

Physiologische und biochemische
Untersuchungen zu oxidativem Stress in
Corynebacterium glutamicum

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Carolin Marianne Lange

aus Dormagen

Köln, Oktober 2012

Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der Disputation: 12.12.2012

***“Success is the ability to go from failure to failure without losing your
enthusiasm”***

- Sir Winston Churchill

Physiologische und biochemische Untersuchungen zu oxidativem Stress in *Corynebacterium glutamicum*

Durch das Aufkommen photosynthetisch lebender Organismen auf der Erde vor Millionen von Jahren kam es zu einer Anreicherung der Atmosphäre mit molekularem Sauerstoff (O₂). Die oxidative Phosphorylierung ist hierbei die chemische Reaktion, welche es ermöglicht, die meiste Energie in Form von ATP im Organismus bereit zu stellen. Gleichzeitig aber ist sie der Hauptproduzent für reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* – ROS), die zu Zellschäden auf verschiedenen Ebenen führen können. Als aerobes Bodenbakterium und Produzent von Aminosäuren in der Biotechnologie wird *C. glutamicum* sowohl in seiner natürlichen Umgebung als auch in Fermentationsprozessen mit oxidativem Stress konfrontiert. In dieser Arbeit wurden als ROS Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂), welches durch den Farbstoff Rose Bengal oder Natriumhypochlorit gebildet werden kann, verwendet. Bisher ist über Art und Ausmaß der oxidativen Schädigung, sowie zu möglichen Schutzmechanismen in *C. glutamicum* wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* sensitiv für ¹O₂ ist und vor allem die Membran geschädigt wird. Im Gegensatz dazu wird die DNA gut geschützt.

Mittels qualitativen und quantitativen Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass vor allem Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus modifizierte Proteine bei oxidativem Stress aufweisen, wohingegen Enzyme des Pentosephosphatweges vergleichsweise wenig modifizierte Peptide zeigen. Anhand von Fructosebisphosphat-Aldolase (FBA), Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) wurde der Einfluss von H₂O₂ und ¹O₂ auf biochemischer Ebene untersucht. Dabei zeigte sich, dass die GAPDH sensitiv gegenüber H₂O₂ ist, wohingegen die ICDH sensitiv gegenüber ¹O₂ ist. Zudem korreliert die Häufigkeit der oxidativen Modifizierung mit der Stärke des applizierten Stresses und der Verminderung der Enzymaktivität.

Es konnte ein schützender Effekt des proteinfreien Zellextraktes aus *C. glutamicum* festgestellt werden. Zudem wurde eine schützende Wirkung von freiem Methionin in Enzymtestansätzen identifiziert. Mycothiol-defiziente Mutanten zeigten eine starke Sensitivität gegenüber ¹O₂ gebildet durch Hypochlorit. Demnach scheinen insbesondere niedermolekulare Substanzen im Zytosol einen schützenden Effekt in *C. glutamicum* zu haben, wenn die enzymatische Abwehr nicht mehr ausreicht.

Physiological and biochemical studies on oxidative stress in *Corynebacterium glutamicum*

Through the emergence of photosynthetic living organisms on earth millions of years ago, there was an enrichment of molecular oxygen (O_2) in the atmosphere. Oxidative phosphorylation is the chemical reaction which provides the biggest amount of energy in the form of ATP for the organism. It is also the main producer for reactive oxygen species (ROS). As an aerobic soil bacterium as well as extensively used organism for amino acid production, *C. glutamicum* is confronted with oxidative stress in its natural environment as well as in the biotechnological application. This study is using as ROS, hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen (1O_2), which can be formed by the dye Rose Bengal or sodium hypochlorite. So far, little is known about the extent of oxidative damage and the protective mechanisms in *C. glutamicum*.

In this study it has been shown that *C. glutamicum* is sensitive to singlet oxygen, and that in particular, the membrane is damaged. In contrast, the DNA is well protected and *C. glutamicum* processes effective DNA repair mechanisms.

Using qualitative and quantitative proteomics, it has been shown that mainly enzymes of glycolysis and the citric acid cycle show oxidatively modified proteins, whereas in the pentose phosphate pathway, comparatively lower number of modified proteins occurs. Using fructose bisphosphate aldolase (FBA), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and isocitrate dehydrogenase (ICDH), the influence of hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen (1O_2) was studied at the biochemical level. The analyses revealed that GAPDH is sensitive to H_2O_2 whereas ICDH is sensitive to 1O_2 . Furthermore, there is a correlation between the frequency of oxidative modification, the extent of the applied stress and the reduction of the enzyme activity.

A protective effect of protein-free cell extract from *C. glutamicum* could be identified. It has been determined, a protective effect of methionine in enzyme assays. Mycothiol deficient mutants showed a strong sensitivity opposite 1O_2 derived from hypochlorite. Accordingly, particularly small molecules in the cytosol have a protective effect in *C. glutamicum* when enzymatic defense mechanisms are no longer sufficient.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis und Trivialnamen	V
1.	Einleitung	1
1.1.	Modellorganismus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
1.2.	Oxidativer Stress.....	1
1.2.1.	Reaktive Sauerstoffspezies	2
1.2.2.	Die Entstehung von ROS.....	2
1.3.	ROS bedingte Zellschäden	4
1.3.1.	ROS-Schäden an der DNA.....	4
1.3.2.	Der Einfluss von ROS auf Lipide.....	5
1.3.3.	Einfluss von ROS auf Proteine	6
1.4.	ROS-Abwehrmechanismen.....	8
1.4.1.	Wahrnehmung von ROS und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	8
1.4.2.	Enzymatischen ROS-Abwehrmechanismen.....	10
1.4.3.	Nicht-enzymatische ROS- Abwehrmechanismen	12
1.5.	Zielsetzung.....	15
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Chemikalien	16
2.2.	Verwendete Stämme.....	16
2.3.	Plasmide, genomische DNA und Oligonukleotide.....	17
2.4.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	19
2.4.1.	Komplexmedien für <i>E. coli</i>	19
2.4.2.	Komplexmedien für <i>C. glutamicum</i>	19
2.4.3.	Minimalmedien (MMI) für <i>C. glutamicum</i>	20
2.4.4.	Antibiotika und IPTG.....	21
2.5.	Kultivierungsbedingungen.....	21
2.5.1.	Stammhaltung	21
2.5.2.	Bestimmung des Wachstums von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	21
2.5.3.	Ermittlung von Wachstumsparametern.....	22
2.5.4.	Batch-Fermentation im Bioreaktor	22
2.5.5.	Unterschiedliche Sauerstoff Begasung des Bioreaktors.....	23
2.5.6.	Tropftestanalyse.....	23

Inhaltsverzeichnis

2.6.	Molekularbiologische Methoden	24
2.6.1.	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>	24
2.6.2.	Präparation von Plasmid-DNA	24
2.6.3.	Reinigung von PCR-Produkten	24
2.6.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA	24
2.6.5.	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.6.6.	Enzymatische Modifikation von DNA	25
2.6.7.	Visualisierung von DNA	26
2.6.8.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.6.9.	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitze-Schock	27
2.6.10.	Transformation von <i>C. glutamicum</i> nach Liebl <i>et al.</i> (1989)	27
2.6.11.	Transformation von <i>C. glutamicum</i> nach Eggeling und Bott (2005)	28
2.6.12.	Elektroporation von kompetenten <i>C. glutamicum</i> -Zellen	28
2.7.	Proteinbiochemische Methoden	29
2.7.1.	Überexpression von Genen heterologer Proteinen in <i>E. coli</i>	29
2.7.2.	Anaerobe Überexpression von Genen heterologer Proteinen in <i>E. coli</i>	29
2.7.3.	Zellaufschluss	29
2.7.4.	Erstellung proteinfreier Zellextrakte	30
2.7.5.	Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Strep-Tactin-Sepharose-Säule	30
2.7.6.	Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Strep-Tactin-Sepharose-Batch	31
2.7.7.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	31
2.7.8.	Trennung von Proteinen mittels Gelelektrophorese	32
2.7.9.	Coomassiefärbung von SDS-Gelen	32
2.7.10.	Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-Blot	32
2.7.11.	Oxyblot	33
2.7.12.	Photometrische Messung von Enzymaktivitäten	34
2.7.13.	Enzymtest Fructose-1,6-bisphosphate-Aldolase	34
2.7.14.	Enzymtest Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase	35
2.7.15.	Enzymtest Isocitrat-Dehydrogenase	35
2.8.	Fettsäureanalytik	35
2.9.	Lumineszenz Messungen	37
2.10.	Silikonölzentrifugation zur Bestimmung der Methioninkonzentration	37
2.11.	Massenspektrometrische Analysen	38

Inhaltsverzeichnis

2.12.	Bioinformatische Methoden	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf <i>Corynebacterium glutamicum</i>	41
3.1.1.	Physiologische Untersuchungen zu oxidativen Stress in <i>C. glutamicum</i>	41
3.1.2.	Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf DNA	45
3.1.3.	Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Fettsäurezusammensetzung der Lipide	47
3.1.4.	Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf Proteine	48
3.1.5.	Fermentation von <i>C. glutamicum</i> WT und Δ katA-Stamm mit steigendem O ₂ Anteil in der Zuluft.....	50
3.2.	Proteomanalysen.....	51
3.2.1.	Massenspektrometrische Analyse der Proben der Fermentation mit steigendem O ₂ Anteil in der Zuluft	51
3.2.2.	Proteomanalyse von gestressten Zellextrakten	53
3.2.3.	Proteomanalyse von gestressten Zellen.....	54
3.2.4.	Quantitative Proteomanalyse	57
3.3.	Einfluss von oxidativem Stress auf ausgewählte Enzyme	60
3.3.1.	Darstellung von oxidativ modifizierten Aminosäuren in 3D-Strukturmodellen.....	60
3.3.2.	FBA, GAPDH und ICDH in der quantitativen Proteomanalyse.....	63
3.3.3.	Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Enzymaktivität von Proteinen aus Zellextrakten	65
3.3.4.	Einfluss von ¹ O ₂ auf die Enzymaktivität von Proteinen aus Zellextrakten.....	67
3.3.5.	Massenspektrometrische Analysen der Zellextrakte aus den Enzymtests	68
3.3.6.	Aufreinigung der FBA, GAPDH und ICDH.....	72
3.3.7.	Einfluss von H ₂ O ₂ -Stress auf die gereinigte GAPDH und ICDH	73
3.3.8.	Einfluss von ¹ O ₂ auf die gereinigte GAPDH und ICDH.....	75
3.4.	Strategien zur Identifizierung von ROS-Schutzmechanismen in <i>C. glutamicum</i>	76
3.4.1.	ROS-Schutz durch die Überexpression der Alkylhydroperoxid-Reduktase (AhpCF) aus <i>E. coli</i> in <i>C. glutamicum</i>	76
3.4.2.	Verbesserung der ROS-Resistenz mittels Expression heterologer FBAs in <i>C. glutamicum</i>	77
3.4.3.	Der Einfluss von Mycothiol auf die ROS-Resistenz in <i>C. glutamicum</i>	82
3.4.4.	Einfluss proteinfreier Zellextrakte auf die Enzymaktivität	83
3.4.5.	Einfluss von Methionin auf die Enzymaktivität unter ROS-Stress	87
4.	Diskussion.....	89
4.1.	Einfluss von oxidativem Stress auf <i>Corynebacterium glutamicum</i> Zellkomponenten	89
4.1.1.	<i>C. glutamicum</i> ist sensitiv für Singulett-Sauerstoff	89

Inhaltsverzeichnis

4.1.2.	Zusammenhang oxidativer Stress und externer pH-Wert - Eisen(II) und Mangan(II) haben einen starken pH-abhängigen Einfluss auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	90
4.1.3.	<i>C. glutamicum</i> bietet einen ausreichenden Schutz der DNA	91
4.1.4.	Singulett-Sauerstoff reagiert mit Fettsäuren der Membranlipide	91
4.1.5.	<i>C. glutamicum</i> Proteine sind sensitiv für schwankende Sauerstoffkonzentrationen in der Fermentation	92
4.2.	Massenspektrometrische Analysen	94
4.2.1.	Die Schwierigkeit der qualitativen und quantitativen Proteomik und deren Nutzen	94
4.2.2.	Die Proteine der Glykolyse und des Citratzyklus werden bei der Anwesenheit von ROS mehr modifiziert als Proteine anderer Stoffwechselwege	95
4.3.	Einfluss von ROS auf ausgewählte Enzyme	97
4.3.1.	Die FBA ist ein sensitives Metalloenzym	97
4.3.2.	Die GAPDH ist ein wichtiger Regulator bei der oxidativen Stressantwort	98
4.3.3.	Die ICDH ist ein potentiell Ziel für die Xenobiotikatherapie	99
4.4.	ROS-Schutzmechanismen von <i>C. glutamicum</i>	102
4.4.1.	Die Expression heterologer FBAs führt zu keiner verbesserten ROS-Resistenz in <i>C. glutamicum</i>	102
4.4.2.	Niedermolekulare Substanzen im Zytosol schützen die Zelle vor oxidativem Stress	103
5.	Zusammenfassung	108
6.	Literaturverzeichnis	110
	Danksagung	
	Erklärung	
	Lebenslauf	

II. Abkürzungsverzeichnis und Trivialnamen

% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumeneinheit
%	Prozent
∅	Durchmesser
μ	Wachstumsrate
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
amu	atomic mass unit, Atomare Masseneinheit
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAME	bacterial acid methyl ester
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Carb	Carbenicillin
CIAP	(Kalbs-) intestinale alkalische Phosphatase
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
FBA	Fructosebisphosphat-Aldolase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
HK	Hauptkultur
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
LB	Luria Broth
Lux	Beleuchtungsstärke

Abkürzungsverzeichnis und Trivialnamen

max.	maximal
MMI	Minimalmedium I
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD _{xxx}	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	parts per million
psi	Pound-force per square inch, Pfund pro Quadratzoll
PTM	Postranslationale Modifikation
RB	Rose Bengal
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB	Super Optimal Broth
sog.	sogenannt
TAE	TRIS-EDTA-Acetat
<i>Taq</i>	<i>Thermococcus aquaticus</i>
TB	TRIS-Borate
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
VK	Vorkultur
vvm	Volumen Luft pro Volumen Medium und Minute
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Weiterhin wurden die üblichen Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems (système international d'unités, SI) verwendet.

