt (von t [h] = 1 bis 2,2). Daher wurde davon ausgegangen, dass bei einer Einstellung von 20 % CO₂ an der Gasmischanlage tatsächlich 20 % CO₂ eingeblasen werden.

Erwartungsgemäß sank der pH-Wert mit steigenden CO₂-Konzentrationen in der Zuluft ab, bedingt durch die Dissoziation der bei der Lösung von CO₂ entstandenen Kohlensäure zu HCO₃⁻ + H⁺. Dabei hatte sich ein neues Gleichgewicht jeweils in kurzer Zeit eingestellt. Bei einer Konzentration von 20 % CO₂ in der Zuluft sank der pH-Wert von 7 auf 6,4 ab. Um hier die Konzentration des entstandenen HCO₃⁻ abschätzen zu können, wurde die Pufferkapazität des Kalium-Phosphat Puffers durch Titration mit HCl ermittelt. Zum Absenken des pH-Wertes von 7 auf 6,4 waren dabei 6 mmol HCl pro Liter Puffer nötig, woraus folgt, dass bei Begasung von einem Liter Puffer mit 20 % CO₂ ca. 6 mmol HCO₃⁻ + H⁺ entstanden sein müssen. Bei pH 6,4 liegen CO₂ und HCO₃⁻ jeweils ungefähr zu 50 % vor, also je 6 mmol CO₂ und 6 mmol HCO₃⁻. Die errechnete Löslichkeit von CO₂ bei 30°C liegt bei einer Löslichkeit von 27 mmol bar⁻¹ L⁻¹ bei 20 % (v/v) CO₂ (entspricht 0,2 bar) in der Zuluft bei 27 * 0,2

= 5,4 mmol/l und damit sehr nah an den erhaltenen 6 mmol/l. Dies legt nahe, dass bei den verwendeten Fermentern und der Apparatur für die Zuluftsteuerung tatsächlich eine ausreichende Durchmischung gewährleistet ist und sich somit das gesättigte Gleichgewicht einstellt und die CO₂ Konzentration im Medium direkt vom CO₂ Partialdruck in der Zuluft abhängt.

1.2.4 Einfluss von erhöhter CO₂ Konzentration bei niedrigem pH-Wert

Um den Einfluss eines erhöhtem pCO₂ auf den Stamm DM1946 bei gleichzeitiger pH-Variation zu analysieren, wurde dieser im Bioreaktor bei pH 7 und bei pH 6 mit 0,04 % CO₂ (Kontrollbedingungen) und mit 20 % CO₂ in der Zuluft kultiviert. Die O₂ Konzentration betrug dabei konstant 21 %. Bei pH 7 hatte die erhöhte CO₂ Konzentration auch auf den Stamm DM1946 nur geringen Einfluss. Die Abbildung 3.11 zeigt das Wachstum, die Lysinproduktion sowie alle bestimmten Parameter.

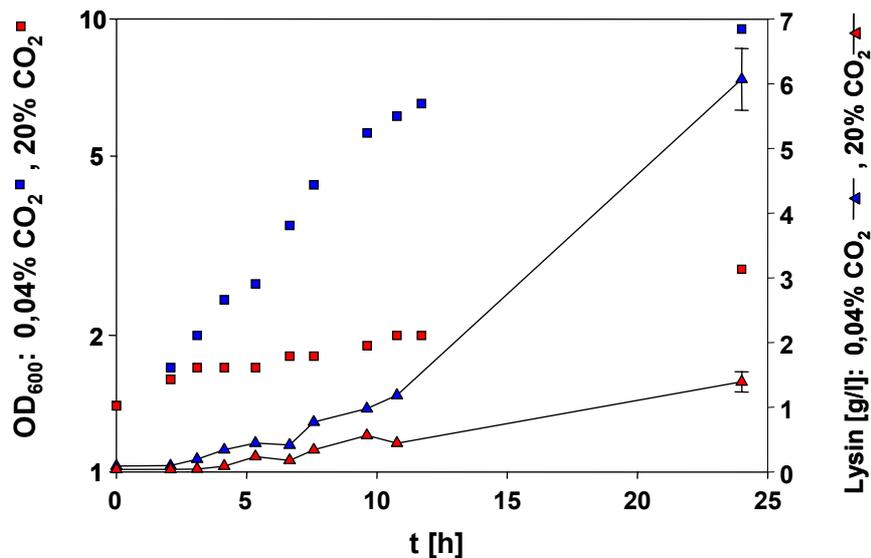


Parameter / Bedingung	μ [1/h]	pH _i	$\Delta\psi$ [mV]	PMK [mV]	Lysin [g/l]	Lysin/Biomasse [g/g]
0,04% CO ₂ / 21% O ₂ (blau)	0,297	7,72	149	195	7,07	0,61
20% CO ₂ / 21% O ₂ (rot)	0,279	7,73	155	202	6,46	0,54

Abb. 3.11: Wachstum und Lysinbildung des Stamms DM1946 in Typ II Fermentationsmedium bei pH 7. Begast wurde bei einer Begasunsrate von 1 vvm entweder mit 0,04 % CO₂ und 21 % O₂ (blau) oder mit 20 % CO₂ und 21 % O₂ (rot).

Die Kultur mit 20 % CO₂ in der Zuluft trat zwar etwas verzögert in die exponentielle Phase ein, zeigte dann aber eine kaum verringerte Wachstumsrate. Ebenso waren

die End- und die biomassespezifischen Ausbeuten an Lysin in beiden Kulturen vergleichbar. Zudem wurden während der exponentiellen Wachstumsphase vergleichbare Werte für den internen pH-Wert, das Membranpotential und die PMK ermittelt. Im Gegensatz dazu hatte die erhöhte CO₂ Konzentration bei pH 6 drastische Auswirkungen.



Parameter	μ [1/h]	pH _i	$\Delta\psi$ [mV]	PMK [mV]	Lysin [g/l]	Lysin/Biomasse [g/g]
Bedingung						
0,04% CO ₂ 21% O ₂ ■	0,142	6.91	124	183	6,06	1.77
20% CO ₂ 21% O ₂ ■	0,026	6.16	137	150	1,39	1.40

Abb. 3.12: Wachstum und Lysinbildung des Stamms DM1946 in Typ II Fermentationsmedium bei pH 6. Begast wurde bei einer Begasunrsrate von 1 vvm entweder mit 0,04 % CO₂ und 21 % O₂ (blau) oder mit 20 % CO₂ und 21 % O₂ (rot).

Während die mit Luft begasten Zellen mit einer Wachstumsrate von 0,142 h⁻¹ wuchsen, erreichten die Zellen mit erhöhter CO₂ Konzentration 0,026 h⁻¹ (Abb. 3.12). Entsprechend unterschiedlich waren die Lysin-Ausbeuten: Die Zellen unter Kontrollbedingungen produzierten in 24 h 6,06 g/l Lysin, die zusätzlich mit CO₂ gestressten Zellen nur 1,39 g/l. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden die internen pH-Werte sowie die Werte für das Membranpotential und für die protonenmotorische Kraft bestimmt. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied: Während die Zellen unter Kontrollbedingungen den cytoplasmatischen pH-Wert mit 6,91 stabil hielten, waren die Zellen mit erhöhter CO₂ Konzentration hierzu nicht in

der Lage. Der interne pH lag bei 6,16. Zusammen mit vergleichbaren Werten für das Membranpotential ergaben sich ebenfalls sehr unterschiedliche Werte für die PMK: Für die Zellen unter Kontrollbedingungen wurde ein Wert von 183 mV und für die zusätzlich mit CO₂ gestressten Zellen ein stark reduzierter Wert von 150 mV bestimmt.

1.2.5 Der Einfluss von CO₂ auf den cytoplasmatischen pH-Wert

Nach dem Befund der Auswirkungen von CO₂ bei pH 6 stellte sich die Frage, ob CO₂ direkt den cytoplasmatischen pH-Wert beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde der Wildtyp in MMI-Medium im Fermenter bei 30°C, 1200 rpm und einer Begasungsrate von 1 vvm inkubiert. Der pH-Wert des Mediums wurde durch kontrollierte Säure- bzw. Base-Zugabe bei pH 6 bzw. bei pH 7 gehalten. Bei konstanter O₂ Versorgung wurde nun die CO₂ Konzentration in der Zuluft variiert. Dabei wurde ca. 15 min mit Luft begast, 15 min mit 20 % CO₂ und dann wieder 15 min mit Luft. Nach jeweils ca. 10 min wurden die cytoplasmatischen pH-Werte bestimmt

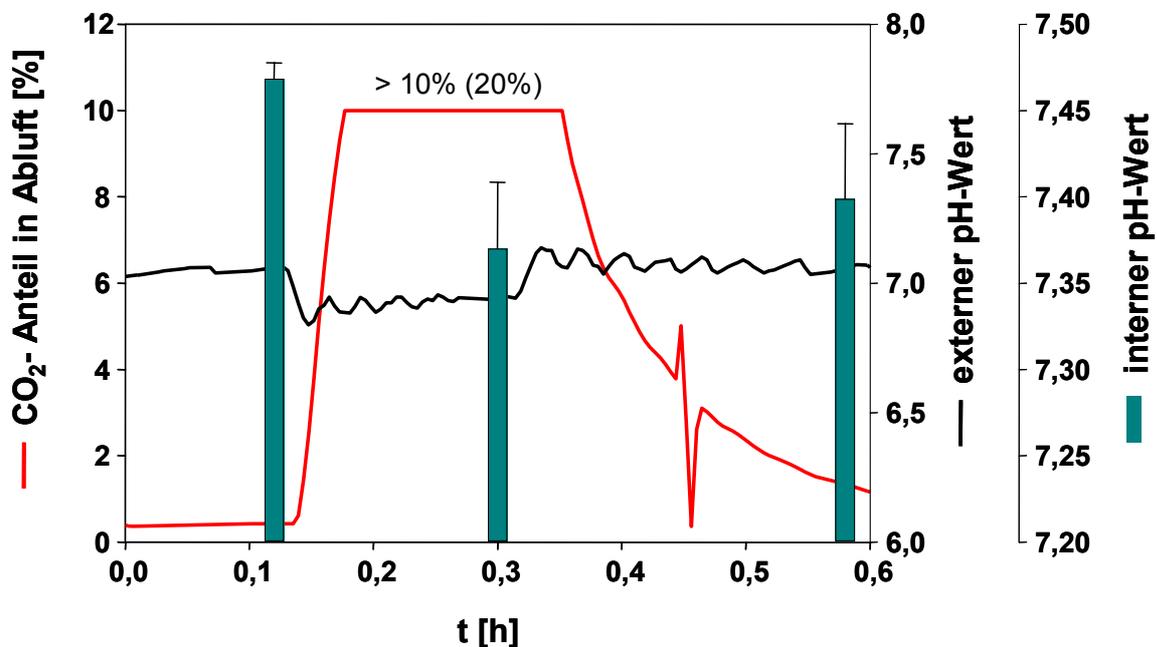


Abb. 3.13: Der Einfluss von CO₂ auf den cytoplasmatischen pH-Wert bei pH 7. Dargestellt sind die gemessenen CO₂ Anteile in der Abluft, der pH-Wert des Mediums sowie die cytoplasmatischen pH-Werte, welche anhand der Verteilung von radioaktiv markierter Benzoesäure bestimmt wurden.

Die Abbildung 3.13 zeigt, dass bei pH 7 und Luftbegasung der interne pH bei ca. 7,45 lag. Nach 10minütiger Begasung mit 20 % CO₂ sank dieser auf 7,35 ab und stieg nach 10minütiger Begasung mit Luft wieder auf ca. 7,4 an. Dieser Effekt war bei pH 6 noch deutlicher. Hier lag der interne pH-Wert bei Begasung mit Luft bei ca. 7,05, sank nach 10minütiger Begasung mit 20 % CO₂ auf 6,85 und stieg bei Begasung mit Luft wieder auf einen Wert von 6,95 an (Abb. 3.14)

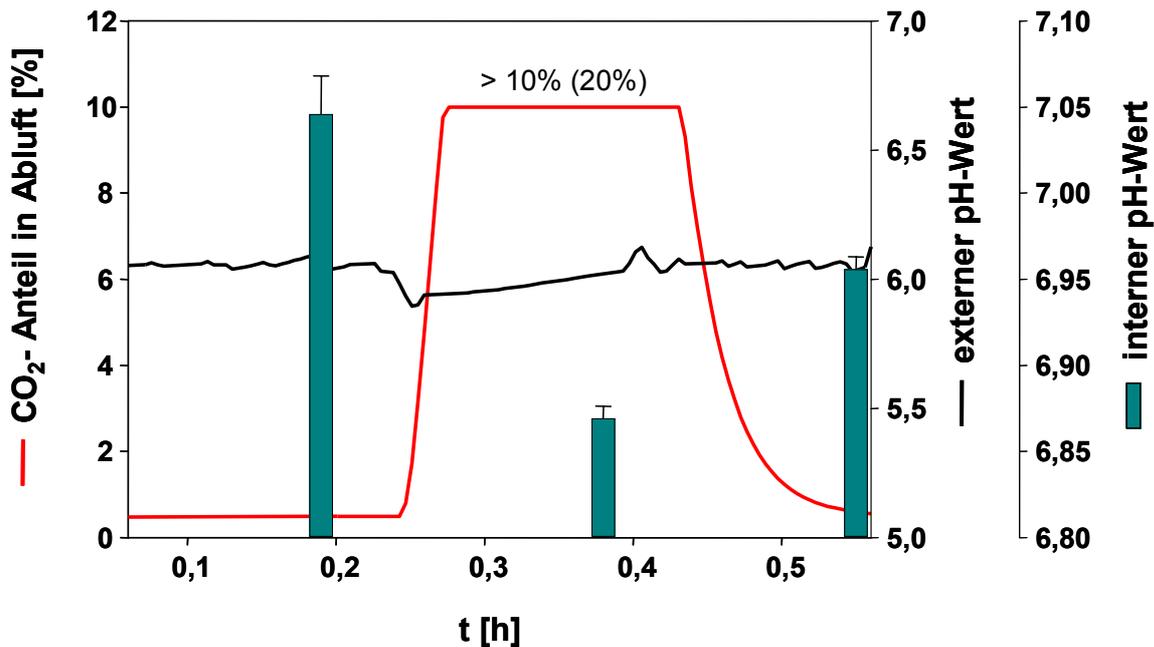


Abb. 3.14: Der Einfluss von CO₂ auf den cytoplasmatischen pH-Wert bei pH 6. Dargestellt sind die gemessenen CO₂ Anteile in der Abluft, der pH-Wert des Mediums sowie die cytoplasmatischen pH-Werte, welche anhand der Verteilung von radioaktiv markierter Benzoesäure bestimmt wurden.

Diese Messungen zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen einer erhöhten CO₂ Konzentration und dem cytoplasmatischen pH-Wert. Diese Daten belegen die besondere Bedeutung der pH-Homöostase für Zellen, welche bei der industriellen Fermentation pH-Schwankungen und erhöhten CO₂ Konzentrationen ausgesetzt sind. Da die Mechanismen der pH-Homöostase in *C. glutamicum* bislang jedoch nicht bekannt sind, sollten im zweiten Teil der Arbeit wichtige Komponenten der pH-Homöostase identifiziert und charakterisiert werden.

2. Identifizierung und Charakterisierung wichtiger Komponenten der pH-Homöostase

Es liegen hinsichtlich der Mechanismen und der Komponenten der pH-Stress Antwort für eine Reihe von Bakterien ausführliche Untersuchungen vor (siehe Einleitung), jedoch nicht für *C. glutamicum*. In diesem Teil der Arbeit sollten in *C. glutamicum* beteiligte Komponenten der pH-Homöostase identifiziert und charakterisiert werden. Hierfür wurde zunächst getestet, ob Komponenten, die in anderen Bakterien eine wichtige Funktion bei der pH-Homöostase haben, auch in *C. glutamicum* von Bedeutung sind. Außerdem wurden anhand der Ionenabhängigkeit der pH-Homöostase Hinweise auf die Beteiligung von Kationen/Protonen Antiportern und K^+ Transportsystemen abgeleitet. Die dazugehörigen Systeme wurden untersucht. Um Hinweise auf weitere, bislang unbekannte Komponenten der pH-Homöostase zu erhalten, wurden außerdem eine Transkriptom- und eine Proteomanalyse von Wildtypzellen durchgeführt, welche bei unterschiedlichen pH-Werten kultiviert worden waren.

2.1 Untersuchungen zur Beteiligung von Aminosäure-Decarboxylasen, der Urease, der F_1F_0 -ATPase sowie von Zwei-Komponenten-Systemen an der pH-Stress Antwort

Zunächst wurden getestet, ob Aminosäure-Decarboxylasen, die Urease, die F_1F_0 -ATPase sowie Zwei-Komponenten-Systeme unter den in dieser Arbeit angewendeten Bedingungen eine bedeutende Funktion bei der pH-Stress Antwort haben. Dabei wurden bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Mutanten charakterisiert, indem Wachstumsbestimmungen bei verschiedenen pH-Werten in Mikrotiterplatten sowie Bestimmungen der cytoplasmatischen pH-Werte durchgeführt wurden.

Aminosäure-Decarboxylasen

Viele Bakterien – darunter *E. coli* – nutzen die Protonen verbrauchenden Reaktionen von Decarboxylasen, um bei Säurestress den internen und externen pH-Wert zu erhöhen (SLONCZEWSKI und FOSTER, 1996 und GUT *et al.*, 2006). Homologiestudien zeigten in *Corynebacterium* keine ähnlichen Proteine zu den in *E. coli* wichtigen Decarboxylasen für Glutamat, Arginin und Lysin. Zudem zeigte sich

III. Ergebnisse

bei pH-Stress Experimenten mit *C. glutamicum* kein Einfluss nach Zugabe der Aminosäuren Glutamat, Arginin und Lysin, so dass eine Beteiligung dieser Systeme in *C. glutamicum* unwahrscheinlich ist (Daten nicht gezeigt).

Urease

Für einige grampositive Bakterien wird die Bedeutung der Urease bei tiefen pH-Werten diskutiert (COTTER und HILL, 2003). Von der Arbeitsgruppe Prof. Burkovski in Erlangen wurde eine Mutante zur Verfügung gestellt, in der das Gen für die akzessorische Untereinheit UreD zerstört ist und deshalb keine Urease Aktivität mehr besitzt (NOLDEN *et al.*, 2000). Um eine mögliche Funktion der Urease bei der pH-Homöostase in *C. glutamicum* zu testen, wurde das Wachstum dieser Mutante bei verschiedenen pH-Werten in MMI Medium in Mikrotiterplatten beobachtet. Hierbei zeigte die Mutante gegenüber dem Wildtyp keine erhöhte pH-Sensitivität (Daten nicht gezeigt).

F₀F₁-ATPase

Die Bedeutung der ATPase bei der pH-Homöostase von grampositiven Bakterien ist in der Literatur beschrieben (COTTER und HILL, 2003). Von der Arbeitsgruppe Prof. Bott in Jülich wurde eine Mutante ohne F₀F₁-ATPase Aktivität zur Verfügung gestellt. Sie sollte hinsichtlich des Wachstums (MTP-Versuche) und des internen pH-Wertes bei pH-Stress untersucht werden. Allerdings wuchs diese Mutante auch unter neutralen Bedingungen im Schüttelkolben nur sehr langsam, in Mikrotiterplatten war die Kultivierung überhaupt nicht möglich. Um die Beteiligung der F₀F₁-ATPase an der pH-Homöostase dennoch testen zu können, wurden im Wildtyp die internen pH-Werte vor und nach spezifischer Inhibierung der F₀F₁-ATPase durch DCCD (RAO *et al.*, 2001) gemessen. Dabei war der Einfluss von DCCD im Vergleich zu anderen Bakterien gering. Der interne pH sank nach Inhibierung der F₀F₁-ATPase bei einem niedrigen externen pH (pH 6) um 0,2 Einheiten und stieg bei einem alkalischen externen pH (pH 9,5) um 0,2 Einheiten.

Zwei-Komponenten-Systeme

Es ist bis heute unverstanden, wie Bakterienzellen pH-Änderungen wahrnehmen. Aktive Reaktionen (z.B. Änderungen der Transkription) setzen die Perzeption von pH-Stress aber voraus. Eine in Prokaryoten verbreitete Möglichkeit der

Wahrnehmung externer Bedingungen stellen Zwei-Komponenten-Systeme dar. Bei der Annotation der *C. glutamicum* Genomsequenz wurden die Gene für dreizehn Zwei-Komponenten-Systeme identifiziert (KALINOWSKI *et al.*, 2003). Zur funktionellen Analyse wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Bott in Jülich zwölf Mutanten konstruiert, in denen die Gene für jeweils eine Sensor kinase und den dazugehörigen Antwortregulator deletiert sind (KOCAN + SCHAFFER *et al.*, 2005). Die Gene für das System Nr. 4 (*cgtSR4*) konnten nicht deletiert werden, vermutlich, da das System oder eine seiner Komponenten essentiell ist.

Der AG Krämer wurden die Mutanten für die Systeme Nr.1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sowie für das MtrAB System zur Verfügung gestellt. Um eine mögliche Beteiligung dieser Systeme an der pH-Stress Antwort zu testen, wurden von allen Mutanten sowie der MtrB Mutante pH-Optimumskurven aufgenommen. Die Abbildung 3.15 zeigt das Ergebnis. Die Δ mtrAB Mutante war nicht in der Lage, in MMI Medium zu wachsen, weder in Mikrotiterplatten noch im Schüttelkolben. Dieses Phänomen ist bereits in der Diplomarbeit von Nina Möker beschrieben worden (MÖKER, 2002). Eine physiologische Erklärung dafür konnte bisher nicht gefunden werden. Die Mutanten für die Systeme Nr. 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 zeigten keinen pH-sensitiven Phänotyp. Die Mutanten Nr. 7 und Nr. 8 wuchsen bei alkalischen pH-Werten mit etwas höheren Wachstumsraten als der Wildtyp. Die Δ mtrB Mutante wuchs bei alkalischen Bedingungen und die Mutante Nr. 3 bei sauren und bei alkalischen Bedingungen mit geringeren Wachstumsraten. Mit beiden Mutanten wurde dieser Versuch wiederholt.