1. Einleitung

1.1. Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein aerobes, Gram-positives und apathogenes Bodenbakterium. Der Name der Familie *Corynebacteriaceae* leitet sich von dem griechischen Wort *coryne* (Keule) ab, welches das keulenförmige Aussehen der Bakterien beschreibt. Zusammen mit den pathogenen Stämmen *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* wird *C. glutamicum* den mycolsäurehaltigen Actinomyceten zugeordnet [Minnikin, 1982; Stackebrandt *et al.*, 1997].

C. glutamicum wurde bei einer Untersuchung zur Identifizierung von aminosäurebildenden Bakterien entdeckt [Kinoshita *et al.*, 1957]. Seitdem wird es vor allem für die großtechnische Produktion von L-Glutamat und L-Lysin eingesetzt [Leuchtenberger *et al.*, 2005]. Anwendung finden diese Produkte in der Nahrungsmittel- und in der Futtermittelindustrie.

Sowohl in seiner natürlichen Umgebung, als auch in der biotechnologischen Anwendung wird *C. glutamicum* mit Sauerstoff konfrontiert. Sobald Sauerstoff vorhanden ist, tritt oxidativer Stress auf. Dieser kann Auswirkungen haben, die von oxidativer Modifikation verschiedener Zellkomponenten bis hin zum Zelltod führen, was wiederum Auswirkungen auf die Ausbeute in Fermentationsprozessen hat. Bisher gibt es keine Untersuchungen zu oxidativem Stress in *C. glutamicum*. Daher ist es wichtig, die Folgen von oxidativem Stress in *C. glutamicum* und die dort vorhandenen Schutzmechanismen zu verstehen. Zudem können Strategien entwickelt werden, welche den Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS) verbessern. Dies könnte auch für die großtechnische Aminosäureproduktion relevant sein.

1.2. Oxidativer Stress

Als oxidativem Stress bezeichnet man eine Stoffwechsellage, die durch eine hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet ist. Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen werden im Rahmen von aeroben Stoffwechselfvorgängen gebildet. Dabei handelt es sich sowohl um freie Radikale als auch um stabile Oxidantien. ROS bewirken oxidative Proteinmodifikationen, Lipidperoxidationen und DNA-Schädigungen. Aerobe Organismen haben Mechanismen entwickelt, um diese Stressbedingungen zu tolerieren. Die Zellen können sich auf enzymatischem und nicht-enzymatischem Wege vor

ROS schützen, u.a. durch Katalase oder Superoxiddismutase sowie durch die Akkumulation niedermolekularer Substanzen.

1.2.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Zu den ROS gehören zum einen, freie Radikale wie das Superoxid-Anion (O_2^-), das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($OH\bullet$), das Peroxylradikal ($ROO\bullet$) und das Alkoxyradikal von Lipiden ($RO\bullet$), zum anderen stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3) und die Hypochlorit-Anion (OCl^-) sowie angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff (1O_2)). Durch die Reaktion von Superoxid mit Stickstoffmonoxid ($NO\bullet$) kann Peroxonitrit ($ONOO^-$) entstehen. Diese Verbindungen werden als reaktive Stickstoffspezies bezeichnet (RNS) und stellen zusammen mit ROS reaktive Oxidantien dar [Halliwell, 2008].

1.2.2. Die Entstehung von ROS

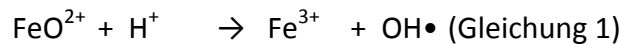
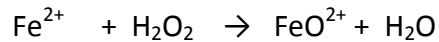
Die Bildung von ROS findet in erster Linie in der Atmungskette beim einwertigen Elektronentransfer statt. Sauerstoff kann frei über die Membran diffundieren und gelangt so in die Zelle. Dieser kann die Elektronen von Redoxsystemen entziehen und reaktive Sauerstoffformen insbesondere Superoxid bilden [Ligeza *et al.*, 1998]. Durch eine fehlerhafte Übertragung der Elektronen in der Atmungskette (NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und Cytochrom-c-Reductase (Komplex III)) auf O_2 ist die Atmungskette die Hauptquelle für O_2^- [Korshunov *et al.*, 2006]. Redoxzyklus-Antibiotika, sog. Xenobiotika, bilden H_2O_2 [Pryor, 1982; Imlay, 2008].

Wasserstoffperoxid ist deutlich stabiler als Superoxid. Es sind FAD-abhängige Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen (Flavoenzyme) bekannt, die in erster Linie H_2O_2 als Produkt bilden [Massey *et al.*, 1969]. Da H_2O_2 keine Ladung besitzt, kann es frei über die Membran diffundieren [Seaver *et al.*, 2001]. Somit steigt der H_2O_2 -Stress, sobald dieses im extrazellulären Raum vorhanden ist. Zudem kann H_2O_2 durch chemische umweltbedingte Prozesse sowie durch photochemische Mechanismen gebildet werden [Imlay, 2008].

Weiter wird H_2O_2 durch die NADPH-Oxidasen gebildet, welche bei der Wundheilung von Pflanzen und in Säugetiermakrophagen aktiv sind. Ebenso spielt es bei der Abwehr von Pathogenen durch Pflanzen, Tiere und Bakterien eine entscheidende Rolle [Imlay, 2008]. Im Laufe der Evolution haben sich Bakterien die Bildung von ROS zu Nutze gemacht um deren ökologische Nische zu verteidigen, indem sie selbst die reaktiven Sauerstoffformen

ausscheiden und gleichzeitig sehr gute Schutzmechanismen gegen ROS ausbilden. Lactobacillen schützen sich vor ROS, indem sie andere Proteine ausbilden, die resistenter gegenüber ROS sein könnten [Archibald, 1981].

Wasserstoffperoxid kann mit intrazellulären Fe^{2+} durch die Fenton-Reaktion (siehe Gleichung 1) Hydroxyl-Radikale bilden [Henle *et al.*, 1999; Imlay *et al.*, 1988].



Außerdem kann $\text{OH}\cdot$ auch bei der photolytischen Spaltung von Wasserstoffperoxid gebildet werden. Das Hydroxyl-Radikal ist die neutrale Form des Hydroxyl-Ions (OH^-). Das Hydroxyl-Radikal entsteht in der Atmosphäre aus Ozon und Wassermolekülen beim Auftreffen von UV-Strahlen. Die entstehenden Hydroxyl-Radikale besitzen einen sehr geringen Reaktionsradius und schädigen nur Ziele in nächster Nähe [Korycka-Dahl, 1978].

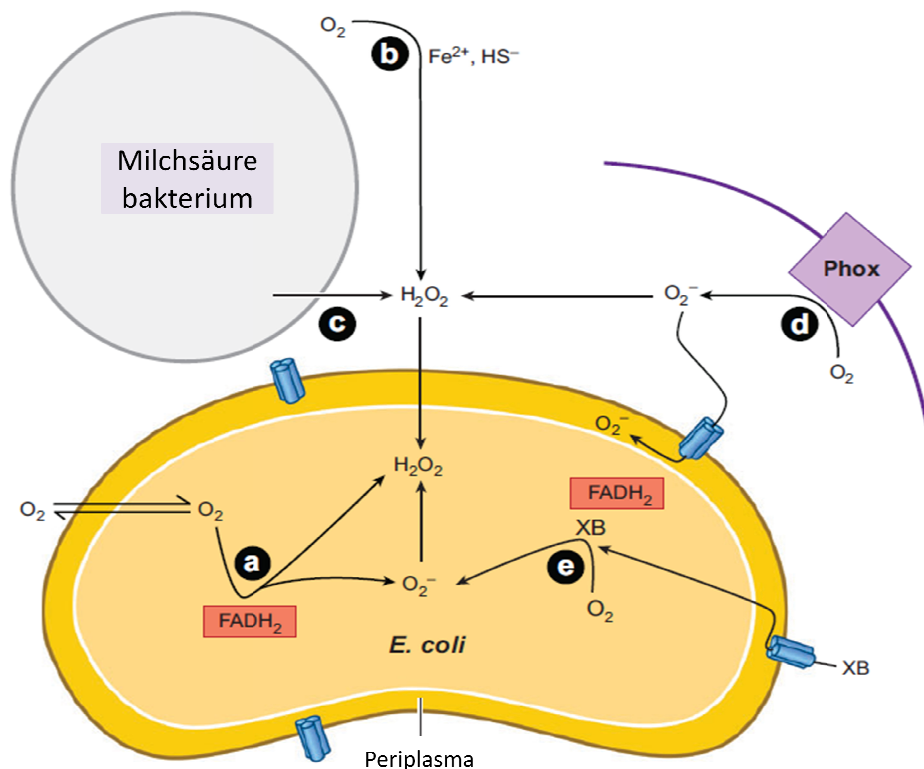


Abbildung 1: Quellen für oxidativen Stress nach Imlay, 2008. a) Intrazelluläre Enzymautooxidation. b) umweltbedingte Redoxreaktionen. c) H_2O_2 -Abgabe durch konkurrierende Mikroben. d) Phagosomale NADPH-Oxidase. e) Redoxzyklus Antibiotika (Xenobiotika).

Bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Natriumhypochlorit (NaOCl) entsteht zunächst die instabile Peroxohypochlorige Säure, die schnell in Chlorwasserstoff bzw. Natriumchlorid und Singulett-Sauerstoff zerfällt [Lechtken, 1974]. Singulett-Sauerstoff kann

neben NaOCl auch mit Hilfe geeigneter Farbstoffe, wie Rose Bengal, Methyleneblau oder Eosin, auf photochemischem Weg dargestellt werden [Lechtken, 1974]. Insbesondere Lebewesen, die einen Photosyntheseapparat besitzen, können bei der Anwesenheit von Sauerstoff und Licht Singulett-Sauerstoff bilden [Berghoff *et al.*, 2011].

Sauerstoff besitzt zwei unterschiedlich angeregte Zustände, die beide eine deutlich größere Energie als der Grundzustand besitzen. Bei beiden Zuständen sind die Spins der Elektronen antiparallel ausgerichtet. Der stabilere angeregte Sauerstoff wird, nach der quantenmechanischen Bezeichnung für diesen Zustand, Singulett-Sauerstoff genannt. Die beiden Singulett-Zustände unterscheiden sich dadurch, ob sich die beiden Elektronen in einem oder beiden π^* -Orbitalen befinden [Hasegawa, 2008; Shinkarenko, 1981].

1.3. ROS bedingte Zellschäden

1.3.1. ROS-Schäden an der DNA

DNA kann auf unterschiedliche Weise durch ROS modifiziert werden, meistens jedoch werden die Basen oxidiert. Auf die DNA wirkt $\text{HO}\bullet$ sehr reaktiv, $^1\text{O}_2$ greift in erster Linie Guanin an und O_2^- sowie H_2O_2 haben nur einen geringen Anteil an den oxidativen Schäden der DNA [Wiseman, 1996]. Die am häufigsten vorkommende Basenmodifikation ist die Umwandlung von Guanin zu 8-Hydroxyguanin (siehe Abbildung 2, [Møller, 2007]). DNA kann auch indirekt durch Malondialdehyd (MDA), ein Abbauprodukt mehrfach ungesättigter peroxidiertes Fettsäuren modifiziert werden (siehe Absatz 1.3.2). Dabei reagiert MDA mit Guanin und bildet einen extra Ring, dabei entsteht Pyrimido[1,2-*a*]-purin-10(3H)-eins (M_1G) (siehe Abbildung 2, [Møller, 2007; Jeong *et al.*, 2005]).

DNA oxidation

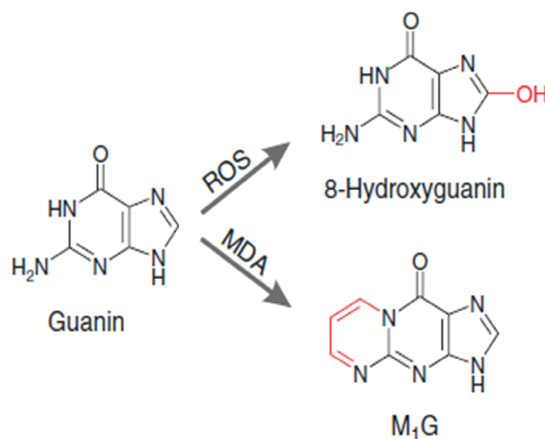


Abbildung 2: Modifizierung der Base Guanin durch ROS und MDA. Guanin wird durch die Anwesenheit von ROS zu 8-Hydroxyguanin umgewandelt. Mit MDA reagiert Guanin zu M_1G (Pyrimido[1,2-*a*]-purin-10(3H)-eins). Oxidative Modifikationen sind rot dargestellt [nach Møller, 2007].

H₂O₂ kann mit intrazellulärem Fe²⁺, das an die DNA assoziiert ist, durch die Fenton-Reaktion an der DNA Schaden verursachen [Henle *et al.*, 1999; Imlay *et al.*, 1988].

Oxidativer Stress kann ebenfalls zu Einzelstrangbrüchen (*Single Strand Breaks* - SSB) oder Doppelstrangbrüchen (*Double Strand Breaks* - DSB) führen [Passos *et al.*, 2007]. Der durch ROS verursachte Schaden an der DNA ist nicht vollkommen zufällig und Mutationsballungen an bestimmten Hotspots können beobachtet werden [Helliwell, 1999].

1.3.2. Der Einfluss von ROS auf Lipide

Die am häufigsten auftretende Reaktion von ROS mit Lipiden ist die Lipidperoxidation. Sie findet nur bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*Polyunsaturated fatty acids* - PUFAs) statt. Bei der Lipidperoxidation reagieren ROS mit Elektronen von Lipiden. Dabei wird eine Kettenreaktion gestartet, die zur Zellschädigung führt. Insbesondere OH• und ¹O₂ reagieren mit PUFAs und bilden dabei Lipid-Hydroperoxid und ein neues Fettsäure-Radikal, so dass der Vorgang von Neuem beginnen kann. In erheblichem Maße führt die PUFA-Peroxidation zu einer verringerten Fluidität der Membran, erhöht die Durchlässigkeit und bedingt sekundäre Schäden an Membranproteinen [Helliwell, 2006]. Verschiedene Aldehyde wie z.B. 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) und Malondialdehyd (MDA), sowie Hydroxyl- und Ketofettsäuren werden als Resultat der PUFA-Peroxidation gebildet (siehe Abbildung 3).

PUFA oxidation

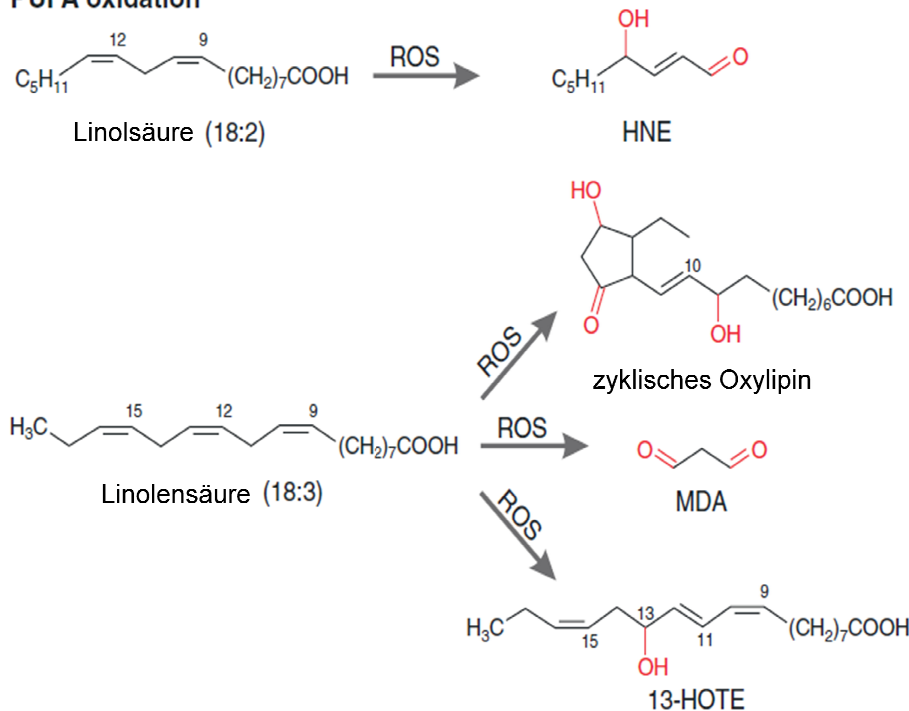


Abbildung 3: Oxidation von PUFAs. Linolensäure (18:2) reagiert mit ROS zu HNE (4-Hydroxy-2-Nonenal). Linolensäure (18:3) reagiert mit ROS zu MDA (Malondialdehyd), sie kann aber auch zu zyklischem Oxilipin und 13-HOTE (13-Hydroxyoctadecatrienoic acid) oxidiert werden. Oxidative Modifikationen sind rot dargestellt [nach Møller, 2007].

Die Produkte des Aldehydabbaus können mit DNA und Proteinen weiter reagieren [Halliwell, 1999]. ROS können aber auch mit einfach ungesättigten Fettsäuren reagieren und diese ebenfalls zu Hydroperoxiden oxidieren [Frankel, 1980].

1.3.3. Einfluss von ROS auf Proteine

Die Oxidation von Proteinen reicht von der Modifikation einzelner Aminosäuren bis hin zur Degradation des Proteins. Die meisten Modifikationen der Proteinoxidation sind irreversibel, wobei eine wenige Modifikationen an denen schwefelhaltige Aminosäuren beteiligt sind, reversibel sind [Ghezzi *et al.*, 2003]. Cystein und Methionin sind sehr reaktiv, insbesondere mit $^1\text{O}_2$ und $\text{HO}\bullet$, wohingegen H_2O_2 eher nur mit Cysteinen reagiert [Møller, 2007]. Die Oxidation von Thiol zu einem Disulfid (R1-S-S-R2, Cystine), welches durch unterschiedliche ROS gebildet werden kann, ist ein sehr wichtiger metabolischer Redoxregulationsmechanismus. Die Cystine können durch das Thioredoxin und das Glutaredoxinsystem wieder reduziert werden. Cysteinsäure ist das höchste Oxidationslevel von Cystein. Diese Modifikation ist irreversibel und schädlich für das Protein, da die Cysteinsäure nicht wieder reduziert werden kann und das Enzym u.U. dadurch inaktiviert wird [Ghezzi *et al.*, 2003].

Die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid ist eine weitere reversible Modifikation. Diese Modifikation kann durch das Enzym Methioninsulfoxid-Reduktase (MsrA) rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz dazu steht die Oxidation von Methionin zu Sulfon, welche irreversibel ist und dem Protein schadet [Møller, 2007].

Neben den oxidativen Reaktionen, die schwefelhaltige Aminosäuren beinhalten, sind Carbonylierungen die am häufigsten vorkommenden oxidativen Modifikationen. Es gibt keine Anzeichen dafür, dass Carbonylierungen reversibel sind [Shacter, 2000]. Die Oxidation von Arginin, Histidin, Lysin, Prolin, Threonin, und Tryptophan, welche in erster Linie durch $^1\text{O}_2$ und $\text{OH}\bullet$ katalysiert werden, ergibt freie Carbonylgruppen, die mittels Dinitrophenolhydrazin (DNPH) detektiert werden können [Levine *et al.*, 1994; Davies, 2004, Xu und Chance, 2005]. Die Oxidation von Tryptophan ist eine weitere irreversible Reaktion. Diese führt von N-Formylkynurenin zu Kynurenin [Shacter, 2000].

Neben den AS Modifikationen kann es zur Oxidation des Proteinrückgrats kommen. Der oxidative Angriff erfolgt durch die $\text{OH}\bullet$ -abhängige Abstraktion eines Wasserstoffatoms eines Aminosäurerestes und der Bildung eines zentralen Kohlenstoffradikals. Dieses wiederum

Einleitung

reagiert mit O₂ zu einem Alkylperoxyl Radikal, welches in vielen Schritten zu einem Hydroxyl-Proteinderivat werden kann. Diese Reaktion wird meist durch Fe²⁺ katalysiert. Das Proteinradikal kann zusammen mit anderen Proteinradikalen zu einer Protein-Protein Vernetzung führen [Berlett, 1997]. Zudem kann es über das Hydroxyl-Proteinderivat durch den Diamin- oder α-Amidation-Stoffwechselweg zur Peptidfragmentierung kommen. Die Spaltung der Peptidbrücken kann auch durch den ROS-Angriff auf Glutamat-, Aspartat- und Prolinseitenketten geschehen [Garrison, 1987].

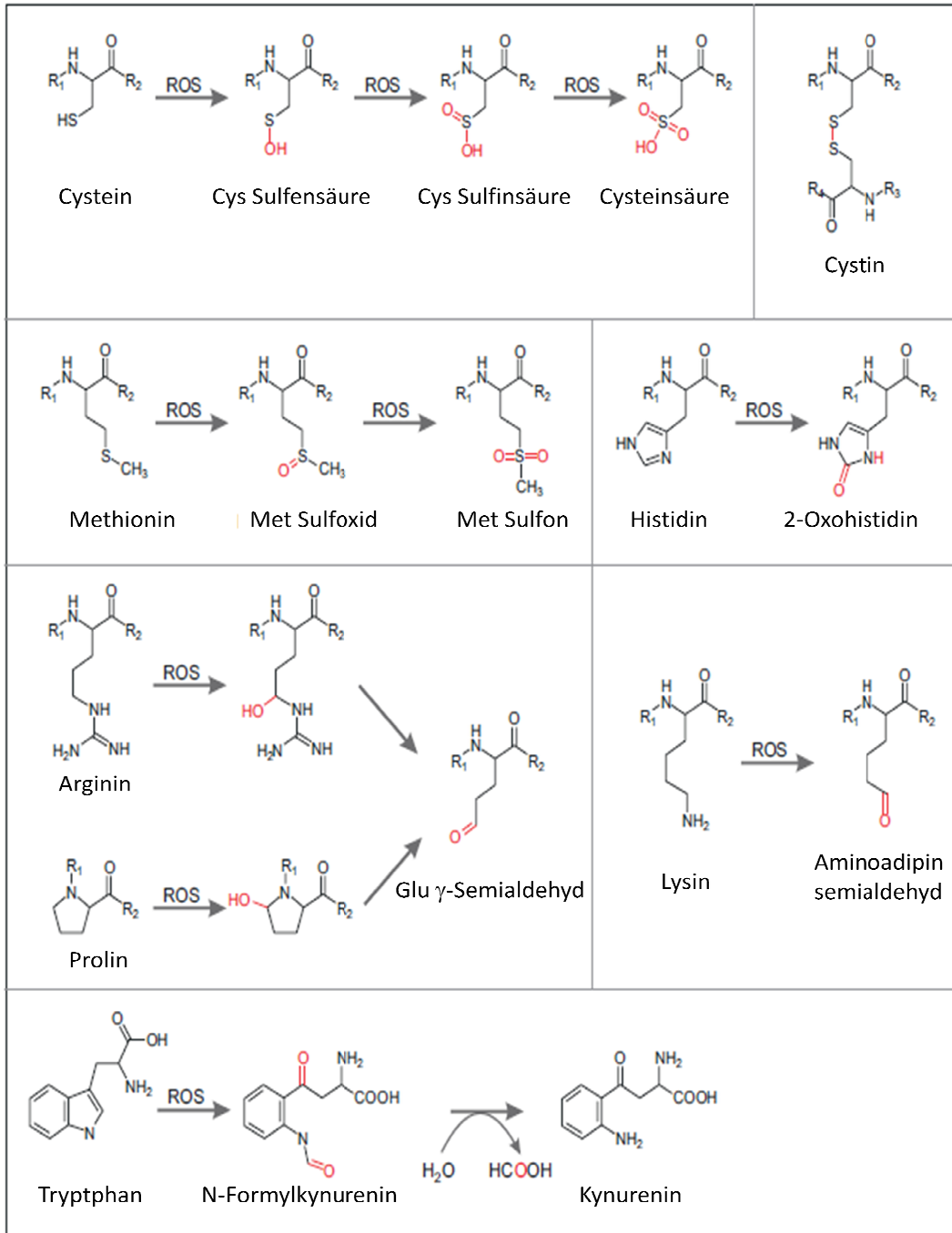


Abbildung 4: Oxidative Protein Modifikationen. Oxidation von Cystein, sowie die Bildung von Cystin. Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid und Sulfon. Carbonylierung von Histidin, Arginin Prolin und Lysin. Tryptophan Oxidation von N-Formylkynurenin zu Kynurenin. Oxidative Modifikationen sind rot dargestellt [nach Møller, 2007].

Darüber hinaus inaktivieren H_2O_2 und O_2^- eine Enzymfamilie von Dehydratasen durch Oxidation der freizugänglichen Eisen-Schwefel-Cluster ($[\text{4Fe-4S}]^{2+}$) [Flint *et al.*, 1993; Jang und Imlay, 2007; Møller, 2007]. Als Konsequenz sind die katabolen und biosynthetischen Wege, welche von diesen Enzymen abhängen, nicht mehr funktionsfähig.

1.4. ROS-Abwehrmechanismen

Um sich vor oxidativem Stress zu schützen, besitzen Mikroorganismen eine effektive ROS-Stressantwort. Zu der ROS-Stressantwort gehört die Detektion reaktiver Sauerstoffspezies, enzymatische Schutzmechanismen, wie z.B. die Katalase und die Superoxiddismutase, und der Schutz durch niedermolekulare Substanzen, wie z. B. die Akkumulation von Mangan und Antioxidantien.

1.4.1. Wahrnehmung von ROS und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Über die ROS-Detektion in der Zelle ist in *C. glutamicum* noch nicht viel bekannt. In anderen Bakterien beispielsweise in *E. coli* ist die Wahrnehmung von ROS bereits sehr gut untersucht. Dieser Abschnitt befasst sich mit der Aktivierung von ROS-abhängigen Transkriptionsfaktoren wie SoxR und OxyR und Sigmafaktoren wie SigR. Zudem werden Transkriptionsfaktoren vorgestellt, die in *C. glutamicum* bereits für die oxidative Stressantwort bekannt sind.