Bei der Δ mtrB Mutante zeigte sich die angedeutete pH-Sensitivität bei den Wiederholungen nicht (Daten nicht gezeigt). Da das MtrAB System bei der Osmoregulation beteiligt ist (MÖKER *et al.*, 2004), wurde hier auch die Kombination aus alkalischem pH und erhöhten NaCl und KCl Konzentrationen (je 0,5 M) untersucht. Bei erhöhten Salzkonzentrationen zeigten sich bei alkalischem pH ein dann ein sehr schwacher Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

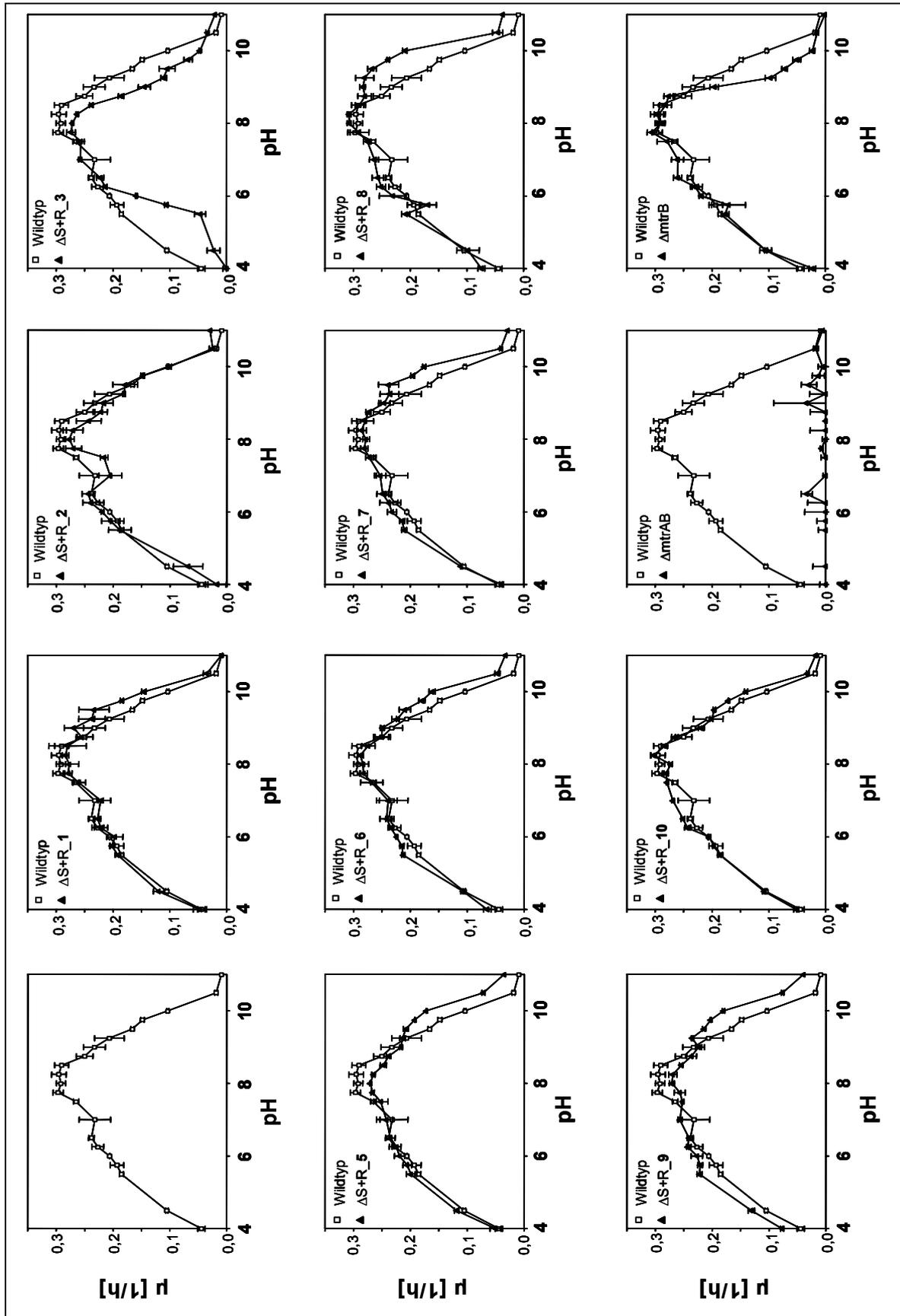


Abb. 3.15: Die Wachstumsraten des Wildtyps und der angegebenen Zwei-Komponenten-System Mutanten in MMI-Medium in Mikrotiterplatten bei verschiedenen pH-Werten.

Bei der Mutante Nr. 3 bestätigten die Versuchswiederholungen die niedrigeren Wachstumsraten unter sauren und alkalischen Bedingungen. Allerdings wuchs dieser Stamm auch bei neutralem pH etwas langsamer als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). In der Mutante Nr. 3 ist das dritte Zwei-Komponenten-System, PhoRS ausgeschaltet. Dieses System spielt eine wichtige Rolle bei der Anpassung an Phosphat Limitation (KOCAN + SCHAFFER *et al.*, 2005).

2.2 Beteiligung von Kationen/Protonen Antiportern

Nachdem die vorangegangenen Untersuchungen keinen deutlichen Hinweis auf eine wichtige Funktion von Aminosäure-Decarboxylasen, der Urease, der F_1F_0 -ATPase sowie der getesteten Zwei-Komponenten-System geliefert haben, wurde die Ionenabhängigkeit der pH-Homöostase bei alkalischem pH getestet. Alkalophile Prokaryoten nutzen zur pH-Homöostase Na^+/H^+ Antiporter und sind dabei zwingend auf die Anwesenheit von Natrium angewiesen. In geringerem Ausmaß nutzen jedoch bei alkalischen Bedingungen auch neutrophile Bakterien wie *E. coli* und *B. subtilis* diese Antiporter (PADAN *et al.*, 2005). Dabei kann die Ionenabhängigkeit der pH-Homöostase einen Hinweis auf deren Beteiligung geben.

2.2.1 Ionenspezifität der pH-Homöostase bei alkalischem pH

Um Ionenspezifität in *C. glutamicum* zu testen, wurden Wildtyp-Zellen in MMI-Medium in Anwesenheit von Na^+ (75 mM) kultiviert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet und in gepuffertem Medium bei pH 8,5 resuspendiert, einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit von Na^+ . Anschließend wurden die cytoplasmatischen pH-Werte der Zellen bestimmt (Abb. 3.16). Dabei war der interne pH-Wert von Zellen, die ohne Na^+ inkubiert wurden um 0,1 Einheiten höher als jener von Zellen, welche mit Na^+ inkubiert wurden. Der gleiche Versuch wurde auch mit Zellen durchgeführt, die in MMI-Medium bei neutralem pH ohne Na^+ kultiviert worden waren. Hier waren die internen pH-Werte generell erhöht. In Zellen, die ohne Na^+ gewachsen waren und ohne Na^+ resuspendiert wurden, stieg der interne pH-Wert auf 8,15 an. Hierbei lässt ein höherer cytoplasmatischer pH-Wert auf eine schlechtere pH-Homöostase schließen. Dies zeigte, dass die Anwesenheit von Na^+ zur pH-Homöostase bei alkalischem pH nötig ist und legte nahe, dass in *C. glutamicum* ein oder mehrere Na^+/H^+ Antiporter beteiligt sind.

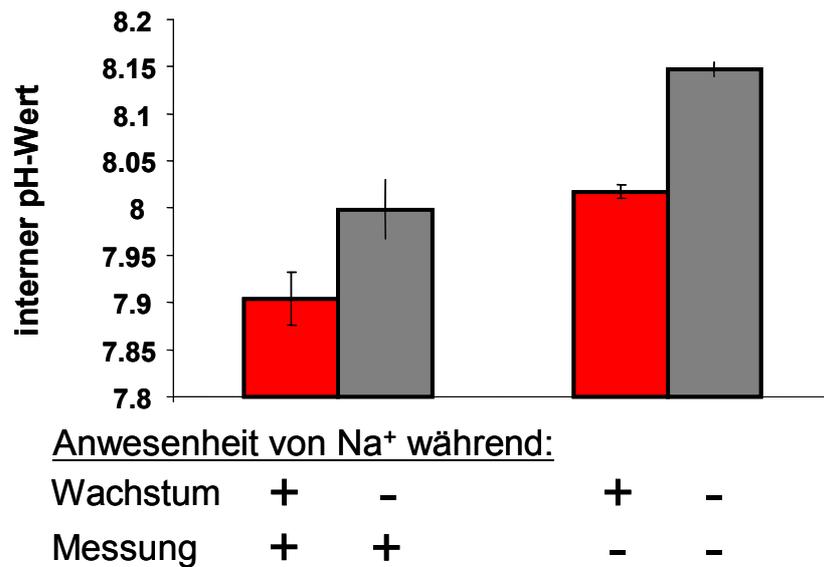


Abb. 3.16: Der interne pH-Wert in Abhängigkeit von Na⁺ bei pH 8,5. Wildtyp-Zellen, die mit oder ohne Na⁺ (75 mM) gewachsen waren, wurden bei pH 8,5 in Anwesenheit (75 mM) oder Abwesenheit von Na⁺ resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min unter Rühren bei 30°C wurden die internen pH-Werte bestimmt.

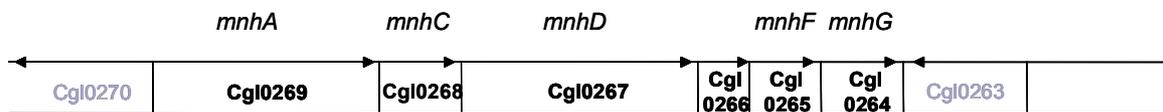
2.2.2 Kationen/Protonen Antiporter in *C. glutamicum*

Nach dem Hinweis auf die Beteiligung von Na⁺/H⁺ Antiportern wurde im Genom von *C. glutamicum* nach Sequenzen von möglichen Na⁺/H⁺ Antiportern gesucht. Dabei wurde mit der Genomsequenz von KYOWA HAKKO KOGYO gearbeitet, welche unter der Nummer BA00036 in der DDBJ-Datenbank öffentlich zugänglich ist. Dabei wurde ein Gen (*Cgl1436*) gefunden, dessen Produkt elf vorhergesagte Transmembranhelices hat und hohe Ähnlichkeit zu dem Antiporter NhaP aus *Pseudomonas aeruginosa* aufweist. Des Weiteren wurden zwei Gencluster mit je sechs *open reading frames* (Orfs) gefunden, die hohe Ähnlichkeit zu dem *mnh*-Cluster aus *Staphylococcus aureus* aufweisen (Abb. 3.17). *S. aureus* ist ein halotolerantes Bakterium, das in Konzentrationen von bis zu 3 M NaCl überlebt und bei alkalischen Bedingungen bis pH 9,5 gut wachsen kann. Das *mnhABCDEF*G-Cluster aus *S. aureus* kodiert einen wichtigen Multikomponenten Na⁺/H⁺ Antiporter, welcher unter diesen Bedingungen von physiologischer Bedeutung ist (HIRAMATSU *et al.*, 1998). Diese beiden Gencluster wurden im Folgenden *cpaA* (*Cgl0269* bis *Cgl0264*) und *cpaB* (*Cgl2729* bis *Cgl2734*) genannt.

Zur Charakterisierung der Gene wurden die entsprechenden Einzelmutanten – also eine NhaP, eine CpaA und eine CpaB Mutante – durch Insertionsmutagenese

konstruiert. Die CpaA und die CpaB Mutante wurden von Elena Jolkver konstruiert, hier erfolgte die Insertionsmutagenese in *Cgl0267* bei CpaA bzw. *Cgl2731* bei CpaB.

CpaA



CpaB



Abb. 3.17: Die Anordnung der Gencluster (*cpaA*: von *Cgl0269* bis *Cgl0264*, *cpaB*: von *Cgl2729* bis *Cgl2734*) mit Ähnlichkeit zu dem *mnh* Cluster aus *Staphylococcus aureus*. In beiden Genclustern finden sich Orfs mit Ähnlichkeit zu *mnhA*, *mnhC*, *mnhD*, *mnhF* und *mnhG*. Die Dreiecke zeigen die Leserichtung an.

2.2.2.1 Beteiligung der Kationen/Protonen Antiporter bei der Na⁺ Homöostase

Als Funktionen von Na⁺/H⁺ Antiportern werden in der Literatur die pH-Homöostase sowie die Regulation des Zellvolumens genannt (PADAN and SCHULDINER, 1994). Die wichtigste Funktion dieser Antiporter ist bei neutrophilen Bakterien jedoch die Na⁺ Homöostase. Na⁺/H⁺ Antiporter exportieren Na⁺ Ionen zum Aufbau eines elektrochemischen Potentials für Na⁺, welches die treibende Kraft für Na⁺-abhängige Prozesse darstellt (z. B. Na⁺/Substrat Symport) (CHEN *et al.*, 1985). Vor allem ist der Export aber deshalb nötig, weil Na⁺ in höheren cytoplasmatischen Konzentrationen toxisch wirkt (PADAN *et al.*, 1989).

Um die Funktion der putativen Antiporter in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde daher zunächst die Na⁺ Sensitivität der einzelnen Mutanten getestet. Hierzu wurde das Wachstum der Stämme in Schüttelkolben, Mikrotiterplatten und auf Agarplatten bei unterschiedlichen Na⁺ Konzentrationen verfolgt. Dabei wurde sowohl bei der CpaA als auch bei der CpaB Mutante eine stark erhöhte Na⁺ Sensitivität beobachtet, während die NhaP Mutante keinen Phänotyp zeigte. Die Abbildung 3.18 zeigt exemplarisch einen Versuch mit Agarplatten, bei dem das Wachstum des Wildtyps

III. Ergebnisse

und das Wachstum der Insertionsmutanten bei aufsteigenden Na^+ -Konzentrationen dokumentiert wurde.

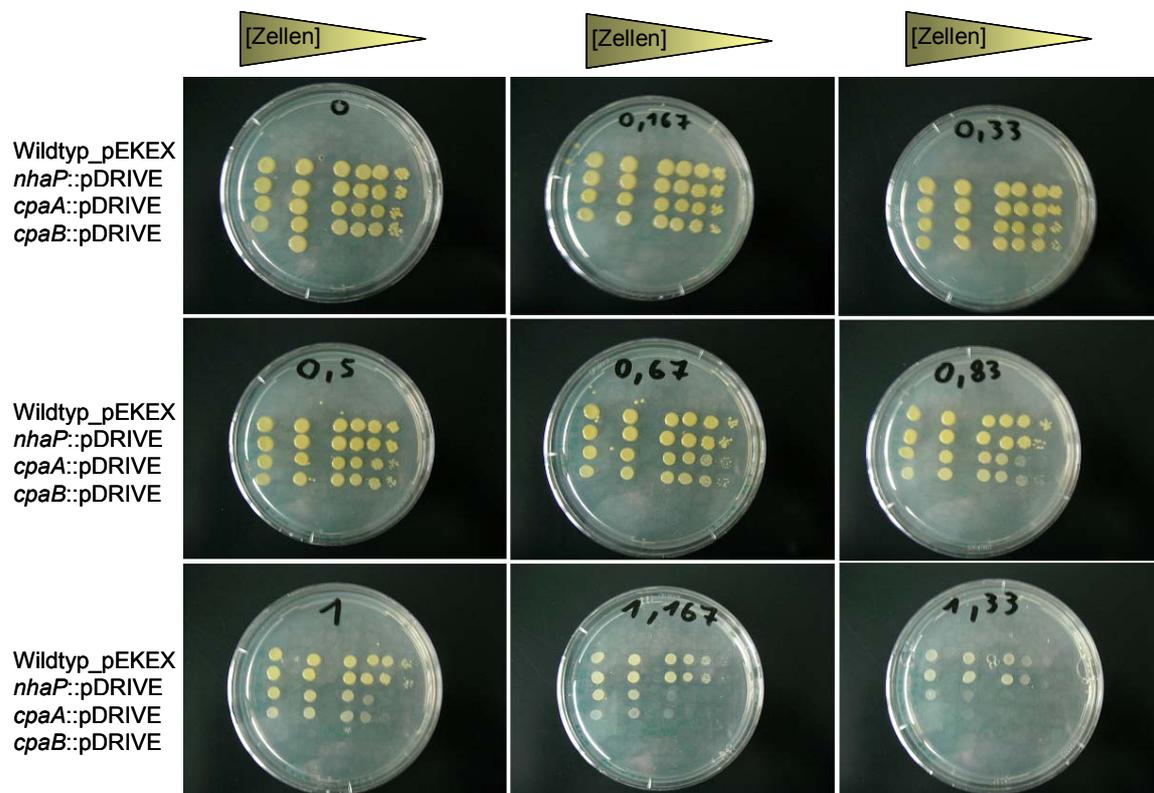


Abb. 3.18: Das Wachstum von Wildtyp_pEKEX und der Insertionsmutanten nach 68 h Kultivierung in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration (Die Konzentrationen sind in M auf den Platten angegeben). Die oberste Reihe wurde mit Wildtyp_pEKEX beimpft, die zweite Reihe mit der NhaP-Mutante, die dritte mit der CpaA-Mutante und die vierte mit der CpaB-Mutante. Jeweils ganz links wurden 5 μl mit einer OD_{600} von 1 und damit ca. 3,4 Millionen Zellen aufgetragen. Rechts daneben wurden die 1:10-Verdünnungen und damit jeweils ca. 340 000 Zellen, daneben 34 000 Zellen usw. und ganz rechts schließlich noch ca. 34 Zellen aufgetragen. Auf der ersten Platte mit 0 M NaCl wurde der Wildtyp in der zweiten Spalte versehentlich zweimal untereinander aufgetragen. Die Mutanten sind in dieser Spalte um eine Reihe nach unten versetzt.

Um das Wachstum der Mutanten direkt mit dem des Wildtyps vergleichen zu können, wurde dieser mit dem Leervektor pEKEX transformiert. Diese Transformation verleiht dem Wildtyp ebenfalls Resistenz gegenüber Kanamycin, verändert ihn ansonsten aber nicht. Bei niedrigen Na^+ Konzentrationen bis 0,33 M wuchsen alle Stämme gleich. Je höher die Na^+ Konzentrationen war, desto schlechter wuchsen die CpaA und die CpaB Mutante im Vergleich zum transformierten Wildtyp und zur NhaP Mutante. Dies legt nahe, dass sowohl das *cpaA* als auch das *cpaB* Gencluster

tatsächlich für funktionelle Na^+/H^+ Antiporter kodieren, welche in *C. glutamicum* für das Wachstum bei erhöhten Na^+ Konzentrationen notwendig sind.

2.2.2.2 Beteiligung der Kationen/Protonen Antiporter bei der pH-Homöostase

Nachdem die Versuche zur Na^+ Sensitivität nahe gelegt haben, dass zumindest CpaA und CpaB physiologisch bedeutende Na^+/H^+ Antiporter sind, wurden die Mutanten hinsichtlich ihrer pH-Sensitivität untersucht. Hierzu wurde das Wachstum dieser Stämme in Mikrotiterplatten bei unterschiedlichen pH-Werten in gepuffertem MMI-Medium verglichen. Wie in Abbildung 3.19 dargestellt, unterschieden sich die Wachstumsraten der einzelnen Stämme im alkalischen Bereich gar nicht und auch im neutralen und im sauren Bereich nicht wesentlich.

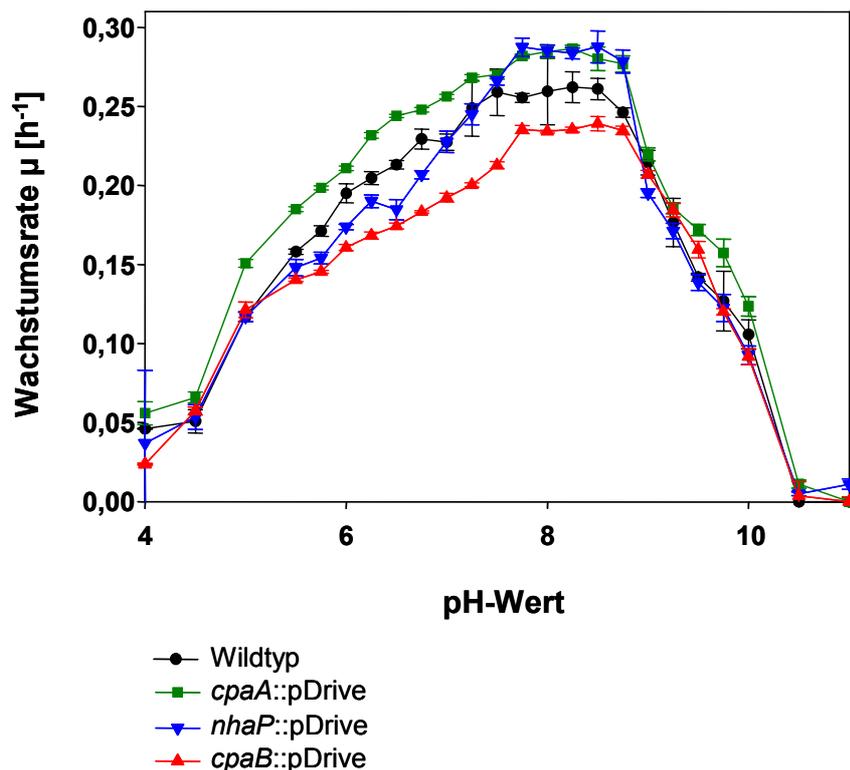


Abb. 3.19: Die Wachstumsraten des Wildtyps und der Mutanten bei unterschiedlichen pH-Werten in gepuffertem MMI-Medium.

Daraufhin wurde in diesen Mutanten die Fähigkeit zur pH-Homöostase und zur PMK-Homöostase getestet, indem bei niedrigem und bei hohem pH (pH 6 und pH 9 jeweils in Anwesenheit von 25 mM Na^+ und K^+) die internen pH-Werte und die Werte für das Membranpotential bestimmt wurden. Hier zeigten sich gegenüber dem

Wildtyp keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren wurde das pH-abhängige Wachstum bei gleichzeitig erhöhten Na^+ Konzentrationen untersucht. Dafür wurde zunächst der Wildtyp in Mikrotiterplatten bei aufsteigenden NaCl Konzentrationen und verschiedenen pH-Werten kultiviert. Hier zeigte sich, dass die Wachstumsraten mit alkalischer werdendem pH-Wert umso früher abfielen, je höher die NaCl Konzentration war. Die Abbildung 3.20 zeigt das Wachstum des Wildtyps bei den unterschiedlichen Bedingungen. Dabei wurden relativen Wachstumsraten aufgetragen, d.h. die höchste Wachstumsrate bei jeder NaCl Konzentration wurde als 100 % definiert und die anderen Raten zu dieser ins Verhältnis gesetzt.

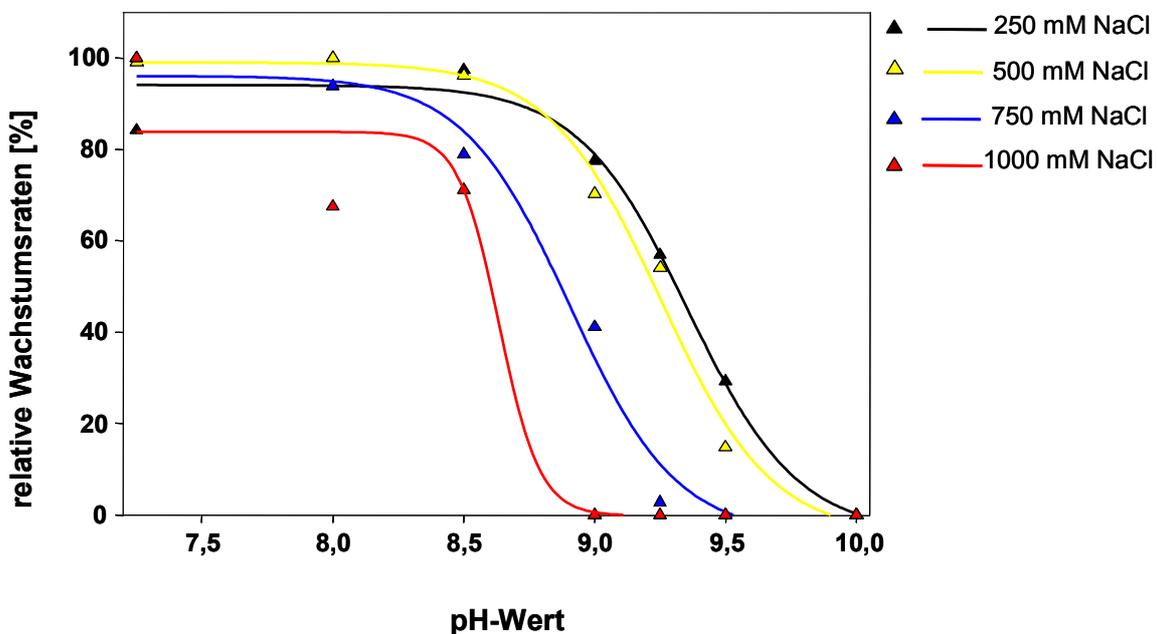


Abb. 3.20: Die relativen Wachstumsraten des Wildtyps bei verschiedenen Na^+ Konzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten. Die höchste Wachstumsrate bei jeder NaCl Konzentration wurde als 100 % definiert, die anderen Raten wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Dabei betrug die höchste Wachstumsrate bei 250 mM $0,23 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, bei 500 mM $0,19 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, bei 750 mM $0,14 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, bei 1000 mM $0,08 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, Die dazugehörigen Kurven wurden sigmoidal gefittet

Anschließend wurde auch das pH-abhängige Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bei verschiedenen Na^+ Konzentrationen getestet (Abb. 3.21). Ohne Zugabe von Na^+ und bei Zugabe bis zu einer Endkonzentration von 50 mM Na^+ wuchsen alle Stämme mit vergleichbaren Wachstumsraten. Im dargestellten Experiment wuchs die CpaB Mutante etwas langsamer, allerdings nicht bei alkalischem pH. Bei 250 mM und deutlicher bei 750 mM wuchsen die CpaA und die

III. Ergebnisse

CpaB Mutante deutlich schlechter, was erneut die stark erhöhte Na^+ Sensitivität dieser Stämme belegt. Die CpaB Mutante wuchs bei 750 mM zwischen pH 5,5 und 8,75 mit etwa gleich bleibenden Wachstumsraten, die dann mit höher werdendem pH abfielen; ab pH 9,25 war dabei kein Wachstum mehr möglich. Die CpaA Mutante wuchs in diesem Experiment bei pH 5,5 und 6 wie die CpaB Mutante. Die Raten der CpaA Mutante fielen mit alkalischer werdendem pH jedoch deutlich früher ab; schon bei pH 8 war kaum und ab pH 8,5 gar kein Wachstum mehr festzustellen. Die NhaP Mutante zeigte – wie auch in den durchgeführten Experimenten auf Agarplatten – keinen deutlichen Phänotyp.