Bakterien antworten auf Superoxid- und Hydrogenperoxid-Stress mit der Expression unterschiedlicher Enzyme [Pomposiello, 2001]. Es gibt zwei unterschiedliche Familien von redoxabhängigen Transkriptionsfaktoren. SoxR und SoxS sind für die Antwort auf O_2^- verantwortlich, wohingegen OxyR für die Antwort auf H_2O_2 -Stress verantwortlich ist [Imlay, 2008]. Superoxid modifiziert das Eisen-Schwefel-Cluster von SoxR, welches nicht mehr an die DNA bindet und somit die Expression von SoxS induziert. Die steigende Menge an SoxS bewirkt eine erhöhte Expression von mehr als einem Duzend Proteinen in *E. coli*, wie z.B. *nfo* (Endonuklease, wichtig für die DNA-Reparatur), *sodA* (Superoxiddismutase), *fpr* (NADPH-Ferredoxin-Reduktase) und *zwf* (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) [Greenberg *et al.*, 1990; Ding *et al.*, 1996; Storz und Imlay, 1999].

OxyR gehört zur LysR Transkriptionsfaktor-Familie, welche sich durch ein Helix-Turn-Helix-Motiv auszeichnet [Schell, 1993]. Zudem besitzt OxyR zwei sehr reaktive Cysteine (Cys199 und Cys208). Bei H_2O_2 -Stress bilden die Thiole Disulfidbrücken aus und aktivieren den

Transkriptionsfaktor [Zeng *et al.*, 1998]. Zu den Genen, die OxyR in *E. coli* aktiviert, gehören z.B. *dps* (DNA-Bindeprotein), *gorA* (GSH-Reduktase), *grxA* (Glutaredoxin), *katG* (Katalase/Peroxidase), *ahpCF* (Alkyl Hydroperoxid NADPH Oxidoreduktase), *fur* (Eisenaufnahme Regulator) und *oxyS*, eine kleine regulatorische RNA, welche in der DNA-Reparatur benötigt wird [Christman *et al.*, 1985; Storz und Imlay 1999; Zheng *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005]. *OxyS* ist in Mykobakterien ein negativer Regulator für *katG* [Li und He, 2012]. Der Transkriptionsfaktor PerR, ein *fur*-ähnliches Protein, ist in *E. coli* beschrieben, die Peroxidase/Katalase zu aktivieren. In *Streptococcus aureus* und *Bacillus subtilis* übernimmt er den Platz von OxyR. Zudem induziert PerR in diesen Organismen die Transkription von *dps* und *metQIN* (Methionintransporter) [Lee und Helmann, 2006; Zhang *et al.*, 2012].

In *S. coelicolor* bindet der zinkabhängige Antisigmafaktor RsrA an den ECF Sigmafaktor SigR (σ^R). Bei oxidativen Stress bilden die Cysteine in SigR Disulfidbrücken aus, so dass dieser sich lösen kann und die Transkription induziert [Kang *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2004]. Es sind 44 SigR Zielgene bekannt, dazu gehören: *trxB*, *trxC* (Thioredoxproteine), *mshA* (das erste Enzym der Mycothiolsynthese), *mrx* (Mycoredoxin), *cysM* (Protein der Cysteinproduktion) und *msrA*, *msrB* (Proteine der Methioninreduktion) [Park und Roe, 2008; Kallifidas *et al.*, 2010]. Diese Stressantwort ist insbesondere wichtig für den Thiol-Metabolismus der Zelle, da Thiolgruppen sehr reaktiv gegenüber ROS sind und die oxidierten Thiole schnellst möglich durch reduzierte Thiolgruppen ersetzt werden sollten.

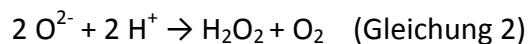
Für die oxidative Stressantwort in *C. glutamicum* ist ein σ^M Transkriptionsfaktor beschrieben worden, welcher bei der Regulation unter oxidativen und Hitzestress beteiligt ist [Nakunst *et al.*, 2007].

Ebenso besitzt *C. glutamicum* *whiB*-artige Enzyme, WhcE und WhcA. WhiB ist ein Transkriptionsfaktor in *Actinobacteria*, welcher für die Zellteilung verantwortlich ist. WhcE spielt eine positive Rolle in der oxidativen Stressantwort und aktiviert die *trxB* Gene für die Thioredoxinreduktase [Kim *et al.*, 2005] Dagegen zeigt *whcA* eine negative Rolle in der oxidativen Stressantwort, da Zellen, die *whcA* überexprimieren, ein schlechtes Wachstum zeigen und sensitiver gegenüber Sauerstoff sind. Desweiteren scheint es einen Zusammenhang in der oxidativen Stressantwort und der Aktivierung von DtxR, welcher der Eisenmetabolismus Regulator ist, zu geben [Wennerhold und Bott, 2006; Kim und Holmes, 2012].

1.4.2. Enzymatischen ROS-Abwehrmechanismen

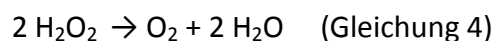
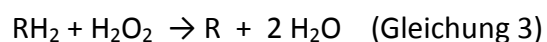
Der folgende Abschnitt befasst sich mit den enzymatischen ROS-Abwehrmechanismen. Zu diesen gehören die weitverbreiteten Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Peroxidase und Katalase, welche zum Teil in *C. glutamicum* ebenfalls eine Rolle spielen. Anschließend werden enzymatische ROS-Abwehrmechanismen vorgestellt, die Organismen spezifisch sind, wie die Alkylhydroperoxid-Reduktase und die Glutathionperoxidase und nicht in *C. glutamicum* vorkommen. Des Weiteren wird auf den schützenden Effekt von ROS resistenteren Isoenzymen eingegangen.

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ein sehr leistungsfähiges antioxidatives Metalloenzym, welches die Dismutation von Superoxid zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert (siehe Gleichung 2) um die O_2^- -Konzentration in der Zelle gering zu halten.



E. coli besitzt zwei zytoplasmatische SODs, MnSOD und FeSOD. Die Menge an SOD ist in *E. coli* fünfmal höher als eigentlich für den Abbau von O_2^- benötigt wird [Imlay *et al.*, 1991]. *E. coli* SOD-Mutanten zeigen Wachstumsdefekte unter aeroben Bedingungen [Carlioz *et al.*, 1986]. Im Gegensatz dazu konnte bei *C. glutamicum* durch Proteomanalyse nur eine Mangan-abhängige SOD identifiziert werden. In *C. glutamicum* konnte keine SOD-Mutante hergestellt werden, daher wird davon ausgegangen, dass die Deletion der SOD letal sein könnte [Marin, persönliche Mitteilung].

Die Peroxidase oxidiert Wasserstoffperoxid zu zwei Molekülen Wasser (siehe Gleichung 3), wohingegen die Katalase zwei Moleküle Wasserstoffperoxid zu molekularem Sauerstoff und zwei Molekülen Wasser umwandelt (siehe Gleichung 4).



In *C. glutamicum* konnte bisher keine Peroxidase gefunden werden, allerdings ist ein *katA* Gen vorhanden, welches für eine Katalase kodiert. Pathogene Vertreter der *Corynebacteriaceae* und *Actinobacteria* besitzen sowohl eine Katalase als auch eine Peroxidase.

Der *E. coli* Wildtyp stellt sein Wachstum nach Zugabe von geringen Konzentrationen im μM -Bereich an exogenem H_2O_2 ein [Imlay, 2008]. Zudem zeigen *E. coli* Katalase/Peroxidase-

Mutanten eine Sensitivität gegenüber mikromolaren Mengen an H₂O₂ [Park *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2007]. *C. glutamicum* dagegen wächst nach Applikation von 100 mM exogenem H₂O₂ nach kurzer lag-Phase mit gleicher Wachstumsrate weiter [Seiferling, 2009].

Es besteht ein Zusammenhang zwischen extremen pH-Werten und oxidativem Stress [Follmann *et al.*, 2009]. *C. glutamicum* kann eine effektive pH-Homöostase bei einem externen pH-Wert von 6 – 9 betreiben. Bei der Anzucht von *C. glutamicum* in Minimalmedium konnten bei pH 6 6,5 µM H₂O₂, unter neutralen Bedingungen 2,2 µM H₂O₂ und bei pH 9 0,9 µM H₂O₂ detektiert werden. Durch die Kombination von Proteom- und Transkriptom-Analysen konnte gezeigt werden, dass Eisen-abhängige Enzyme wie die Succinat-Dehydrogenase, die Aconitase oder Katalase bei pH 6 reprimiert werden. Die gleichen Gene wurden jedoch bei einem alkalischen pH stark induziert [Follmann *et al.*, 2009]. Dies hat zur Folge, dass es bei einem sauren pH zu oxidativem Stress kommen kann, da die Katalase weniger gebildet wird bzw. weniger Cofaktor zur Verfügung hat.

Untersuchungen an einer *C. glutamicum* Katalasemutante (Δ katA) zeigten jedoch ein starkes Wachstumsdefizit bei pH 9. Durch Zugabe von externer Katalase konnte eine Komplementation erzielt werden. Dies lässt vermuten, dass unter alkalischen Bedingungen oxidativer Stress in Form von H₂O₂ auftritt. Die zuvor gemessenen geringen Mengen an H₂O₂ bei pH 9 sind darauf zurück zu führen, dass die Katalase hier den Großteil des gebildeten H₂O₂ sofort abfängt [Seiferling, 2009].

Die Alkylhydroperoxid-Reduktase (AhpC) schützt u.a. *E. coli*, *B. subtilis* und verschiedene Mykobakterien vor H₂O₂ [Ferrante *et al.*, 1995; Antelmann *et al.*, 1996; Dhandayuthapani *et al.*, 1996]. AhpC gehört zu den Peroxiredoxinen und katalysiert die Reaktion von Hydroperoxiden zu dem entsprechenden Alkohol, wobei es selbst an einem Cystein oxidiert wird (siehe Gleichung 5).



Ein weiteres Schutzenzym ist die Glutathionperoxidase, welche die Glutathion-abhängige Reaktion von H₂O₂ zu H₂O katalysiert (siehe Gleichung 6). Diese Enzym kommt unter anderen in *E. coli* und *Neisseria meningitidis* vor [Aho und Kelly 1995; Arenas *et al.*, 2010].

Zudem bildet *E. coli* bei oxidativen Stress weniger sensitive Isoenzyme von ROS sensitiven Enzymen, wie der Fumerase und der Aconitase [Liochev, 1992; Cunningham *et al.*, 1997].

1.4.3. Nicht-enzymatische ROS-Abwehrmechanismen

Neben den enzymatischen ROS-Abwehrmechanismen, sind niedermolekulare Substanzen beschreiben, die die Zelle vor oxidativen Stress schützen sollen [Daly *et al.*, 2010]. In diesem Abschnitt wird der schützende Einfluss von Mangan und Aminosäuren beschreiben. Anschließend werden in Bakterien vorkommende Antioxidantien wie Pyrrolochinolinchinon Glutathion und dessen Analoga vorgestellt.

Studien an unterschiedlichen Mikroorganismen haben gezeigt, dass Mangan Zellen bei oxidativen Stress schützen kann [Imlay, 2008]. In vielen Enzymen kann Mangan als Cofaktor genutzt werden, bindet aber mit geringerer Affinität als Eisen [Andreini *et al.*, 2008]. Mangan ist ein essentieller Cofaktor u.a. der Mangan-abhängigen SOD. Desweiteren konnte bei SOD-Mutanten von *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* ihr schlechtes Wachstum durch Zusetzen von Mangan verbessert oder ausgeglichen werden [Al-Maghrebi *et al.*, 2002; Inaoka *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2005].

Der Zusatz von Mangan erlaubt *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria gonorrhoeae* eine bessere Toleranz gegenüber sonst letalen millimolaren Konzentrationen von H_2O_2 [Tseng *et al.*, 2002; Seib *et al.*, 2004].

Mangan scheint gleichermaßen mit H_2O_2 und O_2^- zu reagieren und eine ähnlich schützende Funktion zu besitzen wie die Katalase [Berlett *et al.*, 1990]. Neben der Katalase wird von dem OxyR-Transkriptionsfaktor nach dessen Aktivierung durch H_2O_2 in *E. coli* das Gen *mntH* induziert. Es codiert den einzigen Mangan Importer [Kehres *et al.*, 2000]. Wenn dieser Importer ausgeschaltet wird, erhöht sich die Sensitivität vieler Mikroorganismen gegenüber H_2O_2 .

Bei pH 9 findet in *C. glutamicum* eine intrazelluläre Akkumulation von Mangan statt [Marin, persönliche Mitteilung]. *C. glutamicum* Wildtyp zeigte jedoch unter Manganmangel bei pH 9 ein besseres Wachstum [Seiferling, 2009].

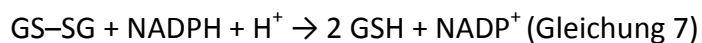
Das extremophile Bakterium *Deinococcus radiodurans* ist nicht nur gegen ionisierende Strahlung nahezu völlig unempfindlich, sondern es ist auch für seine gute Resistenz gegenüber ROS bekannt. Neben der Akkumulation von Mangan bei oxidativem Stress, akkumuliert es zu seinem Schutz eine Anzahl von niedermolekularen Substanzen, wie z.B. unterschiedliche Aminosäuren und Nukleotide [Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2010].

Insbesondere freies Methionin kann in der Zelle akkumuliert werden, um mit ROS zu reagieren. Manche Enzyme besitzen an der Oberfläche exponiert Methionine, die mit ROS

reagieren und so funktional wichtige AS-Reste schützen [Levine *et al.*, 1996]. Die Methioninsulfoxid-Reduktase (MsrA, MsrB) kann einfach oxidiertes Methionin wieder reduzieren [Stadtman *et al.*, 2003]

Ein weiteres kleines redoxaktives Molekül ist Pyrrolochinolinchinon (PQQ). Es wird meist als Cofaktor für verschiedene prokaryotische Dehydrogenasen genutzt und gehört zu der Klasse der B-Vitamine [Kasahara und Kato, 2003]. In *Klebsiella pneumoniae* sind sechs Enzyme an der Biosynthese von PQQ beteiligt [Velterop *et al.*, 1995]. PQQ ist besonders effektiv im Schutz vor O_2^- und OH^\bullet [Hara *et al.*, 2007]. *C. glutamicum* besitzt keine Gene zur Herstellung von PQQ.

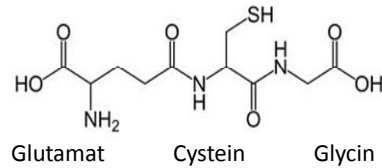
Zudem ist bekannt, dass *B. subtilis* durch Bacillithiol geschützt wird. Diese wurde zuerst als unbekanntes Thiol in *Bacillus anthracis* gefunden [Nicely *et al.*, 2007]. Es ist ein reichlich in verschiedenen *Bacillus* Species, in *Staphylococcus aureus* und *Deinococcus radiodurans* vorhandenes Thiol [Newton *et al.*, 2009]. Bacillithiol ist ein Glykosid aus Cysteinyl-D-glucosamin und Malat und wirkt hauptsächlich als Antioxidans (siehe Abbildung 5). Bacillithiol wie sein strukturähnliches Mycothiol sind Analogons zu Glutathion, welches in Eukaryotenzellen aber auch in *E. coli* als Antioxidans vorkommt [Fuchs und Warner, 1975]. Es katalysiert die Reaktion des Thiols des Cysteins mit Peroxiden und wird dabei zu Glutathion-Disulfid (siehe Gleichung 6). Die Glutathion-Reduktase reduziert das oxidierte Glutathion in Abhängigkeit von NADPH, so dass der Zyklus von Neuem beginnen kann (siehe Gleichung 7).



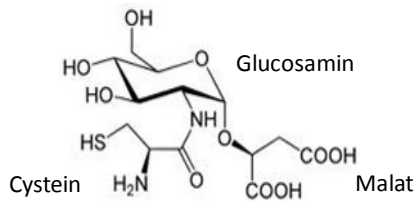
Mycothiol, welches als Glutathion-Analogon in Actinomyceten gebildet wird, besteht aus einem Cysteinrest, welcher mit der Aminogruppe an Glucosamin acetyliert ist, welches wiederum mit einem Inositol verbunden ist (siehe Abbildung 5) [Newton *et al.*, 2008].

Es sind vier Proteine an der Biosynthese von Mycothiol in *C. glutamicum* beteiligt (*mshA*, *mshB*, *mshC*, *mshD*) [Feng *et al.*, 2006]. Enzyme, die an der Biosynthese von Mycothiol beteiligt sind und Enzyme die von Mycothiol abhängig sind, sind gute Ziele für Antibiotika bei der Behandlung von Tuberkulose [Rawat, 2007; Newton *et al.*, 2002].

Glutathion (GSH)



Bacillithiol (BSH)



Mycothiol (MSH)

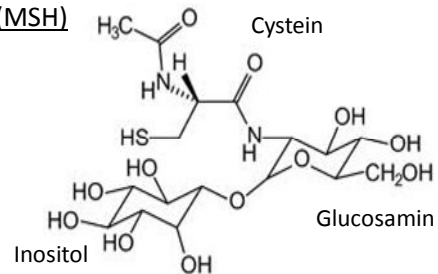


Abbildung 5: Strukturformen von Glutathion (GSH), Bacillithiol (BSH) und Mycothiol (MSH)

Diese chemischen Thiol-Verbindungen können nicht nur miteinander reagieren, sondern auch mit funktional wichtigen Cysteine in Proteinen um diese vor ROS zu schützen. In *Bacillus subtilis* werden Proteine bei oxidativem Stress bacillithioliert und somit inaktiviert. Wenn der oxidative Stress vorbei ist, werden diese Proteine durch die Thioldisulfid Isomerase (YphP) reduziert und sind wieder aktiv [Chi *et al.*, 2011]. Dieses Prinzip der Mycothiolierung ist auch bei Actinomyceten beschrieben [Bzymek *et al.*, 2007].

Die ausgeprägte Vielfalt und die Komplexität der ROS-Abwehrmechanismen zeigen, dass der ROS-Schutz in der Zelle eine wichtige Rolle spielt und somit oxidativer Stress häufig auftritt.

1.5. Zielsetzung

C. glutamicum wird in seiner natürlichen Umgebung wie auch in der biotechnologischen Anwendung ständig mit oxidativem Stress konfrontiert. Bislang ist in diesem Organismus über das Ausmaß der oxidativen Schädigung und der Einfluss des intrazellulären Schutzes kaum etwas bekannt.

Im ersten Teil der Arbeit soll die Auswirkung von ROS auf physiologischer und biochemischer Ebene untersucht werden. Diese Fragestellung soll unter Zuhilfenahme einer Katalasemutante ($\Delta katA$) beantwortet werden. Dabei sollen unterschiedliche Zellkomponenten wie DNA, Lipide und Proteine betrachtet werden. Das Hauptaugenmerk soll auf der oxidativen Modifikation von Proteinen liegen, die mittels Oxyblot und massenspektrometrischen Analysen identifiziert werden. Enzyme, die sich als gute Ziele von ROS erwiesen haben, sollen daraufhin biochemisch genauer untersucht werden, indem der Einfluss von ROS, insbesondere H_2O_2 und 1O_2 , auf die Enzymaktivität betrachtet wird.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen mittels der identifizierten Enzyme Strategien ausgearbeitet werden, wie die ROS-Resistenz in *C. glutamicum* verbessert werden kann. Dies soll anhand enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen geschehen. Es wird ein gutes Verständnis des zelleigenen ROS-Schutzsystems angestrebt. Die Ergebnisse dieser Arbeit können darüber hinaus für die großtechnische Aminosäureproduktion relevant sein.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Merck (Darmstadt) verwendet.

2.2. Verwendete Stämme

Die Tabelle 1 gibt die, in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämme, sowie relevante Genotypen wieder.

Tabelle 1: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032, Wildtyp (WT)	Abe <i>et al.</i> , 1967
<i>C. glutamicum</i> pEKEEx2	ATCC 13032 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEEx2, Km ^r	Diese Arbeit
ikatA	ATCC 13032 mit pDrive-Insertion im Gen <i>cg0310</i> Km ^r	Ochrombel, 2011
ΔkatA	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cg0310</i>	Rückert, unveröffentlicht
Δfba	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cg3068</i>	Wendisch
ΔgapB	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cg1069</i>	Wendisch
Δzwf	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cg1778</i>	Wendisch
ΔmshC	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cg1709</i>	Feng <i>et al.</i> , 2006
ΔmshD	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cg2847</i>	Feng <i>et al.</i> , 2006
Δfba_pEKEEx2_cg	Δfba mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEEx2_fba aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
Δfba_pEKEEx2_dr	Δfba mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEEx2_fba aus <i>Deinococcus radiodurans</i>	Diese Arbeit
Δfba_pEKEEx2_sg	Δfba mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEEx2_fba aus <i>Streptococcus gordonii</i>	Diese Arbeit
Δfba_pEKEEx2_pa	Δfba mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEEx2_fba aus <i>Propionibacterium acnes</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

<i>Deinococcus radiodurans</i>	ATCC 13939, Wildtyp	Anderson <i>et al.</i> , 1956
<i>E. coli</i>		Escherich , 1885
DH5αMCR	<i>endA1 supE44 thi-1 λ-recA1 gyrA96 relA1 deoRΔ(lacZYA-argF) U169 Φ80ΔlacZ ΔM15mcrA Δ(mmrhsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
BL21	BL21 <i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal</i>	Studier <i>et al.</i> , 1986
BL21_pASK-IBA-3 FBA	BL21 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pASK-IBA-3_fba aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
BL21_pASK-IBA-3 ICDH	BL21 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pASK-IBA-3_icdh aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
BL21_pASK-IBA-3 GAPDH	BL21 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pASK-IBA-3_gapdh aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit

2.3. Plasmide, genomische DNA und Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle 2 sind die, in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEKEx2	Km ^r f1 ori	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEx2_katA	pEKEx2 mit <i>cg0310</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ahpCF	pEKEx2 mit <i>ahpCF</i> aus <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_fba_cg	pEKEx2 mit <i>cg3068</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_fba_dr	pEKEx2 mit <i>fba</i> aus <i>D. radiodurans</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_fba_sg	pEKEx2 mit <i>fba</i> aus <i>S. gordonii</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_fba_pa	pEKEx2 mit <i>fba</i> aus <i>P. acnes</i>	Diese Arbeit
pASK-IBA3	Amp ^r , TetA Promotor/Operator, Strep-Tag am C-Terminus	IBA, Göttingen, Deutschland
pASK-IBA-3 fba	pASK-IBA-3 mit <i>cg3068</i>	Diese Arbeit
pASK-IBA-3 icdh	pASK-IBA-3 mit <i>cg0766</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

pASK-IBA-3 gapdh	pASK-IBA-3 mit <i>cg1791</i>	Diese Arbeit
------------------	------------------------------	--------------

Tabelle 3: Verwendete genomische DNA

Stamm	Eigenschaft	Herkunft
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032, Wildtyp	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>	MG1655, Wildtyp	Gryer, 1981
<i>D. radiodurans</i>	ATCC 13939, Wildtyp	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
<i>S. gordonii</i>	ATCC 10558, Wildtyp	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
<i>P. acnes</i>	ATCC 6919, Wildtyp	DMSZ, Braunschweig, Deutschland

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) sowie deren Basensequenzen aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und in H₂O gelöst (100 nmol/ml). Primer, die zum Sequenzieren verwendet wurden, wurden auf 10 nmol/ml verdünnt.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
fba-3-cglÜex	CCGGAATTCATTACTTAGAGGTGGTC
fba-5-cglÜex	TACGGATCCAGGAGACACCTTATGCCTATCGCAACT
fba-3-drÜex	ATAGAGCTCCTTAGGCTTTGCCGACGCT
fba-5-drÜex	GCCGGATCCAGGAGACACCCTATGCTCGTTACCGT
fba-3-sgÜex	GGGGAATTCGCTAGATTAAGCTTTACC
fba-5-sgÜex pEKEXFBAPACfor	CGCGGATCCAGGAGACCGATATGGCAATCGTTTCA ATCGGATCCAGGAGACACCTTATGCCATCGCAACACC
pEKEXFBAPACrev	TGAGAATTCTCAGGCGCTGACCGAAGTACC
IBA3-FBA-CGL rev	GATCTGCAGCTTAGAGGTGGTCTTTC
IBA3_ICD-cg-for	GGTGAATTCAAGGAGACTCATGGCTAAGAT
IBA3_ICD-cg-rev	ATAGTCGACCTTCTTCAGTGCGTCAACGAT

Material und Methoden

GAPAforEcoRI	GTGGAATTCATGACCATTCGTGTTGGTAT
GAPArevBAMHI	AGAGGATCCGAGCTTGGAAAGCTACGA
katA for	CGCGTCGACAGGAGATAGATGTCTGAGAAGTCAGCAGC
katA rev	CACGAATTCTTAGTGGTGATGGTGATGATGAGCCTTCTTCTGGAG
Ahpcffor	AGGATCCAGGAGAATGCATCATCACCATCACCACGGAGGAGGAAT
Ahpcfrev	GCCGGTACCTTATGCAGTTTTGGTGCGAATCAGGT
ahpcfsequ	TCTCTGGACCTGGTTGGTAA
pEKEx2for	ATCGGCTCGTATAATGTG
pEKEX2rev	CCGCTTCTGCGTTCTGATTT
IBA3for	GAGTTATTTTACCACTCCCT
IBA3rev	CGCAGTAGCGGTAAACG

2.4. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.4.1. Komplexmedien für *E. coli*

Als Komplexmedium wurden LB (Luria Broth) - Medium verwendet [Rowland *et al.*, 1984].

LB-Medium (1 l):

Trypton 10 g

Hefeextrakt 10 g

NaCl 5 g

Diesem Medium wurden 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt.

2.4.2. Komplexmedien 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.

2.4.3. Minimalmedien (MMI) für *C. glutamicum*

Für die Kultivierung in Mikrotiterplatten, in Schüttelkolben sowie in Bioreaktoren wurde MMI (Mineralsalzmedium I, Kase und Nakayama, 1972) verwendet. Zur Herstellung dieses Mediums wurden 916 ml einer Stammlösung angefertigt und autoklaviert.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
Harnstoff	5 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	2 g

(pH 7,5 KOH)

Die restlichen Bestandteile wurden getrennt angesetzt und sterilisiert.

Glukose	80 ml	20 % (w/v)
CaCl_2 ,	1 ml	1 % (w/v)
MgSO_4	1 ml	1 % (w/v)
Biotin	1 ml	0,02 % (w/v)

Spurenelementlösung (1 l)

$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,2 mg

1 ml wurde zu 1 l Medium gegeben.

Diesem Medium konnten für die Herstellung von Agarplatten 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt werden. Für die Einstellung bestimmter pH-Werte wurden jeweils 250 mM Puffersubstanz hinzugefügt:

MES: pH 6,0

MOPS: pH 7,5

CHES: pH 9,0

2.4.4. Antibiotika und IPTG

Alle Antibiotika und IPTG (siehe Tabelle 5) wurden in H₂O gelöst, steril filtriert (Whatman 0,45 µm WCN Cellulose Nitrate Filter) und den sterilen Medien (für Agarplatten auf ca. 60 °C abgekühlt) zugegeben. Die Aufbewahrung fand bei –20 °C statt.