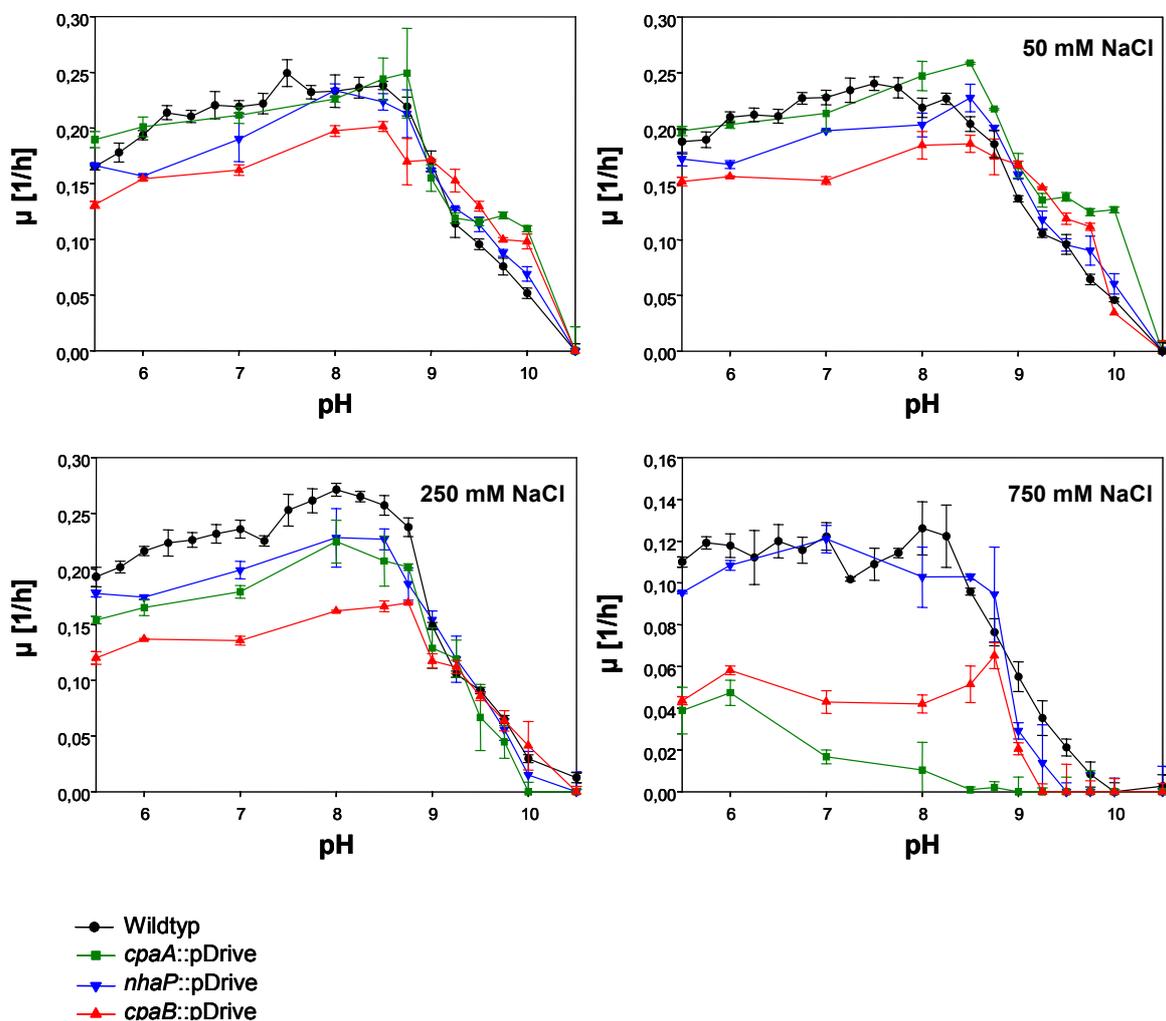


Abb. 3.21: Die Wachstumsraten des Wildtyps und der Mutanten bei den angegebenen Na^+ Konzentrationen und pH-Werten. Man beachte, dass die Wachstumsraten bei 750 mM NaCl generell deutlich niedriger waren (vgl. Skalierung der Y-Achsen).

Die Daten aus diesem Experiment deuten darauf hin, dass die getesteten Mutanten, besonders die CpaA Mutante bei hohen Na^+ Konzentrationen sensitiv gegenüber alkalischem pH sind. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass für diese Mutanten

III. Ergebnisse

in anderen Experimenten leicht abweichende Ergebnisse erhalten wurden: Während die erhöhte Na^+ Sensitivität der CpaA und der CpaB Mutante sehr zuverlässig beobachtet werden konnte, wurde die zusätzliche pH-Sensitivität bei hohen Na^+ Konzentrationen bei der CpaA und der CpaB Mutante in vielen, jedoch nicht in allen Experimenten beobachtet.

Zusammengenommen zeigen die Experimente, dass die CpaA und die CpaB Mutante erhöhte Sensitivität gegenüber hohen Na^+ Konzentrationen aufweisen. Bei niedrigen Na^+ Konzentrationen wurde keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber alkalischem pH beobachtet. Bei hohen Na^+ Konzentrationen schienen die CpaA und die CpaB Mutante etwas empfindlicher gegenüber alkalischem pH zu sein, allerdings war dieser Phänotyp nicht sehr deutlich ausgeprägt.

2.3 Die Funktion von K^+ bei niedrigem pH

2.3.1 *C. glutamicum* benötigt zur pH-Homöostase und zum Wachstum bei sauren Bedingungen die Anwesenheit von K^+

Für *E. coli* sowie für eine Reihe von grampositiven Bakterien wurde gezeigt, dass bei niedrigen externen pH-Werten die Anwesenheit von Kalium zur Aufrechterhaltung eines neutralen internen pH-Wertes zwingend notwendig ist (COTTER und HILL, 2003; SLONCZEWSKI und FOSTER, 1996). Um zu überprüfen, ob dies auch für *C. glutamicum* zutrifft, wurde der interne pH-Wert von Wildtyp-Zellen bei einem externen pH von 6 in Anwesenheit (25 mM) und Abwesenheit von K^+ bestimmt. Die Abbildung 3.22 zeigt, dass der cytoplasmatische pH-Wert in Anwesenheit von K^+ bei pH 7 lag und ohne K^+ deutlich absank auf pH 6,2. Dies belegt, dass auch in *C. glutamicum* die pH-Homöostase bei niedrigem pH von K^+ abhängig ist.

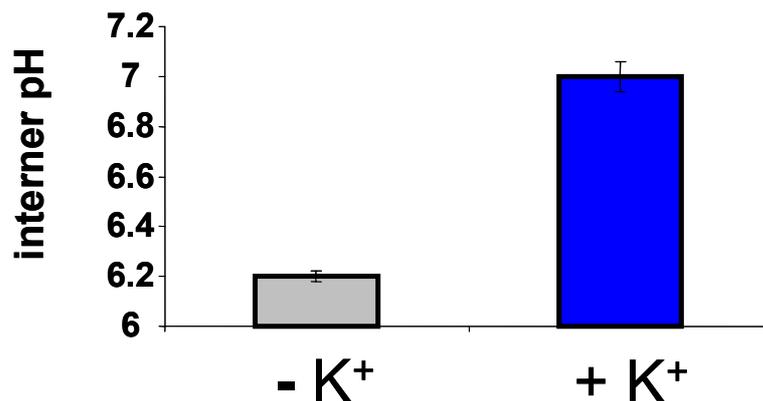


Abb. 3.22: Der cytoplasmatische pH-Wert mit und ohne K^+ . Für die Messungen wurden Zellen aus exponentieller Phase bei einem externen pH von 6 in Anwesenheit (25 mM) und Abwesenheit von K^+ (hier beträgt die Konzentration bedingt durch Verunreinigungen ca. 10 μ M) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min unter Rühren bei 30°C wurden die internen pH-Werte bestimmt.

Dies ließ darauf schließen, dass K^+ Transportsysteme wichtige Komponenten der pH-Homöostase sein könnten. Diese Systeme waren zu diesem Zeitpunkt in *C. glutamicum* noch nicht bekannt. Ähnlichkeitsstudien zeigten, dass es in *C. glutamicum* weder ein Ktr, ein Trk noch ein Kdp System gibt. Die Studien ergaben lediglich zwei mögliche Kandidaten: Das Genprodukt von *Cgl0712* (Kup), welches hohe Ähnlichkeit zu dem niedrig affinen K^+ Importer Kup aus *E. coli* aufweist und das Produkt von *Cgl0777* (CgIK), welches gleich dem K^+ Kanal KcsA aus *Streptomyces lividans* einen Selektivitätsfilter für K^+ Ionen besitzt. MARKUS BECKER hat im

Rahmen seiner Diplomarbeit an der genetischen Identifizierung des K^+ Transports in *C. glutamicum* sowie dessen physiologischer Bedeutung gearbeitet. Dabei konnte er unter anderem zeigen, dass *C. glutamicum* zwar ohne Zugabe von Kalium wachsen kann, jedoch nur bei alkalischem und neutralem pH. Bei niedrigem pH ist die Zugabe von K^+ für das Wachstum zwingend notwendig (Abb. 3.23). Außerdem wurden in dieser Diplomarbeit durch Deletionsmutagenese eine CgIK, eine Kup und eine CgIK/Kup Doppelmutante konstruiert. Kaliumaufnahmemessungen zeigten, dass die K^+ Aufnahme in *C. glutamicum* hauptsächlich über den putativen Kaliumkanal CgIK erfolgt.

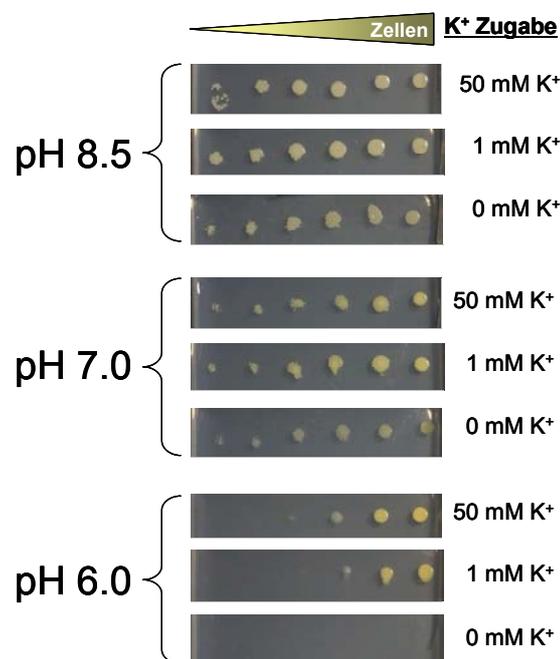


Abb. 3.23: A: Die Abbildung zeigt das Wachstum des Wildtyps auf Agarplatten bei unterschiedlichen pH-Werten und K^+ Konzentrationen (Abbildung von Markus Becker). *C. glutamicum* ist in der Lage, auch ohne Zugabe von K^+ zu wachsen, jedoch nur bei pH 8,5 und pH 7. Bei pH 6 ist die Zugabe von K^+ für das Wachstum zwingend notwendig.

2.3.2 Die Funktion von CgIK bei der pH-Homöostase

Nach der Charakterisierung des K^+ Transports durch MARKUS BECKER wurde nun untersucht, inwiefern CgIK und Kup eine Funktion bei der pH Homöostase ausüben. Dafür wurden die Deletionsmutanten in unterschiedlichen Experimenten analysiert. Zunächst wurde das Wachstum bei verschiedenen pH-Werten verglichen. Hierzu wurden die Stämme zunächst in kaliumfreiem Medium über Nacht vorkultiviert, um die interne Kaliumkonzentration zu verringern. Anschließend wurde das Wachstum in

Mikrotiterplatten in Anwesenheit von 50 mM Kalium bei verschiedenen pH-Werten beobachtet (Abb. 3.24).

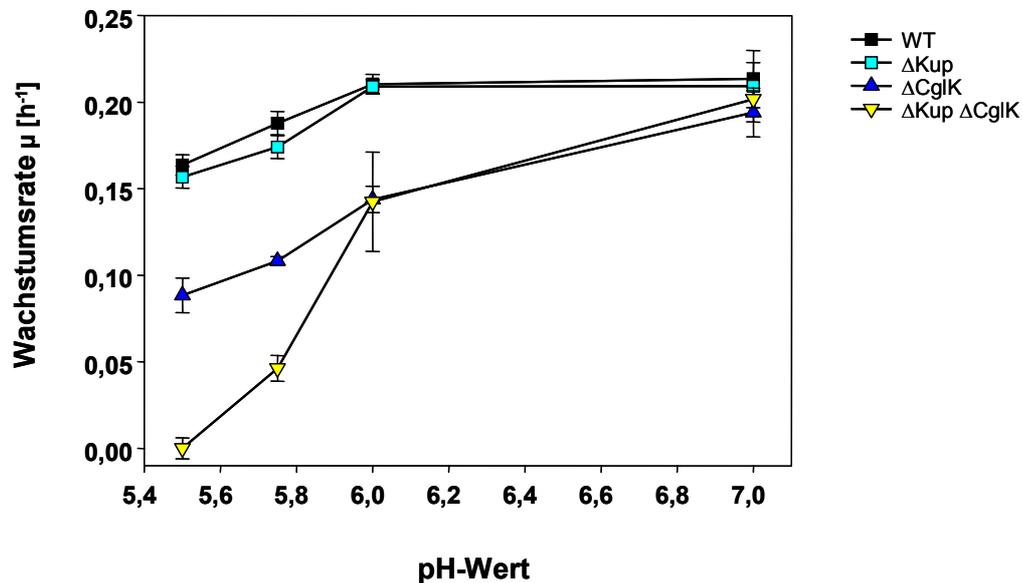


Abb. 3.24: Das Wachstum der angegebenen Stämme in Mikrotiterplatten bei ausreichender K⁺ Versorgung (50 mM). Die Stämme wurden in K⁺ freiem Medium über Nacht vorkultiviert.

Dabei zeigte die Kup Einzelmutante bei den getesteten pH-Werten keinen Phänotyp. Die CgIK Mutante wuchs bei neutralem pH wie der Wildtyp, bei niedrigem pH aber deutlich langsamer. Die CgIK/Kup Doppelmutante wuchs bei pH 7 und pH 6 wie die CgIK Einzelmutante, bei pH ≤ 5,75 aber noch langsamer.

Im Weiteren wurde untersucht, ob das langsamere Wachstum der Mutanten ohne CgIK tatsächlich durch schlechtere pH-Homöostase bedingt ist. Dafür wurde die pH-Homöostase in den einzelnen Stämmen getestet. Tatsächlich zeigten die CgIK Einzelmutante und die CgIK/Kup Doppelmutante erniedrigte cytoplasmatische pH-Werte. Bei pH 6 lagen die internen pH-Werte in diesen Stämmen ungefähr bei pH 6,5, während die internen pH-Werte im Wildtyp und in der Kup Mutante bei pH 7 gehalten werden konnten. Die Abbildung 3.25 korreliert die spezifischen Wachstumsraten (aus Abb. 3.24) mit den gemessenen cytoplasmatischen pH-Werten bei pH 6.

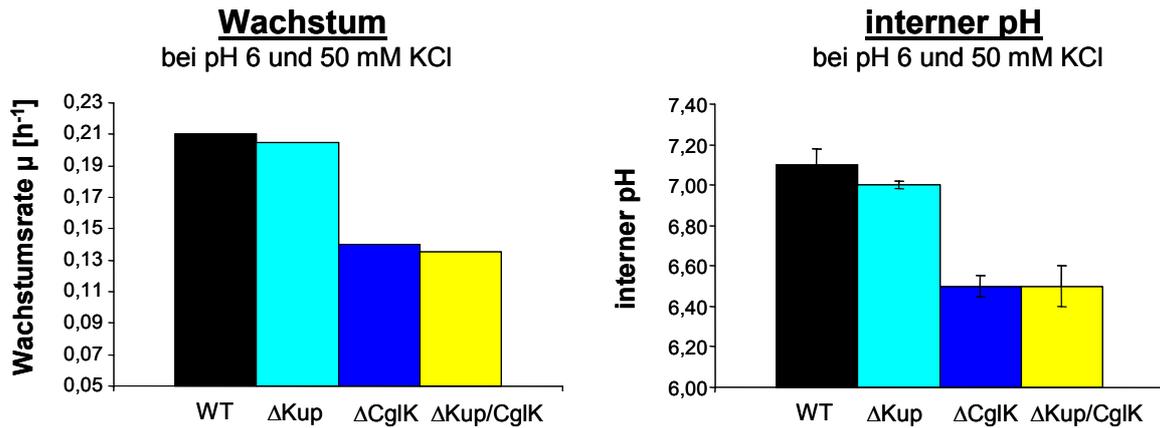


Abb. 3.25: Die spezifischen Wachstumsraten und die cytoplasmatischen pH-Werte der angegebenen Stämme bei pH 6 und 50 mM K^+ . Die cytoplasmatischen pH-Werte wurden in Zellen gemessen, welche in exponentieller Phase bei pH 6 und 50 mM K^+ resuspendiert worden waren.

In einem anderen Experiment wurde auch die Komplementation getestet. Dabei zeigte die CgIK Deletionsmutante, in die das Gen für CgIK auf dem Vektor pEKEX eingebracht wurde (von MARKUS BECKER konstruiert), bei einem externen pH von 6 wieder wie der Wildtyp einen internen pH von 7 (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Korrelation zwischen Wachstumsphänotyp und pH-Homöostase gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob die schlechtere pH-Homöostase in den betreffenden Mutanten tatsächlich dadurch bedingt ist, dass kein Kalium mehr transportiert werden kann. Hierzu musste gleichzeitig die K^+ -Aufnahme und die Entwicklung des internen pH-Wertes verfolgt werden. Um die K^+ Aufnahme gut messen zu können, wurden die Stämme zunächst sieben Stunden lang in MMI Medium ohne Kalium kultiviert und in kaliumfreiem MMI Medium bei pH 7 resuspendiert. Nun wurde dasselbe Volumen stark gepuffertes MMI-Medium (500 mM Mes, pH 6; 2 mM K^+) dazugegeben, so dass für die Zellen (bis zu diesem Zeitpunkt: pH 7, ohne Kalium) plötzlich folgende Bedingungen vorlagen: pH 6 und 1 mM K^+ . Sofort und 5 min nach Zugabe wurden in Zusammenarbeit mit MARKUS BECKER das cytoplasmatische Volumen (nur für WT), der interne pH und die Kaliumaufnahme anhand der Abnahme der externen K^+ Konzentration bestimmt. Das cytoplasmatische Volumen war in Zellen, die ohne Kalium gewachsen waren, stark erniedrigt. Unmittelbar nach dem pH-Schock lag das spezifische Volumen des Wildtyps bei 1,37 ($\pm 0,12$), 5 min danach bei 1,46 ($\pm 0,02$) μ l/ mg*TG. Zellen, die in normalem MMI-Medium gewachsen waren, und bei pH 6 mit Kalium resuspendiert worden waren, zeigten ein spezifisches Volumen von ca. 2 μ l/ mg*TG. Die Kenntnis

des richtigen cytoplasmatischen Volumens ist für die Bestimmung von ΔpH und $\Delta\psi$ nötig. In diesem Versuch wurden alle Stämme ohne Kalium kultiviert. Daher wurde für alle Stämme dasselbe cytoplasmatische Volumen angenommen. Mit 1,37 und 1,46 $\mu\text{l}/\text{mg}\cdot\text{TG}$ variierte das Volumen des Wildtyps innerhalb des Messzeitraums von 5 min nicht wesentlich. Dies wurde für die anderen Stämme ebenso erwartet. Um die internen Parameter aller Stämme bestimmen und vergleichen zu können, wurde in diesem Versuch daher für alle Stämme und jeden Zeitpunkt ein spezifisches Volumen von 1,4 $\mu\text{l}/\text{mg}\cdot\text{TG}$ angenommen.

Die Abbildung 3.26 zeigt die Kaliumaufnahme und die Entwicklung des internen pH-Wertes. Für den Wildtyp und die Kup Mutante wurde im Messzeitraum eine Netto K^+ Akkumulation von ca. 250 $\text{nmol}/\text{mg}\cdot\text{TG}$ bestimmt. Dagegen konnten die CgIK Einzelmutante und die Doppelmutante kein Kalium akkumulieren. In den Stämmen, welche Kalium akkumulieren konnten, stieg der interne pH im Messzeitraum um ca. 0,2 Einheiten auf 6,4 bis 6,45. In den Mutanten ohne CgIK stieg der interne pH im selben Zeitraum nur um etwa 0,1 Einheiten auf 6,2 bzw. 6,25. Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Kaliumakkumulation und der Entwicklung des internen pH-Wertes hin.

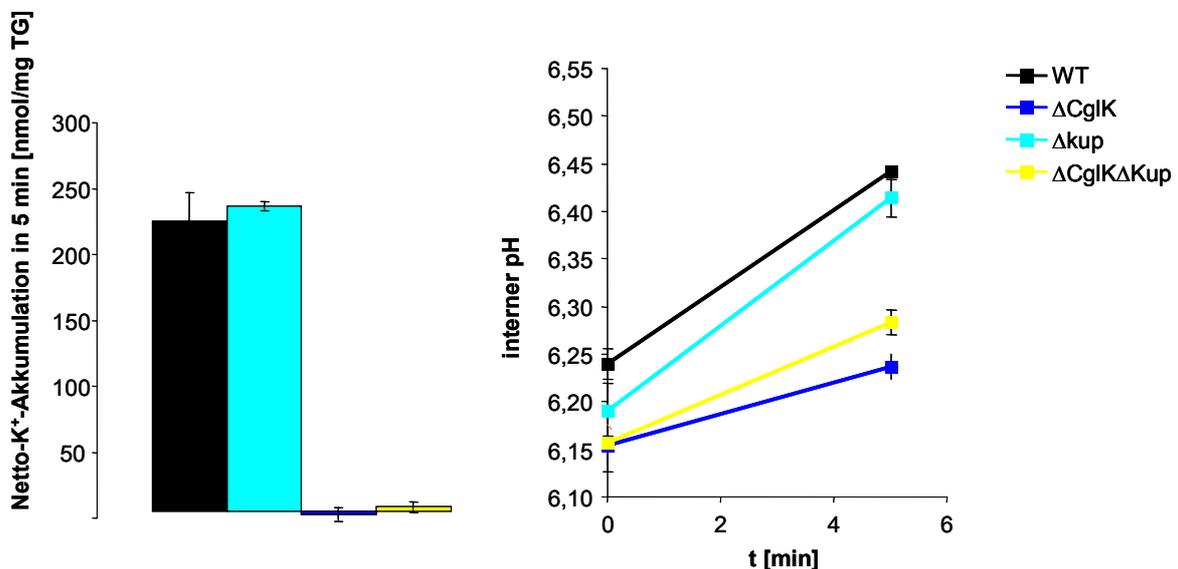


Abb. 3.26: Die K^+ -Akkumulation und die Entwicklung des internen pH-Wertes bei pH 6 und 1 mM K^+ .

Um die K^+ abhängige pH-Homöostase nun genauer zu beobachten, wurde im Weiteren eine Methode in unserer Arbeitsgruppe etabliert, welche die *online*-Erfassung der internen pH-Entwicklung erlaubt: nämlich die Bestimmung des

intrazellulären pH-Wertes mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF (JAKOB *et al.*, 2007). Um den Verlauf des cytoplasmatischen pH-Wertes zu verfolgen, wurden nun die einzelnen Stämme in exponentieller Phase mit BCECF beladen und bei pH 5,5 in Abwesenheit von K^+ resuspendiert. Die internen pH-Werte wurden mittels BCECF ca. 1 min lang gemessen. Hier fiel auf, dass die Stämme mit CgIK auch ohne K^+ Zugabe einen höheren internen pH aufwiesen als die Stämme ohne CgIK. Nach 1 min wurde KCl (150 mM Endkonzentration) zu den Zellen gegeben. Während die Stämme mit funktionierenden CgIK das K^+ nutzen konnten, um den internen pH innerhalb von ca. 1 min um 0,2 Einheiten anzuheben, waren die Stämme ohne CgIK dazu nicht in der Lage (Abb. 3.27).

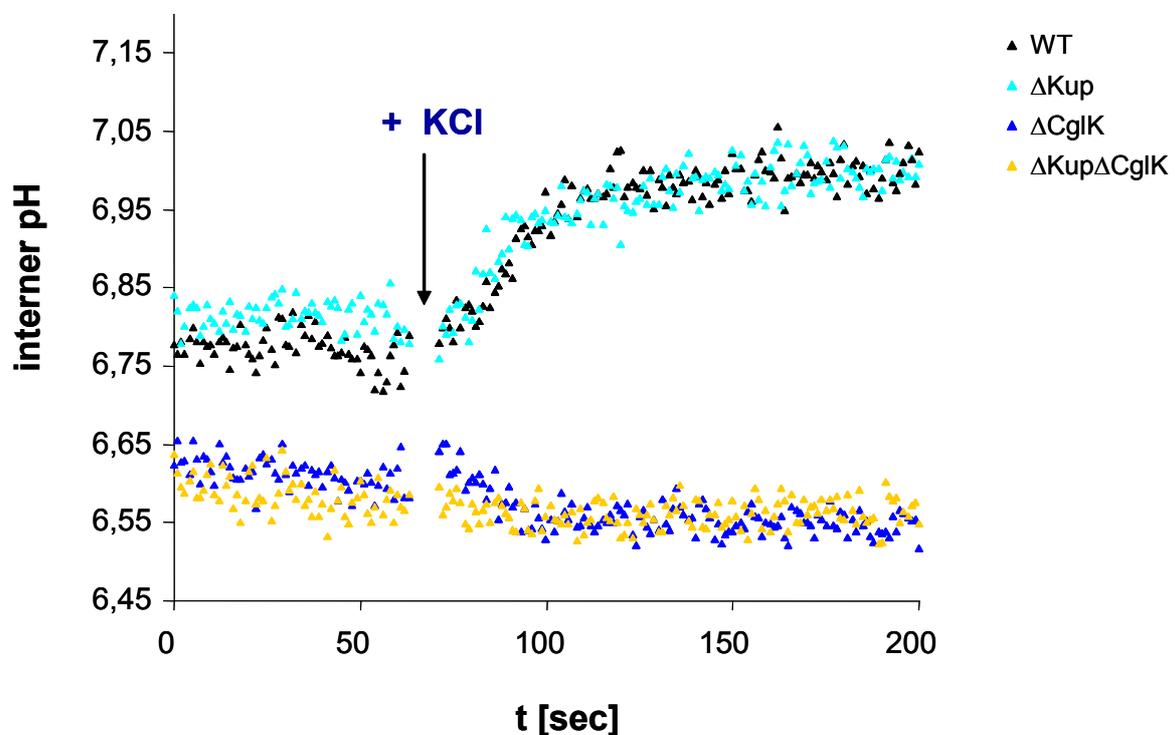


Abb. 3.27: Die Entwicklung der internen pH-Werte in den angegebenen Stämmen bei pH 5,5 vor und nach Zugabe von KCl zu einer Endkonzentration von 150 mM. Die Werte wurden mittels BCECF bestimmt.

2.3.3 Der Einfluss von K^+ auf den internen pH-Wert, das Membranpotential und die protonenmotorische Kraft

Die K^+ Abhängigkeit der pH-Homöostase bei sauren Bedingungen wurde bereits für einige Bakterien beschrieben. Der zugrunde liegende Mechanismus hierfür ist allerdings bislang unverstanden. Um Einblick in die Energetik dieses Vorgangs zu bekommen, wurden die Versuche zur pH-Homöostase mit Wildtyp-Zellen durchgeführt, bei denen gleichzeitig die Werte für das Membranpotential und die PMK bestimmt wurden. Die Abbildung 3.28 zeigt den pH-Gradienten, das Membranpotential und die aus beiden Werten resultierende PMK in mV bei einem externen pH-Wert von 6 und unterschiedlichen K^+ Konzentrationen. Außerdem ist zur besseren Übersichtlichkeit auch der gemessene interne pH-Wert angegeben.

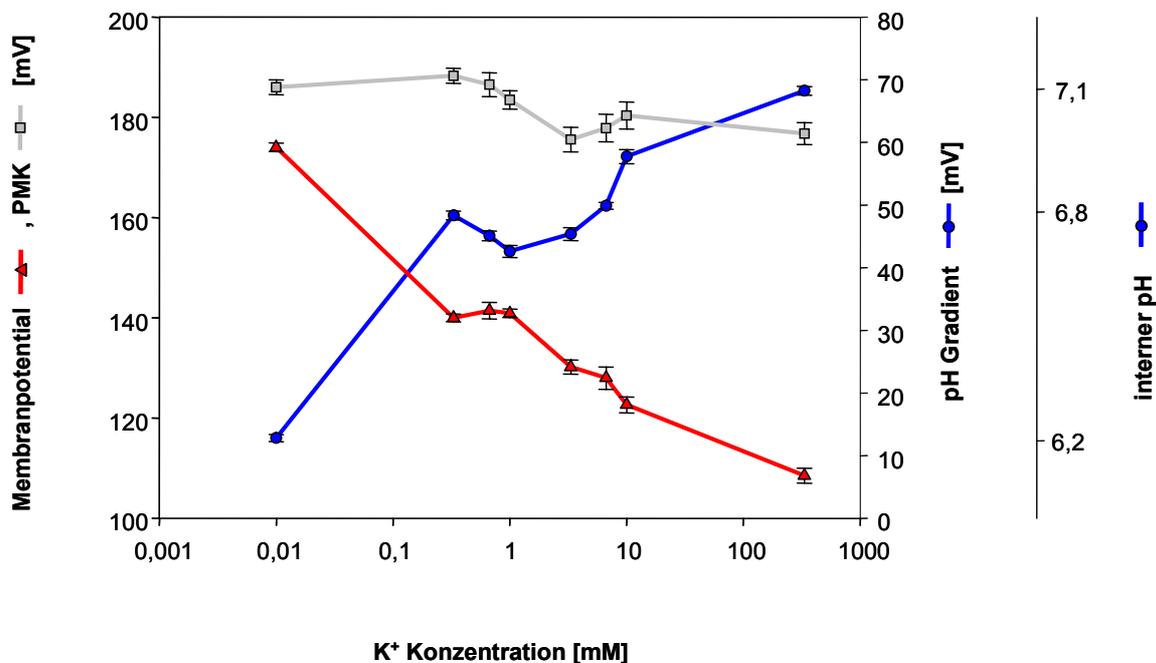


Abb. 3.28: Der pH-Gradient, das Membranpotential und die PMK in mV bei einem externen pH von 6 und in Anwesenheit unterschiedlicher K^+ Konzentrationen. Es sind außerdem die internen pH-Werte gezeigt. Der Versuch wurde mit Wildtyp-Zellen durchgeführt.

Ohne Kalium (ca. 10 μ M durch Verunreinigung) konnten die Zellen keinen nennenswerten pH-Gradienten aufbauen (interner pH = 6,2, $\Delta pH^*_{-61} = 12$ mV), das Membranpotential war hier sehr hoch und lag bei 180 mV. In diesem Versuch genügte aber schon eine K^+ -Konzentration von 0,33 mM, um das Membranpotential auf ca. 140 mV zu senken und um einen pH-Gradienten von 0,79 (interner pH = 6,79, $\Delta pH^*_{-61} = 48$ mV) aufzubauen, wobei die Werte für die PMK in beiden Fällen

konstant blieben. Mit höher werdender K^+ Konzentration stieg der pH Gradient weiter an und das Membranpotential sank weiter ab. Die PMK blieb aber stets stabil. Diese Beobachtung wurde auch in pH-Homöostase Versuchen mit der CgIK Mutante gemacht: Bei für den Wildtyp ausreichender K^+ Konzentration von 50 mM konnte diese Mutante bei einem externen pH von 6 nur einen geringen pH-Gradienten aufbauen ($pH_i = 6,5$), das Membranpotential war entsprechend erhöht und die PMK stabil.

2.4 Analyse des Transkriptoms und des Proteoms nach pH-Variation

Um Hinweise auf weitere, bisher nicht untersuchte Komponenten der pH-Homöostase zu erhalten, wurden eine Transkriptom- und eine Proteomanalyse durchgeführt. Hierfür wurden Wildtyp-Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 6, pH 7,5 und pH 9) im Bioreaktor kultiviert. In der exponentiellen Phase wurden zum einen bioenergetische Parameter der Zellen bestimmt (Daten nicht gezeigt) und zum anderen Proben zur Analyse des Transkriptoms und des Proteoms genommen. Zur Validierung der Ergebnisse dienten je zwei voneinander unabhängige biologische Replikate, die gemeinsam ausgewertet wurden. Die Transkriptomanalyse wurde an der Universität Bielefeld durchgeführt (Methode bei HÜSER *et al.*, 2003), die Proteomanalyse an der Universität Bochum (Methode bei SCHLUESENER *et al.*, 2007). Letztere schloss eine Analyse des Membranproteoms mit ein. Allerdings sind die Daten der Proteomanalyse noch vorläufig, da hier noch einige Auswertungen durchgeführt werden müssen. Daher wurden die Daten zunächst analysiert, indem bei auf Transkriptomebene signifikant induzierten Genen überprüft wurde, ob die entsprechenden Genprodukte auch im Proteom verändert vorlagen. Dabei lag das Interesse für diese Arbeit hauptsächlich in der Identifizierung von Genen, welche möglicherweise für Protonen transportierende Membranproteine kodieren und daher bei der pH-Homöostase beteiligt sein könnten.

Bei pH 6 waren im Vergleich zu pH 7,5 auf Transkriptomebene 86 Gene signifikant induziert (\log_2 Verhältnis ≥ 1), 43 der von diesen Genen kodierten Produkte wurden auf Proteomebene vermehrt gefunden (Tab. 3.1). Die induzierten Gene wurden mit jenen verglichen, welche in der kürzlich erschienenen Arbeit über die Anpassung an Stress durch Milchsäure bei pH 5,7 gefunden wurden (JAKOB *et al.*, 2007). Die Schnittmenge aus beiden Analysen besteht aus 15 Genen. Unter den in dieser Arbeit als induziert vorgefundenen Genen sind sieben, die für putative Transportproteine

III. Ergebnisse

kodieren, deren Funktion bislang nicht bekannt ist. Zudem fiel auf, dass bei pH 6 viele Gene der Methionin- und die Cysteinbiosynthese induziert waren. Bei pH 6 wurden im Vergleich zu pH 7,5 96 Gene als reprimiert vorgefunden (siehe Anhang).

Bei pH 9 waren im Vergleich zu pH 7,5 auf Transkriptomebene 42 Gene induziert, von denen 19 auch auf der Ebene des Proteoms aufgefallen waren (Tab. 3.2). Dabei fielen vier ABC-Transporter auf, von denen zwei auf Transkriptomebene signifikant induziert waren und zwei auf Proteomebene deutlich vermehrt gefunden wurden. Daneben fiel vor allem die Succinat-Dehydrogenase auf, deren Gene bei pH 9 signifikant induziert und bei pH 6 signifikant reprimiert waren. Zudem wurden die Peptide der Succinat-Dehydrogenase bei pH 9 vermehrt gefunden. Bei pH 9 wurden im Vergleich zu pH 7,5 39 Gene als reprimiert vorgefunden (Anhang).

Von sämtlichen bisher in dieser Arbeit untersuchten Komponenten fielen nur zwei bei dieser Analyse auf. Zum einen war das Gen für die Histidinkinase des zehnten Zwei-Komponenten-Systems bei pH 6 induziert. Außerdem war ein Gen für eine Komponente des CpaA Antiporters bei pH 6 induziert.

Tab. 3.1: Bei pH 6 induzierte Gene. Ein Gen galt als induziert, wenn das Log₂ Verhältnis von pH 6 zu pH 7,5 ≥ 1 war. Dargestellt ist außerdem, ob die Genprodukte auch im Proteom und die Gene auch bei der Analyse der Anpassung an Stress durch Milchsäure aufgefallen waren. Gene, die für putative Transporter bislang unbekannter Funktion kodieren, sind hervorgehoben. Vermutete Operons sind durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

Cg-Nr.	Operon	Name	Funktion	Faktor	Proteom?	Lactat-Anpassung?
cg0012		<i>ssuR</i>	Transcriptional activator of sulfonate(ester) utilization, ROK-family	1,45	ja	
cg0325		<i>mnhC</i>	Putative secondary Na ⁺ /H ⁺ antiporter, monovalent cation:proton antiporter-3 (CPA3) family	1,04		
cg0360			Conserved hypothetical protein	1,35		ja
cg0403	a	<i>rmlB1</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	1,04		
cg0404	a		Conserved hypothetical protein, nitroreductase-family	1,77	ja	ja
cg0550			Putative peptidase E	1,1		
cg0736	b	<i>metN</i>	ABC-type methionine transporter, ATPase subunit (TC 3.A.1.24.1)	1,45	ja	
cg0737	b	<i>metQ</i>	ABC-type methionine transporter, substrate-binding lipoprotein (TC 3.A.1.24.1)	1,85	ja	
cg0754	c	<i>metX</i>	Homoserine O-acetyltransferase	1,19	ja	
cg0755	c	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserine sulfhydrylase	2,43	ja	
cg0874			Conserved hypothetical protein	1,03		
cg0878		<i>whcE</i>	Transcriptional regulator, WhiB-family	1,26		ja
cg1081	d		ABC-type putative daunorubicin transporter, ATPase subunit	1,18		ja
cg1082	d		Putative membrane protein	1,33		ja
cg1083	d	<i>cgtS10</i>	Two-component system, sensory histidine kinase	1,38		ja

III. Ergebnisse

cg1129		<i>aroF</i>	Putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	1,44		
cg1150			Putative NADPH-dependent FMN reductase	1,02	ja	
cg1202			Conserved hypothetical protein	1,23		ja
cg1214			Putative cysteine desulfurase, AT class IV	1,3	ja	
cg1215	e	<i>nadC</i>	Putative nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	1,3	ja	
cg1216	e	<i>nadA</i>	Quinolinate synthetase, subunit A	1,77		
cg1218	e		ADP-ribose pyrophosphatase	1,58		
cg1256		<i>dapD</i>	2,3,4,5-Tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	1,25	ja	
cg1291			Putative membrane protein	2,43	ja	
cg1322			Conserved hypothetical protein	1,24	ja	
cg1337		<i>hom</i>	Homoserine dehydrogenase	1,68	ja	
cg1344		<i>narG</i>	Respiratory nitrate reductase 2, alpha chain	1,36		
cg1478			Hypothetical protein	4,89		
cg1580	f	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	1,65	ja	
cg1581	f	<i>argJ</i>	Glutamate N-acetyltransferase	2,03		
cg1582	f	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	1,84	ja	
cg1583	f	<i>argD</i>	Acetylornithine aminotransferase, AT class II	1,66		
cg1584	f	<i>argF</i>	Ornithine carbamoyltransferase	1,75		
cg1586	f	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	1,16		
cg1626	g		Conserved hypothetical protein	2,12		ja
cg1628	g		Putative hydrolase, alpha/beta superfamily	2,25	ja	ja
cg1647			ABC-type multidrug transport system, permease subunit	1,06		
cg1701		<i>methH</i>	Methionine synthase	2,22	ja	
cg1739			Conserved hypothetical protein, containing a glutamine amidotransferase domain	1,36		
cg1806		<i>metK</i>	Methionine adenosyltransferase	1,29		
cg1940			Putative secreted protein	1,18		
cg2051			Hypothetical protein	1,25		
cg2157		<i>terC</i>	Putative integral membrane export protein, tellurium resistance	1,05		
cg2250			Putative secreted protein	1,16	ja	
cg2260		<i>glnK</i>	Nitrogen regulatory protein PII	1,13		
cg2338		<i>dnaE1</i>	DNA-directed DNA polymerase, polymerase III, alpha chain	1,12		
cg2462			Putative transcriptional regulator, TetR-family	1,12		
cg2472			Putative hydrolase or acyltransferase	1,14		
cg2576			DNA-directed DNA polymerase, polymerase III delta subunit	1,17		
cg2590			Putative xanthine/uracil symporter, nucleobase:cation symporter-2 (NCS2) family	1,87		
cg2591		<i>dkgA</i>	Putative 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	1,72	ja	ja
cg2674	h		Alkylhydroperoxidase, AhpD-family core domain	1,08	ja	
cg2675	h		ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, ATPase subunit	1,7	ja	
cg2677	h		ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, permease	2	ja	ja

III. Ergebnisse

			subunit			
cg2678	h		ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein	1,9	ja	
cg2687		<i>metB</i>	Cystathionine gamma-synthase	1,34	ja	
cg2748			Conserved putative membrane protein	1,21	ja	
cg2761			Metal-dependent hydrolase of the beta-lactamase superfamily III	1,05		
cg2766			Putative transcriptional regulator, MarR-family	1,2	ja	
cg2796	i		Conserved hypothetical protein, MMGE/PRPD-family, putative involved in propionate catabolism	2,79	ja	ja
cg2797	i		Conserved hypothetical protein	2,92	ja	ja
cg2834		<i>cysE</i>	Serine O-acetyltransferase	1,48	ja	
cg2835			Putative acetyltransferase	1,52	ja	
cg2890	j		Hypothetical protein, putative amino acid processing enzyme	2,18		
cg2891	j	<i>pqo</i>	Pyruvate:quinone oxidoreductase	2,02	ja	ja
cg3049		<i>fpr1</i>	Ferredoxin--NADP(+) reductase	1,26		
cg3082	k		Putative transcriptional regulator, ArsR-family	3,34		
cg3083	k		Putative secondary Co²⁺/Zn²⁺/Cd²⁺ efflux transporter, cation diffusion facilitator (CDF) family	3,42	ja	
cg3084	k		Putative flavoprotein involved in K⁺ transport	3,14	ja	
cg3085	k		Putative monooxygenase	1,47		
cg3112	l	cysZ	Sulfate transporter	4,03	ja	
cg3113	l	<i>cysY</i>	Sirohydrochlorin ferrochelataze	3,31		
cg3114	l	<i>cysN</i>	Sulfate adenyltransferase subunit 1	3,42	ja	
cg3115	l	<i>cysD</i>	Sulfate adenyltransferase subunit 2	3,27	ja	
cg3116	l	<i>cysH</i>	Adenosine phosphosulfate reductase	2,98		
cg3117	eb	<i>cysX</i>	Ferredoxin-like protein, involved in electron-transfer	3,5		
cg3118	eb	<i>cysI</i>	Ferredoxin-sulfite reductase	3,5	ja	
cg3119		<i>fpr2</i>	Ferredoxin--NADP(+) reductase	2,99	ja	
cg3157			Putative secreted protein	1,54	ja	ja
cg3215		<i>glpQ1</i>	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	1,02		
cg3219		<i>ldh</i>	L-Lactate dehydrogenase	1,83	ja	
cg3227		<i>lldD</i>	Quinone dependent L-lactate dehydrogenase	1,14	ja	
cg3236		<i>msrA</i>	Protein-methionine-S-oxide reductase	1,27		
cg3372	m		Conserved hypothetical protein	2,8	ja	
cg3374	m		Putative NADH-dependent flavin oxidoreductase	2,48		
cg3375	m		Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	1,61	ja	

III. Ergebnisse

Tab. 3.2: Bei pH 9 induzierte Gene. Ein Gen galt als induziert, wenn das Log₂ Verhältnis von pH 9 zu pH 7,5 ≥ 1 war. Dargestellt ist außerdem, ob die Genprodukte auch im Proteom aufgefallen waren. Gene, die für putative Transporter bislang unbekannter Funktion kodieren, sind hervorgehoben. Vermutete Operons sind durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

Cg-Nr.	Operon	Name	Funktion	Faktor	Proteom?
cg0077	de		Conserved hypothetical protein	1,04	
cg0105	s		Hypothetical protein	1,65	
cg0310		<i>katA</i>	Catalase	1,73	ja
cg0444		<i>ramB</i>	Putative transcriptional regulator, HTH_3-family	1,11	ja
cg0445	ba	<i>sdhCD</i>	Succinate dehydrogenase, subunit CD	1,31	ja
cg0446	ba	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase, subunit A	1,47	ja
cg0447	ba	<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase, subunit B	1,14	ja
cg0448	ba		Conserved putative membrane protein	1,18	
cg0778			ABC-type putative iron-siderophore transporter, permease subunit	1,07	
cg0825			Putative short chain dehydrogenase, N-terminal fragment	1,07	ja
cg0858			Putative secreted protein	1,22	
cg1095			Hypothetical protein	1,28	
cg1136			Conserved hypothetical protein	1,02	ja
cg1206			Conserved hypothetical protein	1,05	
cg1292	bb		Flavin-containing monooxygenase 3	3,87	ja
cg1293	bb		Putative secreted protein	1,71	
cg1312			Putative membrane protein	1,32	ja
cg1344	ea	<i>narG</i>	Respiratory nitrate reductase 2, alpha chain	1,94	
cg1345	ea	<i>narK</i>	Putative nitrate/nitrite permease, MFS-type	1,66	ja
cg1695			Conserved hypothetical protein, probably HTH-type transcriptional regulator	1,72	
cg1737		<i>acn</i>	Aconitate hydratase	1,66	
cg1759			Putative metal-sulfur cluster biosynthetic enzyme	1,34	
cg1761	bc	<i>sufS</i>	cysteine desulfurase	1,47	ja
cg1762	bc	<i>sufC</i>	FeS cluster assembly ATPase, SufC-family	1,51	ja
cg1764	bc	<i>sufB</i>	FeS cluster assembly protein, SufB-family	1,81	ja
cg1765	bc	<i>sufR</i>	Transcriptional repressor of suf operon	1,53	
cg1790		<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase	1,07	
cg1884			Putative membrane protein	1,12	
cg1904			ABC-type transporter, permease subunit	1,12	ja
cg2191			Conserved hypothetical protein	1,02	
cg2274	bd		Putative metal-binding, possibly nucleic acid-binding protein	1,15	ja
cg2275	bd		Putative F0/F1-type ATP synthase b subunit	1,03	
cg2320			Putative transcriptional regulator, ArsR-family	1,25	
cg2572			Conserved hypothetical protein	1,44	
cg2636		<i>catA</i>	Catechol 1,2-dioxygenase	3,09	ja

III. Ergebnisse

<i>cg2736</i>		<i>bcp</i>	Putative bacterioferritin comigratory oxidoreductase	1,12	
<i>cg2782</i>		<i>ftn</i>	Ferritin-like protein	1,29	ja
<i>cg2853</i>			Conserved hypothetical protein, putative pseudogene	1,4	ja
<i>cg3117</i>	eb	<i>cysX</i>	Ferredoxin-like protein, involved in electron-transfer	1,08	
<i>cg3118</i>	eb	<i>cysI</i>	Ferredoxin-sulfite reductase	1,06	
<i>cg3236</i>		<i>msrA</i>	Protein-methionine-S-oxide reductase	1,01	
<i>cg3331</i>		<i>ogt</i>	Methylated-DNA--[protein]-cysteine S-methyltransferase	1,34	ja
<i>cg3281</i>			Cation transport ATPase	nein	ja
<i>cg0569</i>			Cation transport ATPase	nein	ja

IV. Diskussion

Während der industriellen Lysinproduktion sind die Zellen des Produktionsstamms pH-Schwankungen und erhöhten CO₂ Konzentrationen ausgesetzt. Bislang liegen jedoch keine ausreichenden Kenntnisse zu den Auswirkungen dieser Stressfaktoren auf die Zellen und deren Anpassungsmechanismen vor. Die vorliegende Arbeit unterteilte sich in zwei miteinander verbundene Projekte. Im ersten Projekt wurde der Einfluss dieser Stressfaktoren auf physiologischer Ebene und hinsichtlich der Lysinbildung analysiert. Hierfür wurden zunächst die notwendigen Vorrichtungen und Methoden zur produktionsnahen Applikation dieser Stresssituationen und zur zuverlässigen Bestimmung der wichtigen bioenergetischen Parameter in der Arbeitsgruppe etabliert. Diese Vorbereitungen umfassten u. a. die Etablierung eines Mikrotiterplatten Testsystems zur Analyse von pH-Variation, die Begasung des Bioreaktors zur CO₂ Stress Applikation sowie die Messungen des Zellvolumens, des internen pH-Wertes, des Membranpotentials als auch die Bestimmung der internen Adeninnukleotide und der Nicotinamid Cofaktoren in wachsenden Zellen aus dem Fermenter. Diese Analyse zeigte die besondere Bedeutung der internen pH-Homöostase sowohl bei pH-Variation als auch bei erhöhten CO₂ Konzentrationen. Daher wurden im zweiten Projekt wichtige Komponenten der pH-Homöostase identifiziert und charakterisiert.