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stock
Kanamycin	25 mg x ml ⁻¹
Carbenicillin	25 mg x ml ⁻¹
IPTG	238 mg x ml ⁻¹

2.5. Kultivierungsbedingungen

2.5.1. Stammhaltung

Zur Stammhaltung von *C. glutamicum* und *E. coli* wurden Gefrierkulturen in Roti®-Store Cryoröhrchen (Roth, Karlsruhe) verwendet und die Cryokulturen bei –80 °C aufbewahrt. Kurzzeitige Lagerung fand bei 4 °C auf Komplexmedium-Agarplatten für 6 Wochen statt.

2.5.2. Bestimmung des Wachstums von *E. coli* und *C. glutamicum*

Die Zelldichte wurde durch die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt, wofür ein Spektrometer (Novaspec II; Pharmacia Biotech Inc. Uppsala, S) verwendet wurde. Flüssigkulturen von *E. coli* wurden bei 37 °C in einem New Brunswick Scientific Co. Ltd. G-25 Inkubator Schüttler bei 400 rpm inkubiert.

Für Vorkulturen von *C. glutamicum*-Stämmen wurden stets 5 ml Vollmedium im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie beimpft und 7-8 h schüttelnd inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden je 10 ml Minimalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,5 angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Übernachtskulturen dienten zum Animpfen von Minimalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,5. Diese Kulturen wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und für weitere Experimente verwendet. Die Kultivierung im Schüttelkolben erfolgte bei 30 °C mit einer Schüttelfrequenz von 125 rpm. Es kamen 100-, 250-, 500-, und 2000-ml Schüttelkolben mit seitlichen Schikanen zum Einsatz, die mit 1/10 Kulturflüssigkeit befüllt wurden. Für Wachstumstests auf Festmedium wurden je 2 µl Kultur

der exponentiellen Phase auf OD_{600} 0,2 eingestellt und in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten getropft, bei 30 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert.

2.5.3. Ermittlung von Wachstumsparametern

Die Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit g einer Kultur wurden aus dem Auftrag des Logarithmus der gemessenen optischen Dichte bei 600 nm (x) gegen die Zeit (t) bestimmt. Im Bereich des exponentiellen Wachstums ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung die Wachstumsrate zu ermitteln ist. Dieser Wert dient der Berechnung der Verdopplungszeit. Angewandt wurden die nachstehenden Formeln.

Wachstumsrate: $\mu = m / \log e$

Steigung: $m = \log x_t - \log x_0 / t - t_0$

Verdopplungszeit: $g = \ln 2 / \mu$

2.5.4. Batch-Fermentation im Bioreaktor

Zur Kultivierung im gerührten Bioreaktor dienten 2-Liter-Fermenter mit angeschlossener Biostat B-Reglereinheit (Sartorius BBI Systems, Melsungen). Die Temperaturregulation der Bakterienkultur wurde über einen wassergefüllten Außenmantel des Bioreaktors sichergestellt. Verschiedene Anschlussstutzen (DN19 und DN25) 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 μ m Sterilfilter des Typs Midisart2000 (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. Bei den Fermentationen betrug das Arbeitsvolumen 1,5 l. Die Temperatur wurde bei 30 °C konstant gehalten. Um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde eine Rührerdrehzahl von 400-1200 rpm und eine Begasungsrate von 1 vvm gewählt. Hiermit wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) stets über 30 % Sättigung gehalten. Der pH-Wert der Kultur wurde durch automatische Zugabe von 15 % H_2SO_4 und 5 M NaOH auf einen gewünschten Wert zwischen pH 6 und pH 9 eingestellt. Für die Analyse des O_2 - und CO_2 -Gehalts in der Abluft wurde das Gerät BCP regular mit PA 6 Gehäuse

(BlueSens, Herten) verwendet. Die Datenerfassung und die Datenverarbeitung erfolgten mit Hilfe des Softwarepaketes MFCS (Sartorius BBI Systems, Melsungen).

Bei der Probenherstellung von Sauerstoff gestressten Proben, wurden die Zellen im Bioreaktor bis zu einer OD_{600} von ca. 7 angezogen und die Luftzufuhr ausgeschaltet. Nach 1 h Inkubation ohne Zuluft wurde diese wieder angeschaltet und die Zellen 1 h inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben für die Proteomanalysen entnommen.

2.5.5. Unterschiedliche Sauerstoff Begasung des Bioreaktors

Um den Einfluss von erhöhten O_2 -Konzentrationen zu untersuchen, sollte die O_2 -Konzentration in der Zuluft variiert und die CO_2 - sowie N_2 -Konzentration konstant gehalten werden. Dies wurde durch den Einsatz einer Gasmischbatterie erreicht, welche aus drei Massendurchflussreglern und einer Steuereinheit (Westphal, Haan) besteht. Ein Regler arbeitet mit Luft bzw. N_2 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.

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 O_2 Konzentrationen zwischen 0 und 100 % (v/v) appliziert werden.

2.5.6. Tropftestanalyse

C. glutamicum wurde ÜN in einer MMI Medium VK angezogen. Morgens wurde eine HK mit OD_{600} 1 angeimpft. In der exponentiellen Phase wurden die Zellen auf eine OD_{600} 0,2 verdünnt und weitere Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-4}) hergestellt. Diese wurden daraufhin mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 15 min inkubiert. Mittels Zugabe von Katalase wurde das H_2O_2 entfernt und die Zellen auf eine BHI-Agar-Platte zu je 2 μ l aufgetragen. Bei der Untersuchung zur Wirkung von Rose Bengal wurden unterschiedliche Konzentrationen Rose Bengal (1 – 10 μ M) in die BHI-Agar-Platte gegeben und die Verdünnungen der Zellen aufgetropft.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Für die Isolation genomischer DNA wurden 5 ml ÜN-Kultur von *C. glutamicum* verwendet. Die Zellen wurden 5 min für 5000 rpm zentrifugiert und zweimal mit TE-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 5 ml TE mit 15 mg Lysozym resuspendiert. Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 3 ml Lysis Puffer, 220 µl 19 % SDS und 150 µl Proteinase K Lösung dazugegeben und bei 60 °C für 2 h inkubiert. Es wurden 2 ml gesättigte NaCl-Lösung auf den Ansatz gegeben und 15 min bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ethanol abs. gefällt. Mittels einer gebogenen Pasteurpipette wurde die DNA gefischt. Diese wurde in 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in TE gelöst.

TE-Puffer :

TRIS/HCL pH 7,8	10 mM
EDTA	1mM

Lysis-Puffer:

TRIS/HCL pH 8,2	10 mM
NaCl	400 mM
EDTA	2 mM

2.6.2. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) nach Protokoll des Herstellers eingesetzt.

2.6.3. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Ansätzen wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Anleitung durchgeführt. PCR-Ansätze wurden vor der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und Restriktionsansätze vor der Ligation von DNA gereinigt.

2.6.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Ultraspec 2100pro, Amersham Biosciences, München). Eine Absorption von 1,00 ist äquivalent zu einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml. Verunreinigungen

der DNA durch Proteine konnten durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm ermittelt werden.

2.6.5. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in vitro*-Methode zur Vervielfältigung eines definierten Stücks DNA. Kurze Oligonukleotide dienen als Startmoleküle für die Polymerase und gleichzeitig als Marker für den zu amplifizierenden DNA-Bereich. Die Polymerase aus *Thermococcus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) wurde für Kolonie-PCR zur Überprüfung von Mutanten verwendet. Für alle PCR, deren Amplifikate für Klonierungen verwendet werden sollten, wurde die *Phusion*-Polymerase verwendet. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm wurden nach Angabe der Hersteller der Polymerasen zusammengesetzt bzw. programmiert. Die Nukleotide stammten von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Die Dauer der Synthesephase richtete sich nach der Länge des erwünschten Amplifikats und der verwendeten Polymerase.

2.6.6. Enzymatische Modifikation von DNA

Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde stets nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland und New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland). Die Restriktionsansätze wurden Agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Behandlung von DNA mit *Bal31* Nuklease

C. glutamicum Zellen wurden ÜN in 5 ml BHI angezogen und morgens in 5 ml BHI mit einer OD_{600} 1 angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} 5 angezogen und dann mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 (15 min) und Rose Bengal (10 min und 1000 Lux) inkubiert. Daraufhin wurde die genomische DNA isoliert (2.6.1). Die Konzentration der DNA wurde bestimmt (2.6.4). Für diesen Versuch wurden 1 µg genomische DNA eingesetzt und *Bal31* Nuklease (0,2 Units) zugegeben. Die *Bal31* Nuklease (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland) ist eine hochspezifische Einzelstrang Endonuklease, welche insbesondere an Kerben, Lücken und Einzelstrangbereichen doppelsträngiger DNA schneidet. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert in einem Endvolumen von 20 µl.

Die Reaktion wurde bei 75 °C für 10 min inaktiviert und auf Eis aufbewahrt. Die DNA wurde anschließend mittels Gel-Elektrophorese (2.6.7) mittels eines 0,8 % (w/v) Agarose-Gels analysiert.

Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Vektoren können vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase behandelt werden, um die Wahrscheinlichkeit der Rezirkularisierung zu vermeiden. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse der Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA. Den Restriktionsansätzen wurden nach dem Verdau 2,5 U alkalische Phosphatase zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung des 3'-Hydroxy- und des 5'-Phosphat-Endes einer Ribonukleinsäure durch das Enzym T4-DNA-Ligase. Vektor- und Insert-DNA wurden im Verhältnis 1:3 oder 1:1 in einem Gesamtvolumen von 8 µl in Reinstwasser eingesetzt. Die Ligrationsreaktion erfolgte für 30 min bei RT.

2.6.7. Visualisierung von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA Fragmenten. Die Agarose-Konzentration im Gel betrug 1 % in TAE-Puffer (w/v), die Proben wurden vor dem Auftragen mit Beschwererlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versehen.

Zur Größenbestimmung von DNA wurde der 1 kb DNA-Marker GeneRuler (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 1 × TAE-Puffer. Die angelegte Spannung war konstant zwischen 80 und 110 Volt.

TAE-Puffer:

TRIS/HCL pH 8,5	40 mM
EDTA	10 mM
Essigsäure	20 mM

2.6.8. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Präparation kompetenter Zellen wurden 250 ml LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 gezogen und abzentrifugiert (10 min, 7.000 × g, 4 °C). Die Zellen wurden in 80 ml Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert,

10 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (10 min, $7.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Pellet wurde vorsichtig in 15 - 20 ml TB aufgenommen und DMSO in einer Endkonzentration von 7 % hinzugegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und das Abfüllen von Aliquots, die in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert wurden.

Transformationspuffer :

PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM
pH 6,7	

SOB-Medium:

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
A. dest.	990 ml

SOC-Medium:

wie SOB mit Glukose	20 mM
MgCl ₂ 1 M	10 ml

2.6.9. Transformation von *E. coli* durch Hitze-Schock

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde mit dem Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 500 μl steriles LB-Medium hinzugegeben und die Kultur für 60 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 rpm inkubiert. Für die Selektion transformierter Klone mit Hilfe der vektorbasierenden Resistenz wurden 50 - 100 μl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert.

2.6.10. Transformation von *C. glutamicum* nach Liebl *et al.* (1989)

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl *et al.* (1989) hergestellt. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren (4 g/l Isonicotinsäurehydrazid,

25 g/l Glycin und 1 g/l Tween-80) 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 RT mit 200 rpm schüttelnd über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Zellen nach 10-minütiger Inkubation auf Eis bei 4500 rpm, 4 °C, 10 min geerntet, um dann zweimal in eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen und anschließend in 1 ml einer 1%igen Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden danach zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese konnten dann bei –80 °C bis zur Transformation aufbewahrt werden.

2.6.11. Transformation von *C. glutamicum* nach Eggeling und Bott (2005)

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Eggeling und Bott (2005) hergestellt. 50 ml BHIS Medium wurden mit *C. glutamicum* Zellen beimpft und ÜN bei 30 °C angezogen. 2 ml der Vorkultur wurden verwendet um 100 ml BHIS zu inokulieren und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,75 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C für 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurden in 20 ml TG Puffer resuspendiert und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde mit 20 ml 10%igen Glycerin resuspendiert und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 10%igen Glycerin resuspendiert und zu 150 µl aliquotiert und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.6.12. Elektroporation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2-5 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mM Elektrodenabstand (peQLab, Erlangen) überführt. Daraufhin wurden die Zellen 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. Die Zellen wurden dann 90-120 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert und auf BHI Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

2.7. Proteinbiochemische Methoden

2.7.1. Überexpression von Genen heterologer Proteinen in *E. coli*

Zur Produktion von heterologen Proteinen wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet. Alle Medien enthielten das entsprechende Antibiotikum und die Kultivierung fand bei 37 °C statt. Die Überexpressionsplasmide wurden BL21(DE3)-Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten über Nacht inkubiert. Von diesen Platten wurde eine LB-Vorkultur mit 5 - 10 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 125 rpm kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde die Expressionskultur in einem Verhältnis von 1/10 angeimpft und bis zu einer OD_{600} 0,8 – 1 bei 125 rpm kultiviert. Anschließend wurde zur Induktion der Expression Anhydrotetracyclin (AHT, 2 µg/ml) zugegeben. Bei den verwendeten pASK-IBA-Vektoren steht die Transkription der klonierten Gene unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotors, diese kann durch das nicht antibiotisch wirkende Analogon AHT induziert werden. Nach der Induktion wurden die Kulturen 6 h kultiviert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (10 min, 6500 x *g*) geerntet. Das Zellpellet konnte dann bei -20 °C eingefroren und gelagert werden.

2.7.2. Anaerobe Überexpression von Genen heterologer Proteinen in *E. coli*

Nachdem die *E. coli* BL21 Zellen induziert worden waren, wurden diese in einen 2 l Kolben ohne Schikane überführt und 6 h mit 125 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Das Ernten erfolgt wie in 2.7.1 beschreiben.