1. Analyse von pH-Variation und erhöhter CO₂ Konzentration

1.1 *C. glutamicum* ist moderat alkali-tolerant und zeigt sehr effektive PMK-Homöostase und weniger effektive pH-Homöostase

Sowohl der cytoplasmatische Soll-pH-Wert als auch die Fähigkeit zur pH-Homöostase variieren bei unterschiedlichen Bakterien (BOOTH, 1985). So liegt der angesteuerte interne pH-Wert azidophiler Bakterien meist zwischen pH 6,5 und 7,0, der von neutrophilen Bakterien zwischen pH 7,5 und 8,0 und jener von alkalophilen Bakterien zwischen pH 8,4 und 9,0, wobei es hier auch Ausnahmen gibt. Die Analyse der pH-Homöostase zeigte, dass *C. glutamicum* einen cytoplasmatischen pH-Wert von 7,5 anstrebt und in der Lage ist, bei externen pH-Werten zwischen pH 6 und 9,5 den internen pH-Wert zwischen pH 7 und 8,3 zu halten (Abb. 3.1). Dieser Bereich wurde für *C. glutamicum* als der Bereich der effektiven pH-Homöostase definiert, da

die Homöostase bei niedrigeren und höheren externen pH-Werten deutlich schlechter gelingt. Im Vergleich zu vielen anderen Bakterien ist diese pH-Homöostase gegenüber niedrigem pH aber relativ ineffektiv. *E. coli* ist beispielsweise in der Lage, den cytoplasmatischen pH-Wert bis zu einem externen pH-Wert von 5,0 bei 7,4 zu halten (SLONCZEWSKI und FOSTER, 1996).

Unabhängig vom externen pH-Wert müssen Bakterien stets eine ausreichend hohe protonenmotorische Kraft (PMK) zur Regenerierung von ATP aufrechterhalten. In neutrophilen Bakterien setzt sich diese für gewöhnlich aus einem relativ großen elektrischen Potential (innen negativ) und einem relativ geringen einwärts gerichteten pH-Gradienten zusammen, während alkalophile Bakterien ein noch deutlich höheres elektrisches Potential zum Ausgleich für einen auswärts gerichteten pH-Gradienten aufweisen. Azidophile Bakterien hingegen zeigen bei sauren Bedingungen einen sehr großen einwärts gerichteten pH-Gradienten und ein innen positives Membranpotential (SKULACHEV, 1994). Die PMK-Messungen haben gezeigt, dass sich die PMK in *C. glutamicum* wie auch in anderen neutrophilen Bakterien bei neutralen Bedingungen aus einem relativ großen elektrischen Potential und einem geringen pH-Gradienten zusammensetzt. So wurde bei pH 7 ein Membranpotential ($\Delta\Psi$) von ca. 170 mV und ein pH-Gradient von 30 mV bestimmt, wodurch sich eine PMK von ca. 200 mV ergibt. Ähnliche Werte für die PMK wurden bei pH 7 auch in anderen neutrophilen Bakterien bestimmt, z.B. in *Staphylococcus aureus* (162 mV für $\Delta\Psi$ und 32 mV für $\Delta\text{pH} = 194$ mV für die PMK) oder in *E. coli* (168 mV für $\Delta\Psi$ und 48 mV für $\Delta\text{pH} = 216$ mV für die PMK), wobei diese Werte bei unterschiedlichen Messmethoden und Kultivierungsbedingungen variieren können (KASHKET, 1985 und MEYER-ROSBURG *et al.*, 1996). Weiter zeigten die Messungen, dass *C. glutamicum* durch Anpassung des Membranpotentials die PMK über einen weiten pH-Bereich stabil hält. Zwischen pH 4,5 und pH 10 wurden für die PMK Werte von mindestens 170 mV gemessen. Dabei steigt das Membranpotential von 113 mV bei pH 4,5 auf 240 mV bei pH 10 (Abb. 3.2).

Die Messungen der cytoplasmatischen Konzentrationen an ATP, ADP, AMP und an NAD, NADH, NADP und NADPH in wachsenden Zellen aus dem Fermenter zeigten, dass moderate pH-Variationen zwischen pH 6 und 8,5 keinen Einfluss auf die Energieladung und den Redox-Status haben (Abb. 3.6 und 3.7). Diese Parameter sind möglicherweise deshalb nicht beeinträchtigt, weil *C. glutamicum* in diesem Bereich stabile Werte für die PMK und relativ neutrale interne pH-Werte

aufrechterhält. Hinweise über den Einfluss von pH-Variation auf die Energieladung und den Redox-Status in wachsenden Zellen anderer Bakterien wurden in der Literatur nicht gefunden.

Traditionell wird *C. glutamicum* sowohl in der Laborroutine als auch bei der Aminosäureproduktion bei neutralem pH-Wert kultiviert (KINOSHITA und TANAKA, 1972). Die Kultivierungen des Wildtyps in Mikrotiterplatten bei unterschiedlichen pH-Werten ergaben jedoch eine pH-Optimumskurve mit den höchsten Raten bei leicht alkalischen pH-Werten zwischen pH 8 und 8,5. Allerdings beschreibt diese Optimumskurve nicht unbedingt das tatsächliche Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* in Abhängigkeit vom pH-Wert, da die Zellen bei diesen Kultivierungen weiteren vom pH-Wert unabhängigen Einflüssen ausgesetzt sind. So schien die erhöhte Osmolarität durch die Puffersubstanzen zwar keinen wesentlichen Einfluss zu haben, da das Wachstum in ungepuffertem Medium bei einem anfangs eingestellten pH von 7 und 8 mit dem in gepufferten Medien bei denselben pH-Werten vergleichbar war. Ein Einfluss der Puffersubstanzen, gerade bei den extremeren pH-Werten, lässt sich jedoch nicht ausschließen. Zudem sind die Zellen in Mikrotiterplatten ab einer bestimmten Zelldichte vermutlich der Sauerstofflimitierung ausgesetzt. Hierfür spricht, dass das Wachstum in Mikrotiterplatten in normalem MMI-Medium innerhalb der ersten 6 bis 8 Stunden mit dem in Schüttelkolben vergleichbar ist, ab einer OD_{600} von 3 bis 4 aber stoppt, während das Wachstum im Schüttelkolben im selben Medium anhält und eine End- OD_{600} von 20 bis 30 erreicht wird. Zudem enthalten die Medien aus Mikrotiterplatten nach 24stündiger Kultivierung noch ca. 70 % der anfangs eingesetzten Glukose, während diese bei der Kultivierung im Schüttelkolben vollständig aufgebraucht wird (Daten nicht gezeigt). Das Mikrotiterplatten Testsystem eignet sich daher sehr gut zur Applikation vieler unterschiedlicher Bedingungen für verschiedene Mutanten (da alle Stämme denselben Bedingungen ausgesetzt sind), jedoch nicht uneingeschränkt zur Charakterisierung des allgemeinen Wachstumsverhaltens. Dennoch stimmen die gemessenen Wachstumsraten gut mit der Fähigkeit zur pH-Homöostase in *C. glutamicum* überein. Die Wachstumsraten sind im Bereich der effektiven pH-Homöostase am höchsten und fallen mit schlechter funktionierender pH-Homöostase ab (Abb. 3.2). Zudem wird die Beobachtung des schnellsten Wachstums bei leicht alkalischen pH-Werten durch zwei kürzlich erschienene Veröffentlichungen unterstützt. In einer Arbeit wurde eine Microarray-Analyse der Anpassung von

C. glutamicum an Stress durch Milchsäure durchgeführt und in Vorversuchen das Wachstumsverhalten bei verschiedenen pH-Werten getestet. Hierbei zeigte sich, dass *C. glutamicum* in Komplexmedium mit voreingestelltem pH durch Zugabe von Milchsäure bei pH 8,5 sowohl das schnellste Wachstum als auch die höchste Biomasse-Ausbeute erreicht (JAKOB *et al.*, 2007). In einer anderen Arbeit wurde die Transkription des F_1F_0 -ATPase Operons in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* im Fermenter unter pH-Kontrolle bei pH 6, pH 7, pH 9 und pH 9,5 kultiviert. Erstaunlicherweise wurden bei pH 7 und bei pH 9 identische Wachstumsraten und die höchste Biomasse-Ausbeute bei pH 9 erreicht, woraufhin die Autoren vorschlugen, *C. glutamicum* von nun an als moderat alkali-toleranten Organismus einzuordnen (BARRIUSO-IGLESIAS *et al.*, 2006). Obwohl die Beobachtung des besten Wachstums bei pH 9 bei den Kultivierungen in der vorliegenden Arbeit (sowohl im Fermenter unter strikter pH-Kontrolle als auch im Schüttelkolben und in Mikrotiterplatten unter Verwendung von Puffersubstanzen) nicht bestätigt wurde, deuten die oben beschriebenen Daten zum Wachstum und zur pH-Homöostase dennoch ebenfalls darauf hin, dass das pH-Optimum für *C. glutamicum* bei leicht alkalischem pH-Wert liegt. Zudem legen die Daten nahe, dass in *C. glutamicum* das Wachstum bei extremen pH-Werten durch die eingeschränkte Fähigkeit zur pH-Homöostase und nicht durch eine limitierte PMK-Homöostase begrenzt wird, da letztere ja über einen sehr weiten pH-Bereich stabil ist. Das gilt nicht für alle Bakterien. *Helicobacter pylori* beispielsweise überlebt zwischen pH 4 und pH 8 und hält in diesem Bereich eine konstante PMK von 220 mV aufrecht. Bei tieferen und höheren pH-Werten bricht die PMK-Homöostase irreversibel zusammen. Daraus wurde gefolgert, dass *H. pylori* eine pH-Variation in Abhängigkeit von der Fähigkeit zur PMK-Homöostase überlebt (MEYER-ROSBURG, 1996).

1.2 In *C. glutamicum* sind die Mechanismen der pH-Homöostase bei gleichzeitig niedrigem pH und erhöhter CO₂ Konzentration überfordert

Um den Einfluss von CO₂ zu untersuchen, wurden bei pH 7 sowohl mit dem Stamm DM1868 als auch mit DM1946 Kultivierungen mit unterschiedlichen CO₂ Konzentrationen in der Zuluft durchgeführt. Dabei wurde selbst bei Begasung mit

20 % CO₂ – was gegenüber der Begasung mit Luft einer 500fachen Steigerung der CO₂ Konzentration entspricht – bei DM1868 kein Einfluss auf das Wachstum und kein Einfluss auf die internen Konzentrationen an ATP, ADP und AMP sowie an NAD, NADH, NADP und NADPH festgestellt. Auch bei dem Stamm DM1946 wurde nur ein geringer Effekt beobachtet: Die mit 20 % CO₂ begasten Zellen traten zwar etwas verzögert in die exponentielle Wachstumsphase ein. Die Wachstumsrate, die Biomasse-Ausbeute, der interne pH-Wert, das Membranpotential und die PMK waren aber nicht beeinflusst. Da für CO₂ Konzentrationen von 20 % bisher überwiegend wachstumshemmende Effekte beschrieben wurden (DIXON und KELL, 1988), bestätigen diese Beobachtungen die Einschätzung von BÄUMCHEN und Kollegen, dass sich *C. glutamicum* bei neutralem pH ausgesprochen unempfindlich gegenüber erhöhter CO₂ Konzentration zeigt (BÄUMCHEN *et al.*, 2007). Dies mag ein weiterer Grund für die besondere Eignung dieses Bakteriums zur industriellen Aminosäureproduktion sein, bei der hohe CO₂ Konzentrationen auftreten.

Die Fermentationen mit dem Stamm DM1946 bei pH 6 zeigten jedoch einen drastischen Einfluss von CO₂ auf das Wachstum, auf die protonenmotorische Kraft und folglich auch auf die Lysinbildung. In anschließenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich eine Erhöhung der CO₂ Konzentration unmittelbar auf den cytoplasmatischen pH-Wert auswirkt. Es wurden keine Hinweise in der Literatur dafür gefunden, dass dieser direkte Zusammenhang schon gezeigt wurde. Für diesen Effekt wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: Vermutlich diffundiert das lipidlösliche CO₂ in das Cytoplasma und senkt dort unter Bildung von Kohlensäure, welche anschließend in HCO₃⁻ + H⁺ dissoziiert, den pH-Wert. Dieser Effekt tritt zwar sowohl bei neutralem als auch bei niedrigem pH auf, ist bei pH 7 aber deutlich schwächer als bei pH 6. Dies liegt vermutlich daran, dass die cytoplasmatische Pufferkapazität bei einem internen Soll-pH-Wert von 7,5 (der interne pH bei einem externen pH von 7) deutlich höher ist als bei einem internen pH von 7 (bei einem externen pH von 6). Außerdem sind die Mechanismen der pH-Homöostase bei einem externen pH-Wert von 6 ohnehin sehr stark gefordert, so dass die durch CO₂ bedingte Ansäuerung des Cytoplasmas hier den pH-Stress deutlich verstärkt und die pH-Homöostase zusammenbricht. Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass erhöhte CO₂ Konzentrationen bei neutralem pH-Wert keinen, bei tiefem pH-Wert aber einen drastischen Einfluss auf das Wachstum und die Lysinproduktion haben.

1.3 Einfluss auf die Lysinbildung

Um den Einfluss von pH-Variation auf die Lysinbildung zu untersuchen, wurden mit dem Stamm DM1868 *batch*-Fermentationen durchgeführt, bei denen nach 13 Stunden Kultivierung bei pH 7 ein pH-*shift* zu pH 6, pH 8, pH 8,5 oder keine pH-Veränderung vorgenommen wurde. Dabei war die Biomassebildung nach Umstellung zu den alkalischen pH-Werten kaum verändert, nach Umstellung zu pH 6 aber verringert. Die Lysinbildung war jedoch nach *shift* zu pH 6 leicht erhöht und nach den *shifts* zu pH 8 und 8,5 erniedrigt. Dies bedeutet, dass die spezifische Produktivität – also die Aktivität der Zellen zur Lysinbildung – umso höher war, je niedriger der pH-Wert nach der pH-Veränderung war. Ebenso zeigten die Fermentationen mit dem Stamm DM1946, dass bei pH 6 die spezifische Produktivität deutlich höher war als bei pH 7, wenn auch in diesem Stamm die absolute Lysin-Endausbeute bei pH 7 höher war. Die erhöhte spezifische Lysinbildung bei niedrigem pH könnte durch die Lysinexkretion bedingt sein. Diese erfolgt über das Exportprotein LysE und findet im Symport mit zwei OH⁻ Ionen statt (BRÖER and KRÄMER, 1991). Dieser Export könnte daher bei niedrigen externen pH-Werten eher als bei alkalischen pH-Werten ablaufen. Allerdings lässt sich hieraus nicht direkt ableiten, die industrielle Lysinfermentation bei möglichst niedrigem pH durchzuführen, da industriell genutzte Lysinproduzenten möglicherweise anders als die Laborstämme auf pH-Variation reagieren. Zudem wurde der Einfluss des externen pH-Wertes auf die Lysinexkretion mit dem deutlich weiter entwickelten Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B (SCHRUMPF *et al.*, 1992) sehr genau untersucht. Danach lag das Maximum der Aktivität des Transportproteins LysE bei pH 6,5, das Maximum der spezifischen LysE Konzentration lag in dem Stamm MH20-22B aber bei pH 8. Hieraus ergab sich für die spezifische Lysinexportrate in diesem Stamm ein Maximum bei pH 7 (KELLE *et al.*, 1996).

Eine Erhöhung der CO₂ Konzentration in der Zuluft auf bis zu 20 % (v/v) zeigte bei pH 7 keinen signifikanten Einfluss auf die Lysinproduktion, weder bei dem Stamm DM1868 noch bei DM1946. Hier wurde hinsichtlich der Lysinbildung eher eine Steigerung erwartet, da eine erhöhte CO₂ Konzentration auch eine erhöhte Verfügbarkeit von HCO₃⁻ bedeutet, welches die anaplerotischen Reaktionen und damit die Lysinbildung begünstigen könnte. Möglicherweise stellt jedoch in diesen Stämmen die Synthese von Oxalacetat über die Anaplerose keine die Lysinproduktion limitierende Reaktion dar oder aber es ist nicht die Verfügbarkeit von

HCO_3^- , die diesen Schritt limitiert. Dies muss jedoch nicht für weiter entwickelte industriell genutzte Lysinproduzenten gelten, welche vermutlich einen deutlich höheren Bedarf an HCO_3^- haben. In ähnlicher Weise wurde auch schon in einer anderen Arbeit argumentiert, in welcher der Einfluss von erhöhter HCO_3^- Verfügbarkeit auf die Lysinbildung untersucht wurde (MITSUHASHI *et al.*, 2004). Diese Arbeit untersuchte in erster Linie das Vorkommen und die Bedeutung von Carboanhydrasen in *C. glutamicum*. Carboanhydrasen katalysieren die Umsetzung von CO_2 zu HCO_3^- und haben für die Zellen große Bedeutung, weil mit ihrer Hilfe ein günstiges intrazelluläres $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ Verhältnis aufrechterhalten werden kann (TASHIAN *et al.*, 2000). Die Autoren zeigten, dass *C. glutamicum* zwei Gene, *bca* und *gca*, für Carboanhydrasen besitzt. Dabei ist eine BCA Mutante nicht mehr in der Lage, unter atmosphärischen Bedingungen (0,04 % CO_2) zu wachsen, dieser Wachstumsdefekt kann jedoch durch Begasung mit 5 % CO_2 wieder aufgehoben werden. Zudem zeigten die Autoren, dass die Expression von *bca* während der Lysinproduktion, also bei erhöhtem Bedarf an HCO_3^- induziert ist. Hieraus wurde geschlossen, dass die Carboanhydrase die Lysinbildung begünstigt, indem sie durch die Umsetzung von CO_2 zu HCO_3^- die Verfügbarkeit von HCO_3^- erhöht bzw. die Diffusion von CO_2 aus der Zelle verringert. MITSUHASHI und Mitarbeiter haben daraufhin untersucht, welchen Einfluss eine Erhöhung der Carboanhydrase Aktivität auf die Lysinproduktion hat. Hierzu wurde das Gen *pca* – ein Carboanhydrase kodierendes Gen aus der Rotalge *Porphyridium purpureum* – in den Lysinproduzenten *C. glutamicum* AHD-2 (OHNISHI *et al.*, 2002) eingebracht, wodurch dieser Stamm eine signifikant erhöhte Carboanhydrase Aktivität aufwies. In *fed-batch* Fermentationen wurden nun das Wachstum und die Lysinbildung bei drei verschiedenen pH-Werten, nämlich pH 6, pH 7 und pH 7,6 untersucht. Dabei wurde ein besonders deutlicher Effekt bei niedrigem pH erwartet, da das Verhältnis von HCO_3^- zu CO_2 mit niedriger werdendem pH-Wert abnimmt und so bei niedrigem pH vermutlich mehr CO_2 die Zelle durch Diffusion verlassen kann. Es wurde jedoch bei allen Fermentationen weder auf das Wachstum noch auf die Lysinbildung ein signifikanter Einfluss der erhöhten Carboanhydrase Aktivität beobachtet. Die Autoren vermuteten, dass die Verfügbarkeit von HCO_3^- in diesem Stamm die Lysinbildung nicht limitiert und kündigten weitere Untersuchungen dieser Art mit anderen Produktionsstämmen an.

2. Identifizierung und Charakterisierung wichtiger Komponenten der pH-Stress Antwort

Die Analyse der Auswirkungen von pH-Variation und erhöhter CO₂ Konzentration zeigte die besondere Bedeutung der pH-Homöostase. Da keine veröffentlichten Daten zu den Komponenten der aktiven pH-Homöostase in *C. glutamicum* vorliegen, wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit diesem Anpassungsvorgang zugrunde liegende Mechanismen identifiziert und charakterisiert.

Hierzu wurde zunächst getestet, ob Komponenten, die in anderen Bakterien eine wichtige Funktion bei der pH-Homöostase haben, auch in *C. glutamicum* von Bedeutung sind. Dabei wurde kein Hinweis auf die Beteiligung der Urease gefunden – eine Mutante ohne Urease Aktivität (NOLDEN *et al.*, 2000) zeigte bei Kultivierungen in Mikrotiterplatten zwischen pH 4 und pH 11 keinen pH-abhängigen Wachstumsphänotyp. In *Helicobacter pylori* ist die Aktivität der Urease jedoch für die pH-Homöostase und das Überleben bei pH 1 essentiell (STINGL *et al.*, 2002). Möglicherweise hat die Urease auch in *C. glutamicum* bei der extremen Säuretoleranz eine Funktion, vermutlich aber nicht bei pH-Werten zwischen pH 4 und pH 11. Für *Listeria monocytogenes* wurde veröffentlicht, dass eine Transposonmutante, in welcher das Zwei-Komponenten-System LisRK betroffen ist, bei niedrigem pH schlechter wächst als der Wildtyp (COTTER *et al.*, 1999). *C. glutamicum* besitzt laut Annotation dreizehn Zwei-Komponenten-Systeme (KALINOWSKI *et al.*, 2003), welche bei der Wahrnehmung von pH-Variation und der Einleitung der Anpassung beteiligt sein könnten. Der Arbeitsgruppe Prof. Krämer wurden Mutanten für die Systeme Nr.1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 sowie für das MtrAB System zur Verfügung gestellt (KOCAN *et al.*, 2005). Bei Kultivierungen in Mikrotiterplatten zeigte jedoch keine der Mutanten einen deutlich pH-sensitiven Phänotyp. Eine wichtige Funktion der F₁F₀-ATPase bei niedrigem pH wurde für eine Reihe von grampositiven Bakterien beschrieben. Bei einem externen pH-Wert von 5,0 sank in *Mycobacterium smegmatis* der interne pH-Wert nach Einwirkung von DCCD – einem Inhibitor der F₁F₀-ATPase – drastisch von 6,9 auf 5,7 (RAO *et al.*, 2001), was die besondere Bedeutung der F₁F₀-ATPase in diesem Organismus zeigt. In *C. glutamicum* zeigte eine DCCD Behandlung jedoch nicht diesen deutlichen Effekt. Bei einem externen pH von 6 sank nach identischer DCCD Behandlung der interne pH-Wert um 0,2 Einheiten und stieg bei einem externen pH von 9,5 ebenfalls um 0,2 Einheiten. Vermutlich hat die F₁F₀-ATPase in *C. glutamicum* hinsichtlich der

pH-Homöostase nicht dieselbe herausragende Bedeutung wie für *Mycobacterium smegmatis*. Die vergleichsweise geringen Änderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes könnten dadurch bedingt sein, dass durch die Inaktivierung der F_1F_0 -ATPase der interne ATP-Pool und damit alle ATP-abhängigen Prozesse beeinträchtigt sind. Für einige Bakterien sind bei extrem sauren Bedingungen Aminosäure-Decarboxylase Systeme von Bedeutung (COTTER und HILL, 2003). Die Untersuchungen auf Genom- und physiologischer Ebene ergaben aber keinen Hinweis auf die Beteiligung solcher Systeme in *C. glutamicum*. Es wurde in *C. glutamicum* ebenfalls kein homologes Protein zu MdfA aus *E. coli* gefunden, welches dort eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber alkalischen pH-Werten spielt (LEWINSON *et al.*, 2004).