2.7.3. Zellaufschluss

Aufschluss mittels French Press

Alle Schritte des Zellaufschlusses wurden ausschließlich auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Für die Reinigung der Strep-Tag-Fusionsproteine wurde das Pellet der Expressionskultur zunächst in 15 - 25 ml Waschpuffer I (100 mM TRIS/HCl, pH 8, 150 mM NaCl) mit 0,1 mg DNaseI/ml (Roche, Mannheim) und 2 mM DTT aufgenommen. Die Zellen wurden mittels FRENCH®-Press-Zelle (SLM Aminco, USA) bei einem Druck von 18000 x psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 15000 x *g* für 20 min abzentrifugiert.

Aufschluss mittels Fastprep

Für Oxyblotanalysen, Enzymtests von Zellextrakten und Experimente zur Wirkung niedermolekularer Substanzen auf Proteine wurden Zellextrakte von *C. glutamicum*, *E. coli*

und *D. radiodurans* hergestellt. Dazu wurden Zellen in Aufschlusspuffer (100 mM TRIS/HCl und 150 mM NaCl, mit 2 -5 mM DTT) resuspendiert und anschließend mittels einer FastPrep® (Thermo-Savant) durch schnelles Schütteln mit Glasperlen (\varnothing 0,2 – 0,3 mm) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm für 30 min abzentrifugiert.

Aufschluss mittels Lysepuffer

Der Zellaufschluss durch Lysepuffer wurde durchgeführt, um Proteine anaerob aufzureinigen und anaerobe proteinfreie Zellextrakte zu erhalten. Die geernteten Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen mit Aufschlusspuffer (100 mM TRIS/HCl und 150 mM NaCl, mit 5 mM DTT) resuspendiert. Der Suspension wurde eine kleine Spartelspitze Lysozym, 0,5 – 1 U DNase pro ml Zellsuspension und Protease Inhibitor Cocktail (nach Angabe des Herstellers) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße und im anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products Inc., Michigan/USA) für 1 h inkubiert. Danach konnten die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min bei $1.300 \times g$) von den löslichen Proteinen abgetrennt werden.

2.7.4. Erstellung proteinfreier Zellextrakte

Aus *C. glutamicum*, *E. coli* und *D. radiodurans* sollten proteinfreie Zellextrakte hergestellt werden. Um die Oxidation der Proben zu verhindern wurde der Aufschluss unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen wie in 0 beschrieben im anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products Inc., Michigan/USA) aufgeschlossen und abzentrifugiert. Um die Proteine zu inaktivieren, wurden die Überstände für 15 min bei 95 °C gekocht. Diese wurden erneut bei $20000 \times g$ für 30 min zentrifugiert und der Überstand für Enzymtest und Oxyblots verwendet

2.7.5. Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Strep-Tactin-Sepharose-Säule

Für die affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen wurden die Proteine mit einem Affinitäts-Tag ausgestattet. Beim verwendeten pASK-IBA-Vektor wurde der Proteinsequenz entweder N- oder C-terminal die Plasmid-kodierte Strep-Tag II-Sequenz angefügt. Diese besteht aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK) und wird durch die starke Interaktion mit der Strep-Tactin-Matrix (IBA GmbH, Göttingen) zur Reinigung von

rekombinanten Proteinen eingesetzt. Diese Interaktion beruht prinzipiell auf der Bindung von Biotin an Avidin.

Alle Schritte der Proteinaufreinigung wurden ausschließlich auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Der Gesamtproteinextrakt, welcher durch den Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation gewonnen wurde, konnte direkt auf eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule aufgetragen werden. Nach der Bindung der Proteine an die Matrix wurde die Säule zunächst mit 15 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer II (100 mM TRIS/HCl, pH 8, 500 mM NaCl) und anschließend mit 5 SV Waschpuffer I (100 mM TRIS/HCl, pH 8) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 mM Desthiobiotin in Waschpuffer I. Die Elutionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7.6. Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Strep-Tactin-Sepharose-Batch

Dieser Ansatz wurde überwiegend für die Reinigung von Enzymen unter anaeroben Bedingungen gewählt. 1 ml Strep-Tactin-Matrix wurde in 2 - 15 ml Gefäßen gegeben und daraufhin 4 min bei 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde die Matrix mit 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Das Proteinlysate der aufgeschlossenen *E. coli*-Zellen (siehe Abschnitt 2.9.2) wurde auf der Strep-Tactin-Sepharose für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz 4 min bei 200 rpm zentrifugiert. Der erste Waschschrift erfolgte durch die Zugabe von 1 - 10 ml Waschpuffer II (100 mM TRIS/HCl, pH 8, 500 mM NaCl) sowie anschließender Inkubation von 15 - 30 min und erneuter Zentrifugation. Die folgenden Schritte umfassten wie beschrieben den gleichen Hergang, die zweite Waschung mit 1 - 10 ml Waschpuffer I. Die Elution wurde mit jeweils 0,250 - 0,5 ml Elutionspuffer (5 mM Desthiobiotin) für 5 min inkubiert und 3 min abzentrifugiert und der Überstand entnommen.

2.7.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen von Lösungen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Hilfe des Roti[®]-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Kalibrierung der Proteinkonzentration diente Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*).

2.7.8. Trennung von Proteinen mittels Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht erfolgte in 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (1970) in „Mini-Gel-Twin“-Kammern (Biometra, Göttingen). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 4x-SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert, um eine vollständige Bindung des SDS an die Proteine zu gewährleisten. Die Proteine wurden bei maximal 30 mA aufgetrennt. Als Größenstandard diente der PageRuler™ plus (Fermentas, St. Leon-Roth). Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Gele anschließend einer Coomassie-Färbung (2.7.9) oder einer Western Blot-Analyse (2.7.10) unterzogen.

4x-SDS-Probenpuffer:

SDS	8 %
TRIS/HCl, pH 6,8	200 mM
Glycerin	40 %
B-Mercaptoethanol	4 %
Bromphenolblau	0,04 %

2.7.9. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese einer Coomassie-Färbung (Sambrook *et al.*, 1989) unterzogen. Dabei wurden die Protein-Gele für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Serva Blue R, 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) geschüttelt. Anschließend wurden die Gele in 10 % Essigsäure entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren.

2.7.10. Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) angewandt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden sie mit Hilfe eines Western Blots auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dazu musste die Membran wenige Minuten in 100 % Methanol inkubiert, in Transferpuffer (10 mM CAPS, 10 % Methanol, pH 11,0 NaOH) äquilibriert und dann in eine Blotapparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) auf einen Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Whatman 3 mm-Papieren (Schleicher und Schüll, Dassel) gelegt werden. Darauf wurde das Protein-Gel gelegt und mit einem weiteren Stapel aus fünf Whatman-Papieren bedeckt. Der

Proteintransfer auf die Membran erfolgte durch angelegten Strom von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Oberfläche für 1 h. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte durch eine dreiminütige reversible Proteinfärbung der Membran mit Ponceau-Rot (0,2 % in 2%iger Essigsäure). Daraufhin wurde die Membran zunächst für 1 h in Blockierungslösung (1-3 % BSA in Western Blot Waschpuffer PBS-T inkubiert. Dann wurde der erste Antikörper (Anti-His 1:1000 oder Anti-Strep 1:5000 (Qiagen, Hilden)) hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Western Blot Waschpuffer für je 20 min, wurde die Blockierungslösung mit dem entsprechenden zweiten Antikörper (Anti-Maus 1:10000 (Sigma)) auf die Membran gegeben und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ oder für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde auf die Membran ein NBT/BCIP-Gemisch (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in Entwicklungspuffer gegeben und im Dunkeln bis zur gewünschten Signalstärke inkubiert.

10x PBS-T (1l):

KH_2PO_4	3,44 g
Na_2HPO_4	32 g
NaCl	77 g
Tween-80	10 ml

pH mit KOH auf 7,0 einstellen

Entwicklungspuffe:

TRIS/HCl (pH 9,4)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl_2	5 mM

2.7.11. Oxyblot

Um Carbonylierungen in Proteinen nach zuweisen, wurde der Oxyblot (Millipore, Bedford, USA) verwendet. Die aufgeschlossenen Proteine oder Zellextrakte wurden zu je $5 \text{ } \mu\text{l}$ (Proteinmenge $15\text{-}20 \text{ } \mu\text{g}$; Konzentration max. $10 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in ein $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden $5 \text{ } \mu\text{l}$ 12 % SDS zugesetzt. Zu dem Ansatz wurden $10 \text{ } \mu\text{l}$ 2,4-Dinitrophenylhydrazin(DNPH)-Lösung gegeben und 15 min inkubiert. Das Abstoppen geschah mittels $7,5 \text{ } \mu\text{l}$ Neutralisierungslösung. Die Proben wurden sofort auf ein 12,5 % SDS-Gel aufgetragen. Wie in 2.7.10 beschrieben wurde das Gel auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde zuerst in einer Blockierungslösung inkubiert. Dann wurde der erste Antikörper (Anti DNPH 1:150 (Millipore, Bedford, USA)) verwendet. Wie oben

beschrieben wurde nach der Inkubationszeit die Membran gewaschen und der zweite Antikörper verwendet (Anti-rabbit 1:10000 (Sigma, St. Louis, USA)). Die Entwicklung des Western-Blots wurde ebenfalls wie in 2.7.10 durchgeführt.

2.7.12. Photometrische Messung von Enzymaktivitäten

Messungen der Enzymaktivität mittels Photometer

Die Messung der Enzymaktivität von FBA, ICDH und GAPDH Zellextrakten sowie auch gereinigtem Protein, erfolgte unter anderem am Photometer (Spectrophotometer, Ultrospec 2100 Pro, GE Healthcarer, Uppsala, Schweden) in einem kontinuierlichen Test. Die Messung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit vortemperierten Reagenzien und mit einem auf 30 °C temperierten Küvettenhalter. Sowohl die Messung von NADH zu NAD und NADP zu NADPH wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Sollten die Zellextrakte oder gereinigten Enzyme mit H₂O₂ oder Rose Bengal gestresst werden, wurden die gewünschten Konzentrationen in den Ansätzen 10 min (Rose Bengal) oder 15 min (H₂O₂) inkubiert

Messungen der Enzymaktivität mittels Tecanreader

Die Messung der Enzymaktivität von FBA, ICDH und GAPDH Zellextrakten sowie auch gereinigtem Protein, erfolgte unter anderen mithilfe von Mikroplatten-Reader Infinite M200 oder SunriseTM (Tecan, Crailsheim) in einem kontinuierlichen Test. Die Messung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit vortemperierten Reagenzien und mit einem auf 30 °C temperierten Küvettenhalter. Sowohl die Messung von NADH zu NAD und NADP zu NADPH wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

2.7.13. Enzymtest Fructose-1,6-bisphosphate-Aldolase

Die Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase wurde nach der Methode von Bergmeyer (1974) bestimmt. Dabei spaltet die Aldolase das Fructose-1,6-bisphosphat (2 mM) zu Dihydroxyacetonphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten. Es wurde in einem mit der Triosephosphat-Isomerase und Glycerolphosphat-Dehydrogenase gekoppelten Enzymtest gemessen. Die Bildung von NAD wurde photometrisch mit dem Mikroplatten-Leser Infinite M200 oder SunriseTM (Tecan, Crailsheim) und dem Photometer (Spectrophotometer, Ultrospec 2100Pro, GE Healthcarer, Uppsala, Schweden) detektiert. Die Reaktionslösung setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 100 mM TRIS/HCl Puffer (pH 7,5), 0,13 mM NADH, 2 mM Fructose-1,6-bisphosphate, 0,01 U Glucose-6-

Phosphat-Dehydrogenase und 1 U Mix (Sigma, St.Louis, USA). Die Substratkonzentrationen wurden enzymkinetisch bestimmt. Es wurde ein Substratstart durchgeführt.

2.7.14. Enzymtest Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivität der α -Phosphoglucomutase wurde nach der Methode von Bergmeyer (1974) bestimmt. Dabei wurde die Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat, wobei NADH zu NAD umgesetzt wird, gemessen. Es wurde in einem mit der 3-Phosphoglycerat-Phosphokinase gekoppelten Enzymtest gemessen. Die Bildung von NADPH wurde photometrisch mit dem Mikroplatten-Leser Infinite M200, SunriseTM und dem Spectrophotometer 2100Pro detektiert. Die Reaktionslösung setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 50 mM TRIS/HCl Puffer (pH 7,5), 12,5 mM MgCl₂, 2 mM NADP und 10 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Sigma, St Louis, USA). Die Substratkonzentrationen wurden enzymkinetisch bestimmt. Es wurde ein Substratstart durchgeführt.

2.7.15. Enzymtest Isocitrat-Dehydrogenase

Die Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität wurde nach der Methode von Bai *et al.* (1999) in einem an die Reduktion von NADP gekoppelten Enzymtest gemessen. Die Messung des Umsatzes von Isocitrat (0,8 mM) erfolgte photometrisch bei 30 °C. Die Reaktionslösung enthielt 50 mM TRIS/HCl Puffer (pH 7,5) 0,8 mM MnSO₄, 0,5 mM NADP, und 0,8 mM DL-Isocitrat. Die Substratkonzentrationen wurden enzymkinetisch bestimmt. Es wurde ein Substratstart durchgeführt.