In einem weiteren Ansatz wurden Analysen des Transkriptom (Universität Bielefeld) und des Proteoms (Universität Bochum) von *C. glutamicum* bei pH 6, pH 7,5 und pH 9 durchgeführt. Auf Transkriptomebene waren bei pH 6 im Vergleich zu pH 7,5 86 Gene induziert; 43 der durch diese Gene kodierten Peptide wurden auch auf Proteomebene vermehrt (jedoch nicht unbedingt signifikant) gefunden. Hierbei fiel zunächst auf, dass es zwischen den bei dieser Analyse als induziert gefundenen Genen und jenen, welche in einer kürzlich erschienenen Arbeit bei der Anpassung an Stress durch Milchsäure bei pH 5,7 gefunden wurden (JAKOB *et al.*, 2007), nur eine geringe Übereinstimmung gibt. Bei der Anpassung an pH-Stress durch Milchsäure wurden 116 Gene als induziert identifiziert, von denen nur 15 auch in der Analyse der vorliegenden Arbeit aufgefallen waren. Dies liegt möglicherweise daran, dass ein Großteil dieser Gene als spezifische Antwort auf Lactat und nicht als Antwort auf die Absenkung des pH-Wertes induziert ist. In der zitierten Arbeit wurden 36 der 116 Gene ausgewählt und durch Insertionsmutagenese inaktiviert. Die 36 Mutanten wurden untersucht, indem ihr Wachstum in Mikrotiterplatten bei pH 5,7 mit dem des Wildtyps verglichen wurde. Dabei zeigte nur eine Mutante einen Wachstumsphänotyp, nämlich die SigB Mutante. Hieraus wurde zum einen geschlossen, dass das Regulatorprotein SigB, welches in einigen Bakterien bei der Anpassung an verschiedene Stresssituationen beteiligt ist, auch für die Anpassung an Milchsäure in *C. glutamicum* verantwortlich ist. Zum anderen wurde daraus gefolgert, dass die pH-Stress Antwort in *C. glutamicum* besonders komplex und redundant ist und dass die Gene, welche für die Anpassung verantwortlich sind, überlappende Funktionen haben (JAKOB *et al.*, 2007). Das Gen *sigB* lag in der

vorliegenden Arbeit bei pH 6 und bei pH 9 verstärkt exprimiert vor, jedoch in beiden Fällen nicht signifikant. Dies deutet wiederum darauf hin, dass SigB eine Funktion bei der allgemeinen Stressanpassung hat und nicht spezifisch bei sauren Bedingungen von Bedeutung ist.

Zum anderen fiel bei der Transkriptomanalyse der vorliegenden Arbeit auf, dass bei pH 6 viele Gene für die Methionin- und die Cysteinbiosynthese induziert waren. Ein hypothetischer Erklärungsansatz hierfür ist, dass die Enzyme dieser Synthesewege auf eine Absenkung des internen pH-Wertes besonders empfindlich reagieren und die Zelle an Methionin verarmt. Für *E. coli* wurde ein ähnliches Szenario veröffentlicht (ROE *et al.*, 2002): Das Wachstum von *E. coli* bei pH 6 wird durch die Anwesenheit von organischen Konservierungsstoffen wie Acetat, Benzoat oder Propionat um 50 % reduziert, weil diese in der protonierten Form membrangängigen Säuren in der Zelle akkumulieren und den cytoplasmatischen pH-Wert senken. Dieser lang bekannte Effekt konnte in der zitierten Arbeit jedoch durch Zugabe von Methionin wieder weitgehend aufgehoben werden und Mutanten mit einem erhöhten intrazellulären Methioninpool waren fast vollständig resistent gegenüber der Einwirkung von Acetat (ROE *et al.*, 2002). Die Autoren bestimmten auch die intrazellulären Konzentrationen der Intermediate der Methioninbiosynthese und maßen dabei stark erhöhte Konzentrationen an Homocystein. Hieraus wurde geschlossen, dass die Syntheseschritte ab Homocystein durch die Wirkung der schwachen Säuren inhibiert werden und der zu geringe Methioninpool der wachstumslimitierende Faktor unter diesen Bedingungen ist. Möglicherweise sind also die Methionin- und die Cysteinsynthese in *C. glutamicum* bei niedrigem internen pH-Wert inhibiert und die Zelle verarmt an diesen Aminosäuren wodurch die Gene für die Synthese induziert werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte unter anderem das Wachstum von *C. glutamicum* bei niedrigem pH-Wert mit und ohne Zugabe von Methionin bzw. Cystein getestet werden.

Bei dieser Analyse fielen außerdem sieben Gene auf, von denen drei laut Annotation für ABC Transporter (z. B. ein *ABC-type multidrug transport system*) und vier für sekundär aktive Transporter (z. B. ein *Co²⁺/Zn²⁺/Cd²⁺ efflux transporter*) kodieren. Die tatsächlichen Funktionen dieser Gene sind bislang noch nicht untersucht worden, weder in dieser Arbeitsgruppe, noch im Verlauf der Arbeit zur Anpassung an Milchsäure. Die Gene könnten durch Insertionsmutagenese inaktiviert werden und

die Mutanten hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber sauren Bedingungen getestet werden.

Bei pH 9 waren 42 Gene auf Transkriptomebene induziert, 19 der durch diese Gene kodierten Peptide erschienen auch auf Proteomebene vermehrt.

In *E. coli* wurde das F_1F_0 -ATPase Operon bei alkalischem pH als induziert identifiziert (MAURER *et al.*, 2005). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde gefunden, dass das F_1F_0 -ATPase Operon auch in *C. glutamicum* bei pH 9 induziert ist (BARRIUSO-IGLESIAS *et al.*, 2006), wohingegen dieses Operon in vielen anderen Bakterien bei niedrigem pH-Wert induziert vorliegt (z. B. KUHNERT *et al.*, 2004). Es ist bislang nicht bekannt, warum dieses Operon in verschiedenen Bakterien bei so unterschiedlichen Bedingungen induziert wird. In der Transkriptomanalyse der vorliegenden Arbeit war dieses Operon bei pH 7,5 am stärksten und bei pH 6 und pH 9 weniger stark exprimiert. In dieser Arbeit wurde bei den Fermentationen für diese Analyse bei pH 7,5 schnelleres Wachstum als bei pH 6 und bei pH 9 beobachtet. In der zitierten Arbeit von BARRIUSO-IGLESIAS und Kollegen wurde jedoch das schnellste Wachstum bei pH 9 beobachtet. Möglicherweise – und das ist auch die Vermutung der zitierten Kollegen – wird das F_1F_0 -ATPase Operon in *C. glutamicum* wachstumsratenabhängig exprimiert.

Besonders auffällig war bei pH 9 jedoch die Induktion der Gene für die Succinat-Dehydrogenase (*sdhABC*), was auch auf der Ebene des Proteoms bestätigt wurde, während die Gene für die SDH bei pH 6 reprimiert waren. Die Repression dieser Gene wurde auch in der Microarray-Analyse der Anpassung an Stress durch Milchsäure bei pH 5,7 festgestellt (JAKOB *et al.*, 2007). In *E. coli* wurden die Gene für die SDH jedoch bei 5,0 als induziert und bei pH 8,7 als reprimiert vorgefunden (MAURER *et al.*, 2005). Die Succinat-Dehydrogenase hat sowohl im Tricarbonsäurezyklus als auch in der Atmungskette eine entscheidende Funktion. MAURER und Kollegen schlugen vor, dass die Induktion in *E. coli* bei tiefem pH mit der Funktion im Tricarbonsäurezyklus erklärt werden kann und dem Verbrauch von Säuren unter diesen Bedingungen geschuldet ist (MAURER *et al.*, 2005). Wie kann dann die Induktion in *C. glutamicum* bei alkalischem pH und die Repression bei niedrigem pH erklärt werden? Zunächst wurde vermutet, dass dies mit der Funktion in der Atmungskette zu erklären ist: *C. glutamicum* besitzt mehrere Dehydrogenasen, welche die Oxidation von Substraten wie NADH, Lactat, Pyruvat, Malat oder Succinat ermöglichen und die Elektronen auf Menachinon übertragen sowie zwei Komplexe,

welche den Elektronentransfer zur Generierung der PMK nutzen, nämlich den Cytochrom *bc₁-aa₃*-Superkomplex und die Cytochrom-*bd*-Oxidase. Dabei ist die energetische Effizienz des *bc₁-aa₃*-Superkomplexes vermutlich dreifach höher als die der Cytochrom-*bd*-Oxidase, so dass der erste Komplex formal $3\text{ H}^+/\text{e}^-$ und die Cytochrom-*bd*-Oxidase $1\text{ H}^+/\text{e}^-$ nach außen transportiert (BOTT und NIEBISCH, 2003). Die Dehydrogenasen für NADH, Lactat, Pyruvat oder Malat sind an die Innenseite der Cytoplasmamembran assoziiert, so dass die Protonen für die Reduktion des Menachinons aus dem Cytoplasma stammen. Daher führt die Übertragung von 2 Elektronen von diesen Substraten formal zum Export von 6 H^+ über den Cytochrom *bc₁-aa₃*-Superkomplex oder 2 H^+ über die Cytochrom-*bd*-Oxidase. Dies ist im Fall der Succinat-Dehydrogenase anders, denn dieses Enzym beinhaltet eine membrangebundene Komponente (SdhC) mit zwei Häm-Gruppen und die Reduktion des Menachinons erfolgt auf der extracytosolischen Seite der Membran, so dass die hierzu nötigen Protonen nicht aus dem Cytoplasma stammen (dies gilt jedoch nicht für die SDH aus *E. coli*). Somit führt die Übertragung von zwei Elektronen von Succinat über den Cytochrom *bc₁-aa₃*-Superkomplex nur zum Export von 4 H^+ oder zu gar keinem Nettoexport über die Cytochrom-*bd*-Oxidase. Somit würde der Protonenexport bei einer erhöhten Aktivität der SDH bei alkalischem pH-Wert minimiert. Auf der anderen Seite würde jedoch die erhöhte Aktivität der SDH auch zu einem verstärkten Fluss durch den Tricarbonsäurezyklus führen, in dessen Folge mehr NADH gebildet werden würde, was wiederum zu einem verstärkten Protonenexport führen würde. Insgesamt lässt sich die Induktion der Gene für die SDH bei alkalischem pH nicht einfach erklären.

Außerdem fielen bei pH 9 vier ABC-Transporter auf, von denen zwei auf Transkriptom- und zwei auf Proteomebene signifikant induziert waren (z. B. zwei *Cation transport ATPases*). Die tatsächlichen Funktionen dieser Gene sind bislang noch nicht untersucht worden, weder in dieser Arbeitsgruppe, noch im Verlauf der Arbeit zur Anpassung an Milchsäure. Hier bietet sich die Inaktivierung der Gene und die Charakterisierung der Mutanten hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber alkalischem pH-Wert an.

2.1 Die Kationen/Protonen Antiporter CpaA und CpaB sind für die Na⁺ Homöostase essentiell

Die Bestimmung der Ionenabhängigkeit der pH-Homöostase bei alkalischem pH ist ein gängiges Verfahren, um einen Hinweis auf die Beteiligung von Kationen/Protonen Antiportern zu erhalten. Besonders deutlich sind die Effekte bei alkalophilen Bakterien, in denen Na⁺/H⁺ Antiporter eine herausragende Funktion bei der pH-Homöostase haben (McLAGGAN *et al.*, 1984). Beispielsweise ist das alkalophile Bakterium *Bacillus pseudofirmus* OF4 bei pH_{ex} = 8,5 in Anwesenheit von 50 mM Na⁺ in der Lage, den cytoplasmatischen pH-Wert bei 7,5 zu halten, während dieser in Abwesenheit von Na⁺ auf 8,5 steigt (PADAN *et al.*, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Bestimmung der Ionenabhängigkeit zeigt, dass auch in *C. glutamicum* die Anwesenheit von Na⁺ zur Regulation des internen pH-Wertes bei alkalischem pH notwendig ist. Die Abhängigkeit von Na⁺ ist bei *C. glutamicum* zwar nicht so deutlich wie bei *B. pseudofirmus* (der interne pH-Wert stieg bei pH_{ex} = 8,5 ohne Na⁺ nur um 0,25 Einheiten von 7,9 auf 8,15), dennoch legt diese Beobachtung nahe, dass auch in *C. glutamicum* Na⁺/H⁺ Antiporter an der pH-Homöostase beteiligt sind.

Na⁺/H⁺ Antiporter gehören grundsätzlich zu der *cation/proton antiporter superfamily* (CPA), welche aus drei Unterfamilien besteht: CPA1, CPA2 und CPA3. Zur ersten Familie gehören unter anderen die wichtigen eukaryotischen NHE Na⁺/H⁺ Antiporter. Der besonders gut untersuchte bakterielle Antiporter NhaA aus *E. coli* gehört zur zweiten Familie. Die dritte Familie besteht aus den so genannten Mrp Antiportern. Diese werden typischerweise von sechs oder sieben Genen kodiert, deren Produkte vorhergesagte Membranproteine sind. Mrp Antiporter sind die wichtigsten Antiporter in alkalophilen *Bacillus* Stämmen, *mrp* Operons wurden jedoch auch weit verteilt in vielen anderen bakteriellen Genomen gefunden (PADAN *et al.*, 2005).

Eine Genomanalyse in *C. glutamicum* zeigte, dass in diesem Bakterium die Gene für drei Kationen/Protonen Antiporter vorhanden sind: nämlich für ein NhaP System aus der ersten Familie und für zwei Mehrkomponenten Mrp Antiporter, welche CpaA und CpaB genannt wurden. Eine besonders wichtige Aufgabe von Na⁺/H⁺ Antiportern ist der Export von Na⁺, weil Na⁺ in höheren cytoplasmatischen Konzentrationen toxisch wirkt (PADAN *et al.*, 1989). Daher wurden die Mutanten zunächst hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber erhöhten Na⁺ Konzentrationen charakterisiert. Diese Charakterisierung zeigte eine stark erhöhte Sensitivität der CpaA und der CpaB

Mutante bei erhöhten NaCl Konzentrationen. Dies legt zum einen nahe, dass sowohl das *cpaA* als auch das *cpaB* Gencluster tatsächlich für funktionelle Na⁺/H⁺ Antiporter der CPA3 Familie kodieren und zeigt die besondere physiologische Bedeutung dieser Genprodukte bei hohen NaCl Konzentrationen. Allein durch das Ausschalten eines der beiden Systeme entsteht ein stark Na⁺ sensitiver Phänotyp. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Gesamtaktivität beider Systeme hinsichtlich der internen Na⁺-Homöostase für die Zelle notwendig ist und die Systeme sich nicht ersetzen können.

Im Hinblick auf die Fähigkeit zur pH-Homöostase zeigten die Einzelmutanten jedoch keinen deutlichen Phänotyp. Bei niedrigen Na⁺ Konzentrationen zeigte keine der Mutanten bei alkalischen pH-Werten schlechteres Wachstum (Abb. 3.19), noch veränderte Werte für den cytoplasmatischen pH oder das Membranpotential. Bei hohen Na⁺ Konzentrationen zeigten die beiden Mrp Antiporter Mutanten beeinträchtigtes Wachstum bei alkalischem pH. Allerdings war dieser Phänotyp nur schwach ausgeprägt und ließ sich nicht sehr gut reproduzieren. Für den Na⁺/H⁺ Antiporter NhaA aus *E. coli* liegen ähnliche Beobachtungen vor. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkalischem pH wurde in einer *E. coli* NhaA Mutante lediglich bei hohen Na⁺ Konzentrationen beobachtet, bei niedrigen Na⁺ Konzentrationen zeigte diese Mutante keinen pH-sensitiven Phänotyp (PADAN *et al.*, 1989). Dies kann folgendermaßen erklärt werden:

Na⁺/H⁺ Antiporter importieren H⁺-Ionen und exportieren Na⁺-Ionen. Bei alkalischen externen pH-Werten müssen beide Ionen gegen ihren Konzentrationsgradienten transportiert werden, da die interne Na⁺-Konzentration im Allgemeinen geringer ist als die externe und bei alkalischem pH_{ex} die interne H⁺-Konzentration höher ist als die externe. Da die treibende Kraft unter diesen Bedingungen nur das Membranpotential sein kann, muss der Antiport elektrogen sein. Das bedeutet, die Anzahl der importierten H⁺-Ionen muss größer sein als die Anzahl der exportierten Na⁺-Ionen, so dass es zu einem Netto Influx von positiver Ladung kommt (PADAN *et al.*, 2005). Wenn bei alkalischem pH_{ex} nun zusätzlich die externe Na⁺-Konzentration und folglich auch der Na⁺-Gradient von außen nach innen steigt, ist der Na⁺/H⁺-Antiport erschwert. Die Folge ist, dass die interne Na⁺-Konzentration und der interne pH ansteigen. Dies ist vermutlich der Grund dafür, warum selbst beim Wildtyp die Wachstumsraten mit alkalischer werdendem pH-Wert umso früher abfielen, je höher die NaCl Konzentration war (3.20). Dieser Effekt war bei den beiden Mrp Antiporter

Mutanten erwartungsgemäß stärker, da in diesen Mutanten jeweils die Aktivität eines physiologisch bedeutenden Antiporters fehlt. Möglicherweise liegt jedoch hinsichtlich der pH-Homöostase bei hohen Na^+ Konzentrationen Redundanz vor und die beiden Antiporter können sich in ihrer Funktion gegenseitig weitgehend ersetzen, weswegen dieser Phänotyp nur schwach ausgeprägt ist und sich nicht leicht reproduzieren lässt. Hier bietet sich die Konstruktion einer Doppelmutante an, die möglicherweise einen deutlicheren Phänotyp zeigt. Um zu testen, ob die Zellen bei gleichzeitig alkalischen pH-Werten und hohen Na^+ -Konzentrationen eher durch die erhöhte interne Na^+ Konzentration oder durch den erhöhten internen pH-Wert beeinträchtigt sind, könnten die cytoplasmatische Na^+ Konzentration und der interne pH-Wert bei alkalischem pH_{ex} und aufsteigenden Na^+ Konzentrationen bestimmt werden. Die erhaltenen Daten könnten mit der Fähigkeit zum Wachstum korreliert werden. Um die Antiporter CpaA und CpaB biochemisch zu charakterisieren, könnten heterologe Expressionen in dem *E. coli* Stamm KNabc durchgeführt werden. In diesem Stamm sind die drei wichtigen *E. coli* Na^+/H^+ Antiporter (NhaA, NhaB und ChaA) deletiert (NOZAKI *et al.*, 1996). Dieser Stamm wurde schon in zahlreichen Untersuchungen genutzt, um aus verschiedenen Bakterien Gene für Na^+/H^+ Antiporter zu identifizieren und die Genprodukte zu charakterisieren (PADAN *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu den beiden Mrp Antiporter Mutanten zeigte die NhaP Mutante keine erhöhte Sensitivität, weder gegenüber erhöhten Na^+ -Konzentrationen, noch gegenüber alkalischem pH bei erhöhten Na^+ -Konzentrationen. Möglicherweise lässt sich die Bedeutung von NhaP in *C. glutamicum* ebenfalls erst nach Konstruktion der Doppel- und der Dreifachmutante erkennen. Allgemein wurde für NhaP Systeme bislang zwar Na^+ Exportaktivität beobachtet, wie beispielsweise für NhaP aus *Pseudomonas aeruginosa* (KURODA *et al.*, 2004), es wurde aber noch keine Funktion bei der pH-Homöostase beschrieben. Übereinstimmend zeigte der NhaP Antiporter aus *Methanococcus jannaschii* in *E. coli* Zellen keine Aktivität bei $\text{pH} \geq 8,0$ und konnte in dem *E. coli* Stamm KNabc die erhöhte Sensitivität gegenüber alkalischem pH bei erhöhten Na^+ -Konzentrationen nicht komplementieren (HELLMER *et al.*, 2003).

2.2 Sowohl der interne Kaliumgehalt als auch der durch CgIK vermittelte Kaliumtransport sind in *C. glutamicum* für die pH-Homöostase essentiell

Es wurde bereits für eine Reihe von Bakterien aus unterschiedlichen Lebensräumen und phylogenetischen Gruppen gezeigt, dass die Zellen bei sauren externen Bedingungen die Anwesenheit von K^+ zur Aufrechterhaltung eines neutralen cytoplasmatischen pH-Wertes benötigen, u. a. für *Lactococcus lactis* (KASHKET und BARKER, 1977), *Escherichia coli* (KROLL und BOOTH, 1981), *Enterococcus faecalis* (BAKKER und MANGERICH, 1981), *Bradyrhizobium* sp. Strain 32H1 (GOBER und KASHKET, 1986), *Rhodobacter sphaeroides* (ABEE *et al.*, 1988), und *Streptococcus mutans* (DASHPER und REYNOLDS, 1992). Der Mechanismus hierfür konnte bislang aber nicht hinreichend geklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die pH-Homöostase auch in *C. glutamicum* von K^+ abhängt: Bei einem externen pH von 6 lag der interne pH-Wert von Wildtyp-Zellen in Anwesenheit von K^+ bei pH 7 und sank in Abwesenheit von K^+ stark ab auf pH 6,2 (Abb. 3.22). Wachstumsexperimente mit unterschiedlichen K^+ Konzentrationen bei unterschiedlichen pH-Werten bekräftigten die Bedeutung von K^+ unter sauren Bedingungen. Während *C. glutamicum* bei neutralem und bei alkalischem pH auch ohne Zugabe von K^+ wachsen kann, ist dies bei niedrigem pH nicht möglich, hier ist die Zugabe von mindestens 1 mM K^+ zum Wachstum notwendig (BECKER, 2007). Die anschließende Analyse des K^+ Transports zeigte, dass im Genom von *C. glutamicum* Gene für die weit verbreiteten bakteriellen K^+ Aufnahmesysteme Ktr, Trk und Kdp fehlen und lediglich zwei Gene vorhanden sind, die für putative K^+ Transportproteine kodieren: ein Gen, dessen Produkt hohe Ähnlichkeit zu dem niedrig affinen K^+ Importer Kup aus *E. coli* aufweist sowie eines, dessen Produkt gleich dem Kaliumkanal KcsA aus *Streptomyces lividans* einen Selektivitätsfilter für K^+ Ionen besitzt und *cgIK* genannt wurde. Durch Konstruktion von Deletionsmutanten und Kaliumaufnahmeexperimenten wurde gezeigt, dass die Kaliumaufnahme in *C. glutamicum* über den putativen Kanal CgIK erfolgt, während für Kup keine Aufnahmeaktivität gemessen wurde (BECKER, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Wachstumsexperimente in Mikrotiterplatten in Anwesenheit von 50 mM KCl zeigen, dass eine Mutante ohne CgIK bei neutralem pH wie der Wildtyp wächst, bei tiefem pH aber deutlich langsamer. In anschließend durchgeführten Experimenten konnte zudem klar dargelegt werden, dass das Wachstum bei

niedrigem pH in einer CgIK Mutante wegen der stark beeinträchtigten Fähigkeit zur pH-Homöostase inhibiert ist (Abb. 3.25), weil diese Mutante kein K^+ transportieren kann (Abb. 3.26). Dies belegt: In *C. glutamicum* wird die K^+ abhängige pH-Homöostase durch CgIK vermittelt, weswegen das funktionelle CgIK Protein bei sauren Bedingungen für das Wachstum notwendig ist.

Die Deletion von Kup führte nicht zu einem pH-sensitiven Phänotyp. Die Kup/CgIK Doppelmutante wuchs zwar bei $pH \geq 6,0$ wie die CgIK Einzelmutante, bei niedrigeren pH-Werten aber noch deutlich langsamer (Abb. 3.24). Vermutlich kann also der Ausfall von Kup durch CgIK kompensiert werden kann. Der zusätzliche Phänotyp der Kup/CgIK Doppelmutante bei $pH \leq 5,75$ deutet aber darauf hin, dass Kup bei sehr niedrigen pH-Werten eine Funktion hat, welche jedoch erst nach Ausfall von CgIK zu erkennen ist. Dies stimmt mit der Situation in *E. coli* überein. In diesem Bakterium wurde für Kup eine wichtige Funktion bei der Anpassung an hyperosmotischen Stress ebenfalls bei sehr niedrigen pH-Werten beobachtet (TRCHOUNIAN und KOBAYASHI, 1999).

Diese Daten werfen die Frage nach dem Mechanismus der K^+ abhängigen pH-Homöostase auf. Ist der interne Kaliumgehalt oder der Vorgang des Kaliumtransports für die pH-Homöostase entscheidend oder ist beides hierfür ausschlaggebend? Mehrere Befunde dieser Arbeit belegen die Bedeutung des cytoplasmatischen Kaliumgehalts: Ergebnisse, die in Zusammenarbeit mit MARKUS BECKER erhalten wurden, belegen, dass die internen pH-Werte von Wildtyp-Zellen bei pH 6 und 1 mM K^+ stark davon abhängig sind, ob die Zellen in Anwesenheit oder in Abwesenheit von K^+ gewachsen waren. Zellen, welche in Anwesenheit von 50 mM K^+ gewachsen waren, hatten einen internen K^+ Gehalt von ca. 150 mM und wiesen nach 5minütiger Inkubation bei pH 6 und 1 mM K^+ einen internen pH-Wert von 6,8 auf. Im Gegensatz dazu wurden für Zellen, welche ohne Kalium gewachsen waren, ein interner K^+ Gehalt von ca. 10 mM und nach 5minütiger Inkubation bei pH 6 und 1 mM K^+ nur ein interner pH-Wert von 6,45 ermittelt (Abb. 3.26). Zudem zeigten die Messungen mit BCECF, dass die Mutanten ohne CgIK auch vor der Kaliumzugabe einen niedrigeren internen pH-Wert aufwiesen als die Stämme mit funktionellem CgIK (Abb. 3.27). Für dieses Experiment wurden alle Stämme in Anwesenheit von 50 mM K^+ kultiviert, wobei die Stämme mit CgIK unter diesen Bedingungen einen internen K^+ Gehalt von 150 mM und die Mutanten ohne CgIK von nur ca. 50 mM aufwiesen. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des internen Kaliumgehalts ergibt sich aus der Tatsache,

dass die Stämme für die Wachstumsexperimente in Mikrotiterplatten (Abb. 3.24) zunächst in K^+ freiem Medium kultiviert werden mussten, um die interne Kaliumkonzentration zu verringern. Nach Vorkultivierung mit 50 mM Kalium zeigten sich die beschriebenen Phänotypen in diesen Versuchen nicht. Dies zeigt, dass der cytoplasmatische Kaliumgehalt der Zellen den internen pH-Wert sowie die Empfindlichkeit gegenüber sauren Bedingungen deutlich beeinflusst.

Auf der anderen Seite zeigen die Daten jedoch auch, dass allein ein hoher Kaliumgehalt zur Generierung eines signifikanten pH-Gradienten nicht ausreichend ist. So ließ sich bei Wildtyp-Zellen, die in Anwesenheit von Kalium gewachsen waren und einen internen Kaliumgehalt von 150 mM aufwiesen, nach 5minütiger Inkubation bei pH 6 ohne Kaliumzugabe nur ein interner pH-Wert von 6,2 bestimmen (Abb. 3.28). In diesem Experiment genügte jedoch schon die Zugabe von 0,33 mM K^+ zur Anhebung des internen pH-Wertes auf 6,8. Bei einer weiteren Erhöhung der Kaliumkonzentration zeigte sich kein direkter Zusammenhang mit dem internen pH-Wert. Ähnliche Beobachtungen liegen auch für *E. coli* vor (KROLL und BOOTH, 1981). Es wurde gezeigt, dass in K^+ entleerten Zellen die Kaliumaufnahme zur Anhebung des cytoplasmatischen pH-Wertes führt, wobei (in gewissen Grenzen) ein direkter Zusammenhang zwischen der Kaliumaufnahme und dem internen pH-Wert beobachtet wurde. Zellen mit hohen internen Kaliumkonzentrationen benötigten jedoch auch die Anwesenheit von K^+ zur Generierung eines pH-Gradienten, obwohl unter diesen Bedingungen keine weitere Netto Aufnahme von Kalium beobachtet wurde. Es wurde daher vorgeschlagen, dass der Kaliumkreislauf, welcher in *E. coli* aus mehreren Aufnahme- und Effluxsystemen (die teilweise an den Eintransport von Protonen gekoppelt sind) besteht, den internen pH-Wert reguliert bzw. bestimmt.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Einstellung des internen pH-Wertes und der Einstellung des Membranpotentials. Zellen, welche bei $pH_{ex} = 6$ keinen signifikanten pH-Gradienten aufbauen konnten – sei es weil kein Kalium im Medium war oder weil CgIK fehlte – wiesen ein sehr hohes Membranpotential auf. Wurde jedoch ein pH-Gradient aufgebaut, sank das Membranpotential nahezu genau um den Wert des pH-Gradienten ab. So zeigte der Wildtyp bei pH 6 in Abwesenheit von Kalium einen pH-Gradienten von 12 mV ($pH_i = 6,2$) und ein Membranpotential von 174 mV. In Anwesenheit von 10 mM K^+ betrug der pH-Gradient ca. 60 mV ($pH_i = 7,0$) und das Membranpotential nur 120 mV, wobei die Summe der beiden Parameter – also die

PMK – in beiden Fällen ca. 180 mV betrug. Dieser Zusammenhang zwischen Membranpotential und internem pH-Wert führte zu der Überlegung, dass die Einstellung des Membranpotentials möglicherweise die Voraussetzung für die Einstellung des internen pH-Wertes ist: Dafür sprechen folgende Argumente: Bei einer deutlichen Absenkung des externen pH-Wertes addiert sich zu einem gegebenen Membranpotential – unter der Voraussetzung, dass der interne pH-Wert stabil bleibt – ein signifikanter pH-Gradient, wodurch der Wert für die PMK ansteigt. Wildtyp-Zellen können nun in Anwesenheit von K^+ durch die Aufnahme von K^+ das Membranpotential absenken, wodurch wieder ein stabiler Wert für die PMK entsteht. In Abwesenheit von K^+ oder ohne funktionelles CgIK kann das Membranpotential jedoch nicht abgesenkt werden. Daher sind die Atmungskette sowie andere Protonen exportierende Komplexe nun nicht mehr in der Lage, gegen die erhöhte protonenmotorische Kraft H^+ Ionen aus dem Cytoplasma zu exportieren. In der Folge sinkt der interne pH-Wert. Ein ähnlicher Vorschlag wurde auch von KROLL und BOOTH gemacht. Die Autoren vermuten, dass die durch die K^+ Aufnahme bedingte Depolarisierung des Membranpotentials zu einer Anregung der Aktivität der Atmungskette führt, wodurch der interne pH-Wert ansteigt. Allerdings geben die Autoren zu bedenken, dass sie in ihren Experimenten auch in Abwesenheit von K^+ durch Zugabe von Glukose eine signifikante Stimulierung der Atmungsaktivität erreicht haben, welche jedoch nicht zu einem Anstieg des internen pH-Wertes führte (KROLL und BOOTH, 1981). Dies legt nahe, dass allein die Aktivierung der Atmungskette nicht zur Generierung eines signifikanten pH-Gradienten ausreicht. Möglicherweise sind noch weitere Protonen exportierende Komponenten beteiligt, deren Aktivität durch die Absenkung des Membranpotentials oder den Einstrom der K^+ Ionen stimuliert wird. Es ist allerdings auch möglich, dass die Einstellung des Membranpotentials nicht ursächlich für die Einstellung des internen pH-Wertes ist, sondern lediglich eine Reaktion auf einen gegebenen pH-Gradienten zur Aufrechterhaltung einer konstanten PMK darstellt.

Um den Mechanismus der K^+ abhängigen pH-Homöostase weiter zu untersuchen, könnte mittels Fluoreszenzsonden (BCECF für pH_i und DiSC₃(5) für $\Delta\Psi$) in hoher zeitlicher Auflösung die Entwicklung dieser Parameter bei unterschiedlichen Bedingungen verfolgt werden. Dabei erleichtert es die Untersuchungen, dass die K^+ abhängige pH-Homöostase in *C. glutamicum* bei den bisher getesteten Bedingungen nur von einem Protein vermittelt wird. In der CgIK Mutante könnten in Anwesenheit

von dem Kaliumionophor Valinomycin durch Variation der externen Kaliumkonzentration unterschiedliche Membranpotentiale (Kaliumdiffusionspotentiale) vorgegeben und der Einfluss auf die Entwicklung der genannten Parameter untersucht werden. Zum grundlegenden Verständnis der pH-Homöostase würde die Bestimmung der Protonenpermeabilität der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* beitragen, da diese über die notwendige Protonenexportkapazität Auskunft geben könnte. Die Daten der Transkriptomanalyse eröffnen in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, bisher unbekannte Transporter zu identifizieren, die am Export der Protonen beteiligt sein könnten. Durch die Charakterisierung mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden könnte die Beteiligung dieser und weiterer Komponenten an der pH-Homöostase gezeigt und quantifiziert werden.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zum einen die Auswirkungen einer Variation des pH-Wertes im Medium und von erhöhter CO₂ Konzentration auf physiologischer Ebene und hinsichtlich der Lysinbildung in *C. glutamicum* analysiert. Die Untersuchungen belegten die besondere Bedeutung der cytoplasmatischen pH-Homöostase. Aus diesem Grund wurden im zweiten Teil der Arbeit wichtige Komponenten und Mechanismen der pH-Homöostase identifiziert und charakterisiert.

Die Analysen ergaben, dass *C. glutamicum* bei externen pH-Werten zwischen pH 6 und 9,5 einen cytoplasmatischen pH-Wert zwischen pH 7 und 8,3 aufrechterhält und in diesem pH-Bereich die höchsten Wachstumsraten mit einem Optimum bei pH 8,0 bis 8,5 erreicht. Darüber hinaus wurde eine sehr effektive Homöostase des elektrochemischen Protonentials (= protonenmotorische Kraft, PMK) beobachtet. Durch Anpassung des Membranpotentials an veränderte pH-Gradienten lag die protonenmotorische Kraft zwischen pH 4,5 und 10 stets bei mindestens 170 mV. Vermutlich bedingt durch die relativ konstanten Werte für die PMK, wurden in wachsenden Zellen aus dem Bioreaktor nach geringen pH-Wert Veränderungen stabile Werte für die Energieladung und den Redox-Status bestimmt.

C. glutamicum zeigte sich bei pH 7 ausgesprochen unempfindlich gegenüber erhöhter CO₂ Konzentration. Bei Konzentrationen von bis zu 20 % CO₂ (v/v) in der Zuluft wurde kein Einfluss auf das Wachstum, die Energieladung, den Redox-Status sowie auf die Komponenten der protonenmotorischen Kraft festgestellt. Dagegen hatten erhöhte CO₂ Konzentrationen bei pH 6 einen stark wachstumsinhibierenden Effekt. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass eine erhöhte CO₂ Konzentrationen direkt eine Absenkung des cytoplasmatischen pH-Wertes nach sich zieht, wodurch die Mechanismen der pH-Homöostase bei gleichzeitig tiefem pH und erhöhter CO₂ Konzentration überfordert sind und keine Kompensation mehr möglich ist.

Für die Lysinbildung wurde gezeigt, dass in beiden untersuchten Stämmen – DM1868 und DM1946 – die spezifische Produktivität bei pH 6 am höchsten war, was möglicherweise durch die Lysinexkretion bedingt ist, welche im Symport mit zwei OH⁻ Ionen stattfindet. Erhöhte CO₂ Konzentrationen hatten dagegen bei pH 7 keinen Einfluss auf die Lysinproduktion. Eine erwartete Steigerung der Lysinbildung durch die erhöhte Verfügbarkeit von HCO₃⁻ wurde in dieser Arbeit nicht bestätigt. Bei pH 6

fürte eine Erhöhung der CO₂ Konzentration zu einer massiven Beeinträchtigung des Zellwachstums und daher auch zu einer starken Verringerung der Lysinbildung.

Bei der Identifizierung von funktionellen Komponenten der pH-Homöostase wurde kein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung der Urease, der F₁F₀-ATPase oder von Aminosäure-Decarboxylasen gefunden. Die Bestimmung der Ionenabhängigkeit der pH-Homöostase zeigte, dass bei alkalischem pH die Anwesenheit von Na⁺ notwendig ist. Es wurden in *C. glutamicum* drei putative Na⁺/H⁺ Antiporter – ein NhaP System und zwei Mehrkomponentensystem Mrp Antiporter – identifiziert und charakterisiert. Diese Untersuchungen demonstrierten die besondere Bedeutung der beiden Mrp Antiporter bei hohen NaCl Konzentrationen und legten nahe, dass ihre Aktivität auch für die pH-Homöostase bei gleichzeitig vorliegendem alkalischem pH und hohen Na⁺ Konzentrationen wichtig ist. Für niedrige externe pH-Werte wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von K⁺ sowohl für das Wachstum als auch zur internen pH-Homöostase notwendig ist. Dabei wurde gefunden, dass sowohl der cytoplasmatische Kaliumgehalt als auch der durch den putativen Kaliumkanal CgIK vermittelte Kaliumtransport für die pH-Homöostase relevant sind. Die Untersuchungen zeigten außerdem einen direkten Zusammenhang zwischen der Einstellung des internen pH-Wertes und der Einstellung des Membranpotentials. Dabei wurde als Modell für die K⁺ abhängige pH-Homöostase vorgeschlagen, dass eine durch K⁺ vermittelte Absenkung des Membranpotentials zu einer Stimulierung von Protonen exportierenden Komponenten führt. Die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom- und Proteomanalyse bei verschiedenen pH-Werten eröffnen die Möglichkeit, bisher unbekannte an der pH-Homöostase beteiligte Komponenten zu identifizieren und so mögliche weitere Mechanismen der pH-Homöostase aufzudecken. Diese Erkenntnisse könnten in nachfolgenden Arbeiten zur Verbesserung der pH-Homöostase in *C. glutamicum* genutzt werden und damit evtl. zu einer Optimierung von Produktionsstämmen beitragen.

VI. Anhang

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse des Transkriptoms fielen Gene auf, welche bei pH 6 oder pH 9 weniger stark exprimiert wurden als bei pH 7,5. Diese Gene sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 aufgeführt. Es ist außerdem dargestellt, ob deren Genprodukte vermindert vorlagen. Die bei pH 6 regulierten Gene wurden zudem mit jenen verglichen, welche bei der Microarray-Analyse der Anpassung an Milchsäure als reprimiert identifiziert worden waren.

Tab. 6.1: Bei pH 6 reprimierte Gene. Ein Gen galt als reprimiert, wenn das \log_2 Verhältnis von pH 6 zu pH 7,5 ≤ -1 war. Dargestellt ist außerdem, ob die Genprodukte auch im Proteom und die Gene auch bei der Analyse der Anpassung an Stress durch Milchsäure aufgefallen waren. Vermutete Operons sind durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

Cg-Nr.	Operon	Name	Funktion		Proteom?	Lactat-Anpassung?
cg0148		<i>panC</i>	Pantoate--beta-alanine ligase	-1,29	ja	
cg0244	ca		Putative membrane protein	-1,23		
cg0245	ca		Conserved hypothetical protein	-1,02		
cg0252			Putative membrane protein	-1,16		
cg0308			Putative membrane protein	-1,34		
cg0337		<i>whiB4</i>	Putative transcriptional regulator, WhiB-family	-1,04		
cg0350			Putative transcriptional regulator, Crp-family	-1,18		
cg0445	ba	<i>sdhCD</i>	Succinate dehydrogenase, subunit CD	-1,31	ja	ja
cg0446	ba	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase, subunit A	-1,08	ja	ja
cg0447	ba	<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase, subunit B	-1,43		ja
cg0465			Conserved putative membrane protein	-1,14		
cg0466			Conserved putative secreted protein	-1,33		
cg0470	cb		Conserved secreted protein	-1,66	ja	
cg0471	cb		Conserved secreted protein	-1,3		
cg0493			Hypothetical protein	-1,05		
cg0563	cc	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	-1,28		
cg0564	cc	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	-1,1		
cg0572	cd	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	-1,6		ja
cg0573	cd	<i>rplL</i>	Putative 50S ribosomal protein L7/L12	-1,53	ja	ja
cg0582		<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	-1,07		ja
cg0599		<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	-1,09		ja
cg0601	ce	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	-1,05		ja
cg0602	ce	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	-1,02		ja
cg0603	ce	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	-1,01		ja
cg0604	ce	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	-1,18		

VI. Anhang

cg0623	da		ABC-type putative cobalt transporter, permease subunit	-1,05		ja
cg0624	da		Putative secreted oxidoreductase	-1,09		ja
cg0625	da		Putative secreted protein	-1,28	ja	
cg0690	cf	<i>groES</i>	10kDa chaperonin	-1,77		ja
cg0691	cf	<i>groEL'</i>	60kDa chaperonin, putative pseudogene (N-terminal fragment)	-2,19		
cg0693	cf	<i>'groEL</i>	60kDa chaperonin, putative pseudogene (C-terminal fragment)	-1,47		ja
cg0748			ABC-type putative iron-siderophore transporter, substrate-binding lipoprotein	-1,07	ja	
cg0752			Putative secreted or membrane protein	-1,55	ja	
cg0760		<i>prpB2</i>	Methylisocitrate lyase, involved in propionate catabolism	-1,54	ja	
cg0762		<i>prpC2</i>	2-Methylcitrate synthase, involved in propionate catabolism	-1,39	ja	
cg0832			ABC-type putative sugar transporter, permease subunit	-1,33	ja	
cg0834			ABC-type putative sugar transporter, substrate-binding lipoprotein	-2,46	ja	
cg0842			Putative DNA helicase	-1,03		
cg0898			Pyridoxine biosynthesis enzyme	-1,09		
cg0949		<i>gltA</i>	Citrate synthase	-1,03	ja	ja
cg0952	cg		Putative integral membrane protein	-2,55	ja	ja
cg0953	cg		Putative Na ⁺ /solute symporter, solute:sodium symporter (SSS) family	-2,44	ja	ja
cg0961			Putative hydrolase, alpha/beta-fold	-1,7		
cg1072		<i>rplY</i>	Ribosomal protein L25 (general stress protein Ctc)	-1,26		ja
cg1108			Putative secreted protein	-1,11	ja	ja
cg1122			Putative secreted protein	-1,31	ja	
cg1123		<i>greA</i>	Transcription elongation factor	-1,21		ja
cg1167			Putative acetyltransferase, GNAT-family	-1,04		
cg1362	ch	<i>atpB</i>	ATP synthase F0, A chain	-1,35		ja
cg1363	ch	<i>atpE</i>	ATP synthase F0, C chain	-1,6	ja	ja
cg1364	ch	<i>atpF</i>	ATP synthase F0, B chain	-1,52		ja
cg1365	ch	<i>atpH</i>	ATP synthase F1, delta subunit	-1,26		ja
cg1366	ch	<i>atpA</i>	ATP synthase F1, alpha chain	-1,65		ja
cg1367	ch	<i>atpG</i>	ATP synthase F1, gamma chain	-1,71	ja	ja
cg1368	ch	<i>atpD</i>	ATP synthase F1, beta chain	-1,72		ja
cg1369	ch	<i>atpC</i>	ATP synthase F1, epsilon chain	-1,09		
cg1436		<i>ilvN</i>	Acetolactate synthase, small subunit	-1,41	ja	
cg1437		<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	-1,44	ja	
cg1564	ci	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	-1,04		ja
cg1565	ci	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	-1,26		
cg1579			Putative secreted protein	-1,36		
cg1612			Putative acetyltransferase	-1,32		
cg1905	cj		Hypothetical protein	-1,33	ja	
cg1906	cj		Hypothetical protein	-1,17		

VI. Anhang

<i>cg1913</i>			Hypothetical protein	-1,19		
<i>cg1930</i>			Putative secreted hydrolase	-1,18		
<i>cg2136</i>	ck	<i>gluA</i>	ABC-type glutamate transporter, ATPase subunit (TC 3.A.1.3.9)	-1,36	ja	
<i>cg2137</i>	ck	<i>gluB</i>	ABC-type glutamate transporter, substrate-binding lipoprotein (TC 3.A.1.3.9)	-1,38	ja	
<i>cg2138</i>	ck	<i>gluC</i>	ABC-type glutamate transporter, permease subunit (TC 3.A.1.3.9)	-1,19		ja
<i>cg2167</i>		<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15.	-1,01		
<i>cg2181</i>			ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein	-2,2	ja	ja
<i>cg2234</i>			ABC-type putative iron(III) dicitrate transporter, substrate-binding lipoprotein	-1,32		
<i>cg2235</i>		<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	-1,4		
<i>cg2253</i>		<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	-1,14		
<i>cg2467</i>	cl		ABC-type transporter, ATPase subunit	-1,21	ja	
<i>cg2470</i>	cl		ABC-type transporter, substrate-binding lipoprotein	-1,66	ja	ja
<i>cg2559</i>	cm	<i>aceB</i>	Malate synthase	-1,21	ja	
<i>cg2560</i>	cm	<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	-2,73	ja	
<i>cg2573</i>		<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	-1,33		
<i>cg2603</i>		<i>ndk</i>	Nucleoside-diphosphate kinase	-1,19		
<i>cg2647</i>		<i>tig</i>	Putative Trigger factor,involved in cell division	-1,47		
<i>cg2703</i>			ABC-type putative sugar transporter, permease subunit	-1,9		
<i>cg2705</i>		<i>amyE</i>	ABC-type putative sugar transporter, substrate-binding lipoprotein	-1,68	ja	
<i>cg2840</i>		<i>actA</i>	Putative coenzyme A transferase	-1,67	ja	
<i>cg2953</i>			Putative 4-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase	-1,39	ja	
<i>cg3011</i>		<i>groEL</i>	Chaperonin Cpn60 (60Kd subunit)	-2,2		
<i>cg3048</i>		<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	-1,07	ja	
<i>cg3096</i>			Aldehyde dehydrogenase (NAD(+))	-3,24	ja	
<i>cg3107</i>		<i>adhA</i>	Alcohol dehydrogenase	-1,97	ja	
<i>cg3156</i>			Putative secreted protein	-2,5	ja	
<i>cg3195</i>			Putative flavin-containing monooxygenase	-2,23	ja	
<i>cg3212</i>			Putative carboxymuconolactone decarboxylase subunit	-1,92		

Tab. 6.2: Bei pH 9 reprimierte Gene. Ein Gen galt als reprimiert, wenn das Log_2 Verhältnis von pH 9 zu pH 7,5 ≤ -1 war. Dargestellt ist außerdem, ob die Genprodukte auch im Proteom aufgefallen waren. Vermutete Operons sind durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

Cg-Nr.	Operon	Name	Funktion		Proteom?
<i>cg0071</i>			Metallo-beta-lactamase superfamily	-1,01	
<i>cg0133</i>			Putative secondary aminobenzoyl-glutamate transporter, AbgT-family	-1,02	ja
<i>cg0202</i>		<i>iolD</i>	Putative acetolactate synthase, large subunit	-1,13	
<i>cg0265</i>			ABC-type putative molybdenum transporter, ATPase subunit	-1,08	
<i>cg0303</i>		<i>leuA</i>	2-Isopropylmalate synthase	-1,06	
<i>cg0404</i>			Conserved hypothetical protein, nitroreductase-family	-1,5	ja
<i>cg0467</i>			ABC-type putative hemin transporter, substrate-binding lipoprotein	-1,1	ja
<i>cg0527</i>			Putative transcriptional regulator, ArsR-family	-1,13	
<i>cg0589</i>			ABC-type putative iron-siderophore transporter, ATPase subunit	-1,01	
<i>cg0623</i>	da		ABC-type putative cobalt transporter, permease subunit	-1,35	
<i>cg0624</i>	da		Putative secreted oxidoreductase	-1,09	ja
<i>cg0625</i>	da		Putative secreted protein	-1,04	ja
<i>cg0723</i>		<i>crtE</i>	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	-1,01	
<i>cg0748</i>			ABC-type putative iron-siderophore transporter, substrate-binding lipoprotein	-2,14	ja
<i>cg0756</i>		<i>cstA</i>	Putative carbon starvation protein A	-1,56	ja
<i>cg0767</i>			Siderophore-interacting protein	-2,99	
<i>cg0768</i>			ABC-type putative iron-siderophore transporter, ATPase subunit	-2,03	ja
<i>cg0924</i>	db		ABC-type putative iron-siderophore transporter, substrate-binding lipoprotein	-2,91	ja
<i>cg0927</i>	db		ABC-type putative iron-siderophore transporter, permease subunit	-2,08	ja
<i>cg0928</i>	db		ABC-type putative iron-siderophore transporter, ATPase subunit	-2,35	ja
<i>cg0952</i>	cg		Putative integral membrane protein	-1,32	ja
<i>cg0953</i>	cg		Putative Na ⁺ /solute symporter, solute:sodium symporter (SSS) family	-1,01	ja
<i>cg1091</i>			Hypothetical protein	-1,18	
<i>cg1167</i>			Putative acetyltransferase, GNAT-family	-1,43	
<i>cg1290</i>		<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate-homocysteine methyltransferase	-1,06	ja
<i>cg1365</i>	ch	<i>atpH</i>	ATP synthase F1, delta subunit	-1,03	ja
<i>cg1367</i>	ch	<i>atpG</i>	ATP synthase F1, gamma chain	-1,11	ja
<i>cg1451</i>		<i>serA</i>	Phosphoglycerate dehydrogenase	-1,1	ja
<i>cg1537</i>		<i>ptsG</i>	Phosphotransferase system (PTS), glucose-specific enzyme IIBCA component	-1,06	ja
<i>cg1859</i>			Putative secreted protein	-1,34	ja
<i>cg1930</i>	dc		Putative secreted hydrolase	-3,26	
<i>cg1931</i>	dc		Putative secreted protein	-2,55	
<i>cg2283</i>			Conserved hypothetical protein	-1,51	
<i>cg2336</i>			Putative secreted protein	-1,31	ja
<i>cg2445</i>		<i>hmuO</i>	Heme oxygenase (decyclizing)	-1,19	ja
<i>cg2560</i>		<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	-2,19	ja

VI. Anhang

<i>cg2962</i>			Hypothetical protein, uncharacterized enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides	-1,18	
<i>cg3156</i>			Putative secreted protein	-2,76	ja
<i>cg3254</i>			Putative membrane protein	-1,29	

VII. Literaturverzeichnis

ABE, S., TAKAYAMA, K., KINOSHITA, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301

ABEE, T., HELLINGWERF, K., KONINGS, W. (1988) Effects of potassium ions on proton motive force in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **170**: 5647-5653

BÄUMCHEN, C., KNOLL, A., HUSEMANN, B., SELETZKY, J., MAIER, B., DIETRICH, C., AMOABEDINY, G., BÜCHS, J. (2007) Effect of elevated dissolved carbon dioxide concentrations on growth of *Corynebacterium glutamicum* on D-glucose and L-lactate. *J. Biotechnol.* **128**: 868-874

BAKKER, E., MANGERICH, W. (1981) Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J Bacteriol.* **147**: 820-826

BARRRUSIO-IGLESIAS, M., BARREIRO, C., FLECHOSO, F., MARTIN, J. (2006) Transcriptional analysis of the F_0F_1 ATPase operon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 reveals strong induction by alkaline pH. *Microbiology.* **152**: 11-21

BECKER, M. (2007) Untersuchungen zum Kaliumtransport in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln

BECKERS, G., BENDT, A., KRÄMER, R., BURKOVSKI, A., (2004) Molekular Identification of the Urea Uptake System and Transcriptional Analysis of Urea Transporter- and Urease-Encoding Genes in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology.* **186**: 7645-7652

BERNOFSKY, C., SWAN, M. (1973) An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem.* **53**: 452-458

BLOMBACH B., SCHREINER M., BARTEK T., OLDIGES M., EIKMANNS B. (2008) *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production. *Appl Microbiol Biotechnol.* Epub ahead of print

BOOTH, I. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Reviews.* **13:** 359-378

BOOTH, I. (1999) The regulation of intracellular pH in bacteria. *Bacterial responses to pH.* (Novartis Foundation Symposium) **221:** 19-37

BOOTH, I., CASH, P., O'BYRNE, C., (2002) Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81:** 33-42

BOTT, M., NIEBISCH, A., (2003) The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* **104:** 129-153

BROER, S., KRÄMER, R., (1991) Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur. J. Biochem.* **202:** 137-143

BURTON, R., (1986) On calculating concentrations of "HCO₃" from pH and pCO₂. *Comp. Biochem. Physiol.* **87:** 417-422

CHEN, C., TSUCHIYA, T., YAMANE, Y., WOOD, J., WILSON, T. (1985) Na⁺(Li⁺)-proline cotransport in *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **84:**157–164

COTTER, P., EMERSON, N., GAHAN, C., HILL, C. (1999) Identification and disruption of lisRK, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* **181:** 6840-6843

COTTER, P., HILL, C. (2003) Surviving the Acid test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67:** 429-453

DASHPER, S., REYNOLDS, E. (1992) pH regulation by *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **71**: 1159–1165

DATTA, A., BENJAMIN, M. (1997) Factors Controlling Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*: Effects of Nisin and Other Ionophores. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**: 4123-4126

DIXON, N., KELL, D. (1988) The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *J. of appl. Bacteriology.* **67**: 109-136

EGGELING, L., SAHM, H. (1999) L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153

EKLUND, T. (1984) The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology.* **4**: 179-185

FERGUSON, G., BOOTH, I., (1998) Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *J. Bacteriol.* **180**: 4313-4318

FOLLMANN, M. (2004) Aufnahme von Methionin in *Corynebacterium glutamicum*: Identifizierung und Charakterisierung der beteiligten Transportproteine. Diplomarbeit, Universität zu Köln

GOBER, J., KASHKET, E. (1986) Effects of K⁺ on the proton motive force of *Bradyrhizobium sp.* strain 32H1. *J Bacteriol.* **166**: 618-622

GRANT, S., JESSEE, J., BLOOM, F., HANAHAN, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. USA.* **87**: 4645-4649

GROSS, A., Function and regulation of the heat shock proteins. *Escherichia coli and Salmonella.* **1**: 1382-1399

GUT, H., PNNACHIETTI, E., JOHN, R., BOSSA, F., CAPITANI, G., DE BIASE, D., GRÜTTER, M. (2006) *Escherichia coli* acis resistance. PH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB. *EMBO Journal*. **25**: 2643-2651

HAROLD, F., PAVLASOVA, E., BAARDA, J. (1970) A transmembrane pH gradient in *Streptococcus faecalis*: origin, and dissipation by proton conductors and *N,N*-dicyclohexylcarbodimide. *Biochim. Biophys. Acta*. **196**: 235–244

HAYNES, J., BRITZ, M. (1989) Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum*: growth in Tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**: 329-334

HELLMER, J., TEUBNER, A., ZEILINGER, C. (2003) Conserved arginine and aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*. *FEBS Lett.* **542**: 32-36

HERMANN, T. (2003) Industrial production of amino acids by *coryneform bacteria*. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172

HIGUCHI, T., HAYASHI, H., ABE, K. (1997) Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.* **179**: 3362–3364

HIPLER, B., BRAND, S., ANGERSBACH, S., RÜCKERT, C. (2003) Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen mit Hilfe der Nephelometrie. *BIOspektrum* **5**: 648-649

HIRAMATSU, T., KODAMA, K., KURODA, T., MIZUSHIMA, T., TSUCHIYA, T. (1998) A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J. Bac.* **180**: 6642-6648

HÜSER, A., BECKER, A., BRUNE, I., DONDRUP, M., KALINOWSKI, J., PLASSMEIER, J., PUEHLER, A., WIEGRÄBE, I., TAUCH, A. (2003) Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J Biotechnol.* **106**: 269-286

HUNTE, C., SCREPANTI, M., VENTURI, M., RIMON, A., PADAN, A., MICHEL, H. (2005) Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH, *Nature.* **534**: 1197-1202

IKEDA, M., KATSUMATA, R. (1995) Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosc. Biotech. Biochem.* **59**: 1600-1602

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**: 23-28

IVEY, D., GUFFANTI, A., ZEMSKY, J., PINNER, E., KARPEL, R., PADAN, E., SCHULDINER, S., KRULWICH, T. (1993) Cloning and characterization of a putative Ca²⁺/H⁺ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na⁺/H⁺ antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 11296–11303

JAKOB, K., SATORHELYI, P., LANGE, C., WENDISCH, V., SILAKOWSKI, B., SCHERER, S., NEUHAUS, K. (2007) Gene expression analyses of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *J Bacteriol.* **15**: 5582-5590

JOLKVER, E. (2008) voraussichtlicher Titel: Untersuchungen zu Transportproteinen in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln

JONES, R., GREENFIELD, P., (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 210-223

KALINOWSKI, J. (2003) Bakterien für die industrielle Produktion, *Forschung an der Universität Bielefeld*, **26** : 29-32

KALINOWSKI, J., BATHE, B., BARTELS, D., BISCHOFF, N., BOTT, M., BURKOVSKI, A., DUSCH, N., EGGELING, L., EIKMANN, B., GAIGALAT, L., GOESMANN, A., HARTMANN, M., HUTHMACHER, K., KRÄMER, R., LINKE, B., McHARDY, A., MEYER, F., MÖCKEL, B., PFEFFERLE, W., PÜHLER, A., REY, D., RÜCKERT, C., RUPP, O., SAHM, H., WENDISCH, V., WIEGRÄBE, I., TAUCH, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol.* **104**: 5-25

KASE, H., NAKAYAMA, K. (1972) Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1611-1621

KASHKET, E. (1985) The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Ann. Rev. Micro.* **39**: 219-242

KASHKET E., BARKER, S. (1977) Effects of potassium ions on the electrical and pH gradients across the membrane of *Streptococcus lactis* cells. *J Bacteriol.* **130**: 1017-1023

KELLE, R., HERMANN, T., BATHE, B. (2005) L-Lysine production. *Handbook of Corynebacterium glutamicum.* **1**: 465- 488

KELLE, R., LAUFER, B., BRUNZEMA, C., WEUSTER-BOTZ, D., KRÄMER, R., WANDREY, R. (1996) Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering.* **51**: 40-50

KINOSHITA, S., TANAKA, K. (1972) Glutamic acid. In *The Microbial Production of Amino Acids.* Halsted press. 263-324

KINOSHITA, S., UDAKA, S., SHIMONO, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205

KLINGENBERG, M., PFAFF, E. (1967) Means of terminating reactions. *Methods Enzymol.* **10**: 680-684

KOBAYASHI, H., T. SUZUKI, AND T. UNEMOTO (1985) Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **261**: 627–630

KOCAN, M., SCHAFFER, S., TAKERU, I., SORGER-HERRMANN, U., WENDISCH, V., BOTT, M. (2005) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: Deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *Journal of Bacteriology.* **188**: 724-732

KOIZUMI, S., YONETANI, Y., MARUYAMA, A., TESHIBA, S. (2000) Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 674-679

KRÄMER, R., LAMBERT, C., EBBINGHAUSEN, H., HOISCHEN, C. (1990) Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. II. Evidence for a primary active transport system. *Eur. J. Biochem.* **194**: 937-944

KROLL, R., BOOTH, I. (1981) The role of potassium transport in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli*. *Biochem J.* **198**: 691-698

KUHNERT, W., ZHENG, G., FAUSTOFERRI, R., QUIVEY, R. (2004) The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J Bacteriol.* **186**: 8524-8528

KURODA, T., FUJITA, N., UTSUGI, J., KURODA, M., MIZUSHIMA, T., TSUCHIYA, T. (2004) A major Li(+) extrusion system NhaB of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison with the major Na(+) extrusion system NhaP. *Microbiol Immunol.* **48**: 243-250

KUSIAN, B., SÜLTEMAYER, D., BOWIEN, B. (2002) Carbonic anhydrase is essential for growth of *Ralstonia eutropha* at ambient CO₂ concentrations. *J. Bacteriol.* **184**: 5018-5026

LEFEBVRE, Y., COUTURE, P., COUILLARD, D. (1988) An analytical procedure for the measurement of ATP extracted from activated sludge. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1275-1279

LEUCHTENBERGER, W. (1996) Amino acids – technical production and use. In: Rehm, H., Reeds, G. (eds) Products of primary metabolism. *Biotechnology.* **6**: 455-502

LEWINSON, O., PADAN, E., BIBI, E., (2004) Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homöostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 14073-14078

LIEBL, W., EHRMANN, M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. (1989) High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 45-54

LIN, J., LEE, I., FREY, J., SLONCZEWSKI, J., FOSTER, J., (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 4097-4104

LINDROTH, P., MOPPER, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1667-1674

LUNDIN, A., RICKARDSON, A., THORE, A. (1976) Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **75**: 611-620

MAURER, L., YOHANNES, E., BONDURANT, S., RADMACHER, M., SLONCZEWSKI, J. (2005) pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **187**: 304-319

McINTYRE, M., McNEIL, B. (1997) Effects of elevated dissolved CO₂ levels on batch and continuous cultures of *Aspergillus niger* A60: an evaluation of experimental methods. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 4171-4177

McLAGGAN, D., SELWYN, M., SAWSON, A. (1984) Dependence of Na⁺ of control of cytoplasmic pH in a facultative alkalophile. *FEBS Lett.* 254-258

MEIER-WAGNER, J., NOLDEN, L., JACOBY, M., SIEWE, R., KRÄMER, R., BURKOVSKI, A. (2001) Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB. *Microbiology.* **147**: 135-143

MEYER-ROSBURG, K., SCOTT, D., REX, D., MELCHERS, K., SACH, G. (1996) The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* **4**: 886-900

MIMITSUKA, T., SAWAI, H., HATSU, M., YAMADA, K. (2007) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**: 2130-2135

MINNIKIN, D. (1982). In: Ratledge, J. (eds) The biology of the mycobacteria. *Academic. Pr.* **1**: 95-184

MITSUHASHI, S., OHNISHI, J., HAYASHI, M., IKEDA, M., (2004) A gene homologous to β -type carbonic anhydrase is essential for the growth of *Corynebacterium glutamicum* under atmospheric conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 592-601

MÖKER, N. (2002) Einfluss von Zwei-Komponenten-Systemen auf die Osmoregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln

MÖKER, N., BROCKER, M., SCHAFFER, S., KRÄMER, R., MORBACH, S., BOTT, M. (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol.* **54**: 420-438

MÖKER, N., REIHLEN, P., KRÄMER, R., MORBACH, S. (2007) Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem.* **282**: 666-677

MORBACH, S., KRÄMER, R. (2008) Environmental stress response of *Corynebacterium glutamicum*. *Corynebacteria: Genomics and molecular biology. Caister Academic Press.* 313-334

MOSTAFA, S., XUEJUN, G. (2003) Strategies for improved dCO₂ removal in large-scale fed-batch cultures. *Biotechnology progress.* **19**: 45-51

NOLDEN, L., BECKERS, G., MOCKEL, B., PFEFFERLE, W., NAMPOOTHIRI, K., KRÄMER, R., BURKOVSKI, A. (2000) Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organization of corresponding genes and investigation of activity. *FEMS Microbiol Lett.* **189**: 305-310

NOZAKI, K., INABA, K., KURODA, T., TSUDA, M., TSUCHIYA, T. (1996) Cloning and sequencing of the gene for Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**: 774–779

OLSON, E. (1993) Influence of pH on bacterial gene expression. *Molec. Microbiol.* **8**: 5-14

OHNISHI, J., MITSUHASHI, S., HAYASHI, M., ANDO, S., YOKOI, H., OCHIAI, K., IKEDA, M. (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**: 217-223

PADAN, E., BIBI, E., ITO, M., KRULWICH, T., (2005) Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1717**: 67-88

PADAN, E., MAISLER, N., TAGLICHT, D., KARPEL, R., SCHULDINER, S. (1989) Deletion of *ant* in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na⁺/H⁺ antiporter system(s). *J. Biol. Chem.* **264**: 20297–20302

PADAN, E., SCHULDINER, S. (1994) Molecular physiology of Na⁺/H⁺ antiporters, key transporters in circulation of Na⁺ and H⁺ in cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1185**: 129-151

PARK, S., SINSKEY, A., STEPHANOPOULOS, G. (1997) Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 864-879

PETER, H., WEIL, W., BURKOVSKI, A., KRÄMER, R. MORBACH, S. (1998) *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *Journal of Bacteriology*. **180**: 6005-6012

PETERS-WENDISCH, P., SCHIEL, B., WENDISCH, V., KATSOULIS, E., MOCKEL, B., SAHM, H., EIKMANN, B. (2001) Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol Biotechnol.* **2**: 295-300

PUTNOKY, P., KERESZT, A., NAKAMURA, T., ENDRE, G., GROSSKOPF, E., KISS, P., KONDOROSI, A. (1998) The *pha* gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type K1 efflux system. *Mol. Microbiol.* **28**: 1091–1101

RADCHENKO, M., TANAKA, K., WADITEE, R., OSHIMI, S., MATSUZAKI, Y., FUKUHARA, M., KOBAYASHI, H., TAKABE, T., NAKUMARA, T. (2006) Potassium/Proton Antiport System of *Escherichia coli*. *J. Bac. Chem.* **29**: 19822-19829

RAO, M., STRUER, T., ALDWELL, F., COOK, G. (2001) Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology.* **147**: 1017-1024

ROE, A., O'BYRNE, C., McLAGGAN, D., BOOTH, I. (2002) Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology.* **148**: 2215-2222

ROTTENBERG, H. (1979) The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. *Meth. Enzymol.* **LV**: 547-569

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHÄFER, A., TAUCH, A., JÄGER, W., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G., PÜHLER, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **145**: 69-73

SCHIMZ, K., RÜTTEN, B., TRETTER, M., (1981) Determination of adenosine nucleotides with luciferine/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. *Adv. Biotechnol.* **1**: 457-462

SCHLUESENER, D., RÖGNER, M., POETSCH, A. (2007) Evaluation of two proteomics technologies used to screen the membrane proteomes of wild-type *Corynebacterium glutamicum* and an L-lysine-producing strain. *Anal Bioanal Chem.* **389**: 1055-1064

SCHRUMPF, B., EGGELING, L., SAHM, H. (1992) Isolation and prominent characteristics of an L-Lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571

SELETZKY, JM., NOAK, U., FRICKE, J. HAHN, S., BÜCHS, J. (2006) Metabolic activity of *Corynebacterium glutamicum* grown on L-lactic acid under stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**: 1297-1307

SKULACHEV, V. (1994) Chemiosmotic concept of the membrane bioenergetics: what is already clear and what is still waiting for elucidation? *J Bioenerg Biomembr.* **26**: 589-598

SLONCZEWSKI, J., FOSTER, J. (1996) pH regulated genes and survival at extreme pH. *Escherichia coli and Salmonella* **1**: 1539-1549

STACKEBRANDT, E., RAINEY, F., WARD-RAINEY, N. (1997) Proposal of a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491

STANCIK, L., STANCIK, D., SCHMIDT, B., BARNHART, B., YONCHEVA, Y., SLONCZEWSKI, J. (2002) pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 4246-4258

STINGL, K., UHLEMANN, E., SCHMID, R., ALTENDORF, K., BAKKER, E. (2002) Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *J Bacteriol.* **184**: 3053-3060

SUSENBETH, A. (1995) Factors affecting lysine utilization in growing pigs: an analysis of literature data. *Live. Prod. Sci.* **43**: 193-204

SUZUKI, T., SHIBATA, C., YAMAGUCHI, A., IGARASHI, K., KOBAYASHI, H. (1993) Complementation of an *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecalis*) mutant in the alpha subunit of the H(+)-ATPase by cloned genes from the same and different species. *Mol. Microbiol.* **9**: 111-118

TAGLICHT, D., PADAN, E., SCHULDINER, S. (1993) Proton-sodium stoichiometry of NhaA, an electrogenic antiporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chemistry*. **268**: 5382-5387

TAHIAN, R., HEWETT-EMMETT, D., CARTER, M., BERGENHEM, N. (2000) Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. *Exs*. **90**: 105-125

TRCHOUNIAN, A., KOBAYASHI, H. (1999) Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH. *FEBS Lett*. **26**: 144-148

WALTER, B., KÜSPERT, M., ANSORGE, D., KRÄMER, R., BURKOVSKI, A. (2008) Dissection of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: Mechanism of action and energetics of AmtA and AmtB. *J. Bacteriol*. **190**: 2611-2614

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jede, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Keine Teilpublikationen

Datum: Köln, Mai 2008

Unterschrift:

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas, seine wertvollen Ratschläge und die intensive Betreuung bei der Etablierung der notwendigen Methoden,

Frau Prof. Dr. Karin Schnetz für die freundliche Übernahme des Koreferats,

meinem Betreuer Kay Marin für unzählige Impulse, Tipps und Tricks im Biotechnikum, die Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit und für das auf den Weg bringen vieler Projekte,

Markus für die tolle und sehr erfolgreiche Zusammenarbeit beim Thema Kalium, die dieses Projekt weit voran gebracht hat,

Türkan und Elena für die tolle Zusammenarbeit beim Thema Na^+/H^+ Antiport,

den Kooperationspartnern Christian Trötschel und Ansgar Poetsch der Universität Bochum für die Durchführung der Proteomanalyse, den Kooperationspartnern Christian Rückert, Andrea Hüser und Jörn Kalinowski der Universität Bielefeld für die Durchführung der Transkriptomanalyse,

Arthur Reuter und Manfred Kreikler für die Hilfe bei technischen Problemen im Biotechnikum,

Carsten Bäumchen aus dem Forschungszentrum Jülich für die Möglichkeit, die fedbatch-pro® Anlage zu benutzen und für wertvolle Diskussionen über CO_2 Stress,

Ines fürs Korrekturlesen, Bettine für Hilfe an der HPLC, Marc für Tipps zum Kaliumtransport, Vera fürs Durchschleppen auf den letzten Metern,

meiner direkten Laborkollegin Jeannine für ein super Arbeitsklima sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schöne, gemeinschaftliche Zeit,

meiner Familie, die mir das Studium erst möglich gemacht hat, insbesondere Gathi, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt hat und Petra für tatkräftige Hilfe bei der Abfassung dieser Arbeit,

Lilli für eine sehr schöne Zeit.