2.8. Fettsäureanalytik

Für die Analyse der Zusammensetzung von Fettsäuren wurden die Membranen von *C. glutamicum* WT und Δ katA in Fettsäuremethylester umgewandelt. Es wurden 60 mg Zellen von einer Agarplatte abgenommen und in Hydrolyseröhrchen überführen. Die Hydrolyseröhrchen wurden vorher mit Extraktionsreagenz gespült. Zu dem Ansatz wurden 1,0 ml Verseifungsreagenz zugegeben, gevortext und 5 min bei 100 °C inkubiert. Diese wurden erneut gevortext und weitere 25 min bei 100 °C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 2,0 ml Methylierungsreagenz. Die Proben wurden gevortext und 10 min im Wasserbad bei 80 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz im Eisbad abgekühlt. Es wurden 1,25 ml Extraktionsreagenz zugegeben. Danach folgte eine 10-minütige Extraktion im Über-Kopf-Schüttler bis zur Phasentrennung. Die untere Phase wurde mit einer Pasteurpipette

abgenommen und verworfen. Es wurden 3,0 ml Waschlösung zu den Proben gegeben und es folgte erneut eine 5 min Extraktion im Über-Kopf-Schüttler. Die Proben wurden 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden 2/3 in ein Gaschromatographiegefäß überführt.

Verseifungsreagenz:

NaOH	7,5 g
Methanol	25 ml
Bidest. Wasser	25 ml

Methylierungsreagenz:

HCl 6,00 N	50 ml
Methanol	42,3 ml

Extraktionsreagenz:

Hexan	34 ml
Methylbutylether	34 ml

Waschlösung:

NaOH	1,8 g
Bidest. Wasser	150 ml

Die Ansätze wurden mittels Gaschromatographie (TRACE GC 2000 series, Thermo Finnigan, Mailand, Italien) analysiert. Als Standard wurde der BAME Mix (*bacterial acid methyl ester mix* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl. Zur Auftrennung wurde eine Kapillarsäule des Typs SE-54 der Firma Mega (Legnano, Italien) verwendet, wobei als mobile Phase bzw. Trägergas Stickstoff diente. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors. Die Trennung erfolgte bei folgendem Temperaturprogramm:

Injektionstemperatur: 110 °C

Anstieg von 110 °C auf 280 °C mit 5°C/min

Die Menge der zu analysierenden Fettsäuremethylester konnte durch die Fläche des Peaks bestimmt werden, die in ein Verhältnis zur Peakfläche des bekannten internen Standards gesetzt wurde.

2.9. Lumineszenz Messungen

Die Lumineszenz wurde mittels Luminometer Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad Wildbad) gemessen. Dafür wurde 1 ml Zellkultur in die Luminometer Röhren gegeben und die Lumineszenz alle 5 s gemessen. Die Bakterienkultur wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 beimpft und ebenfalls im Luminometer alle 5 s für 3 min gemessen.

2.10. Silikonölzentrifugation zur Bestimmung der Methionin-Konzentration

Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur zu einer OD_{600} 1,5 angeimpft und bis zu einer OD_{600} 5 angezogen. Vor dem Stress mit 100 mM H_2O_2 wurde die erste Probe (3 x je 200 μl) in die mit Perchlorsäure vorbereiteten Silikonölröhren gegeben und 45 s zentrifugiert. Dadurch erfolgte die schnelle Trennung der Zellen vom umgebenden Medium sowie deren sofortige Inaktivierung durch die Perchlorsäure [Klingenberg und Pfaff, 1967]. Nachdem H_2O_2 zugeben wurde, wurden nach 10 min, 30 min, 1h und 2h Proben entnommen und zentrifugiert. Die Zentrifugenröhren, die das Zellpellet enthielten, wurden in Höhe der mittleren Phase durchtrennt. Die drei Spitzen eines jeden Messpunktes wurden jetzt mit der Öffnung nach unten in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß vereinigt und 1 min bei 13.000x g zentrifugiert. Nach der Entfernung von zwei der drei Spitzen erfolgte die Zugabe von 135 μl H_2O sowie 100 μl Silikonöl der Dichte 1,06 g/cm^3 (Wacker, Burghausen) und die Resuspendierung des Sediments. Die Zellen wurden daraufhin für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, mit 75 μl 5 M KOH/1 M Triethanolamin versetzt und das Reaktionsgefäß wurde kurz gevortext. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C konnte für 20 min bei 13.000x g zentrifugiert werden, wodurch sich eine wässrige Phase absetzte, die dann in frische Eppendorf-Gefäße überführt wurde. Die Proben konnten anschließend mit der entsprechenden Verdünnung über die HPLC vermessen werden. Es wurden Methionin-Standards mit der Konzentration von 20 μM , 50 μM , 100 μM und 300 μM gewählt.

HPLC-Analyse:

HPLC: HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, BRD)

Fluoreszenzdetektor: HP 1100

Derivatisierungsreagenz: o-Phtaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B. V. Oud-Beijerland, NL)

Säure: 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)

Laufmittel: 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) Die Mischung wurde gemäß eines Gradienten-Programms während des Laufs von 100 % Puffer A auf 0 % Puffer A geändert.

Flussrate: 1 ml/min, Temperatur 35 °C

Berechnung der Methionin-Konzentration:

$$c \text{ [\mu mol/g BTM]} = \left(\text{HPLC-Wert} \times \left(\frac{300}{(\text{OD}_{600} \times 0,36 \text{ [mg/ml]} \times 0,6 \text{ [ml]})} \right) \right) / 1000$$

HPLC-Wert = ermittelte Konzentration in der Probe anhand einer Kalibrierungsreihe

300 = Verdünnungsfaktor, der sich durch die Aufarbeitung ergibt

OD₆₀₀ = optische Dichte der Kultur

0,36 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* [mg/ml OD=1]

0,6 = Volumen der Probe [ml]

Für die Errechnung der Konzentration [mM] in den Überständen musste nur die Verdünnung berücksichtigt werden.

2.11. Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von der AG Poetsch, Universität Bochum, durchgeführt.

Probenaufbereitung:

Das Zytosol- und die Membranfraktion wurden mit Hilfe des FASP II-Protokolls verarbeitet (Wisniewski et al. 2009, Naturmethoden) oder nach Inaktivierung des Proteaseinhibitors, mit welchem die Proben aufgeschlossen wurden (60 °C, 1 h). 100 µg löslichen Protein wurden über Nacht bei 60 °C mit 4 µg Trypsin (Promega, Madison, USA) inkubiert. Für die direkte Analyse der Membranfraktion (100-200 µg Protein), wurde diese zweimal mit 100 mM Ammoniumcarbonat gewaschen. Das entstehende Kügelchen wurde in 60 µl Methanols sonifiziert und anschließend in 40 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH = 8,6) gelöst. Danach wurden 2 µg Trypsin hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen

von Membranen durch Zentrifugation (100.000 x g; 4 °C; 35 min) wurde der Überstand für die Analyse verwendet. Alle Proben wurden durch die Verwendung des PT C18AR Kits (Varian, Seewald, CA, USA) entsalzt.

Protein Identifizierung mittels 1D-nLC-ESI/MS:

Alle entsalzten Proben wurden in Puffer A (0,1 % Formylsäure in Wasser) resuspendiert und in die 1D-nLC-ESI-MS/MS injiziert. Eine UPLC BEH C₁₈ Säule (1,7 µm, 75 µm x 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) und eine UPLC Symmetry C₁₈ Fangsäule (5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters, Milford, MA, USA), sowie ein PicoTip Emitter (SilicaTip, 30 µm, New Objective, Woburn, MA, USA) wurden für die LC verwendet, in Kombination mit einem nanoACQUITY Gradient ULPC Pumpensystem, angeschlossen an ein LTQ Orbitrap Velos oder LTQ Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Der analytische Säulenofen wurde auf 45 °C angeheizt. Für die Elution der Peptide wurde ein schrittweiser Gradient von Puffer A zu Puffer B (0,1 % Formylsäure in Acetonitril) angesetzt (0-5 min: 1 % Puffer B; 5-10 min: 5 % Puffer B; 10-175 min: 40 % Puffer B; 175-200 min: 99 % Puffer B; 200-210 min: 1 % Puffer B) und mit einer Flussrate von 0,4 µl/min und einer Spannung von 1,5-1,8 kV verwendet. Die LTQ Orbitrap wurde über das Programm Xcalibur (Rev. 2.1.0) gesteuert. Die lineare Ionenfalle und die Orbitrap wurden parallel gesteuert, z.B. während eines kompletten MS-Laufs auf der Orbitrap im Bereich von 150-2000 m/z mit einer Auflösung von 60,000. MS/MS Spektren der 10 besten Vorläuferionen wurden in der Ionenfalle detektiert. Die Desolvatisierungskapillare wurde auf 275 °C geheizt. Die relative Kollisionsenergie für kollisionsinduzierte Spaltung wurde auf 35 % gesetzt. Der dynamische Ausschluss war eingestellt auf eine Wiederholungsrate von 1 und einem 1-minütigem Ausschlusszeitfenster.

Datenbanksuche:

Alle Suchen wurden in der *C. glutamicum* Datenbank [Kalinowski et al., 2003], mit dem SEQUEST Algorithmus, entweder eingebettet im ProteomeDiscoverer 1.2.0.208 oder 1.3.0.339 (Thermo Electro 2008-2011) durchgeführt. Zusätzlich wurde für die Ermittlung der „false discovery rate (FDR)“ eine invertierte Datenbank verwendet. Separate Suchen wurden für jede Roh-Datei der ¹⁴N und ¹⁵N Proben durchgeführt. Es wurden nur tryptisch verdaute Peptide mit bis zu zwei Lücken akzeptiert. Als Modifikationen wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten PTMs herangezogen. Die Massentoleranz wurde auf 6 ppm und 0,8 amu

(Velos) eingestellt. Für die Proteinidentifikation mittels ProteomeDiscoverer (Thermo Electron) wurden die mass spex format-(msf) Dateien mit der Peptid Vertraulichkeit „high“ und zwei Peptide pro Protein gefiltert. Exel-Dateien (Microsoft Cororation, Redmond, WA, USA) wurden von den ^{14}N und den dazugehörigen ^{15}N erstellt und anschließend in QuPE verwendet.

2.12. Bioinformatische Methoden

Sequenzabgleiche wurden mit ClustalW und ESPript2.2 durchgeführt.

Für die Datenbankrecherchen wurden verschiedene BLAST-Programme verwendet (Basic Local Alignment Search Tool). Die nichtredundanten Proteindatenbanken wurden über die Internetseiten von KEGG und NCBI abgerufen

(<http://www.genome.jp/kegg/>,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Für densitrometrische Bestimmungen wurde das Programm PCBAS verwendet.

Für die Analysen der Proteom Daten wurde Exel und QuPE verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf *Corynebacterium glutamicum*

3.1.1. Physiologische Untersuchungen zu oxidativen Stress in *C. glutamicum*

Damit oxidativer Stress in *C. glutamicum* untersucht werden kann, ist es von grundlegender Bedeutung Bedingungen zu definieren, in denen *C. glutamicum* suszeptibel für oxidativen Stress ist. Wird *E. coli* mit 1 mM H₂O₂ inkubiert, stellt dieser Organismus das Wachstum ein (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, in wie weit *C. glutamicum* resistent gegen H₂O₂ ist, wurden Zellen mit H₂O₂-Konzentrationen von 10 mM bis 1 M versetzt und für 5 min bzw. 1 h inkubiert. Innerhalb weniger Sekunden nach Applikation von H₂O₂ kommt es zu einer starken Gasentwicklung. Die Katalase reagiert mit H₂O₂ und es kommt zur Bildung von O₂. Anschließend wurden die Ansätze auf eine BHI-Platte getropft. In Abbildung 6 ist der Tropftest dargestellt. Nach 5 min Inkubation mit H₂O₂ zeigt *C. glutamicum* auch bei 1 M H₂O₂ keinen Einbruch im Wachstum. Werden die Zellen für 1 h in H₂O₂ inkubiert ist das Wachstum ab 500 mM H₂O₂ eingeschränkt. Dieses Experiment zeigt, dass *C. glutamicum* durch häufig vorhandene Katalase hochgradig resistent gegen H₂O₂-Stress ist.

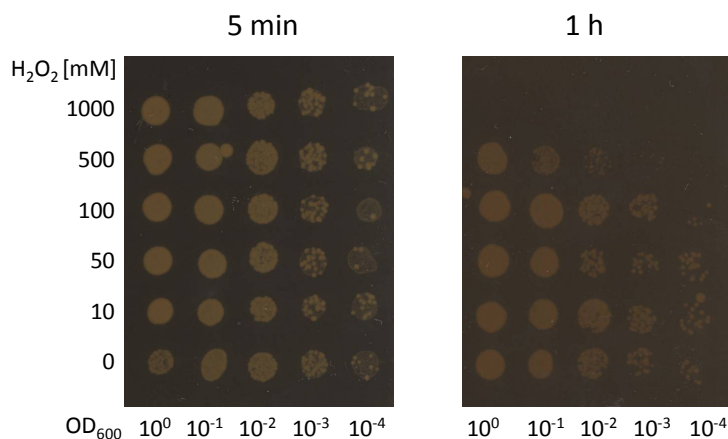


Abbildung 6: Tropftest des mit H₂O₂ gestressten *C. glutamicum* WT. Die Zellen wurden auf eine OD₆₀₀ 0,2 eingestellt und mit 0, 10, 50, 100, 500 und 1000 mM H₂O₂ für 5 min und 1 h inkubiert. Anschließend wurden auf eine BHI-Platte Verdünnungen bis 10⁻⁴ getropft und 24 h bei 30 °C inkubiert.

Für folgende Versuche ergibt sich die Frage, ob Bedingungen existieren, in denen die Katalaseaktivität eingeschränkt ist. Unter Wachstumsbedingungen bei pH 6 konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reprimierung der Katalase kommt [Follmann *et. al.*, 2009]. Zudem wird bei niedrigem pH die Verfügbarkeit von Fe²⁺ herab gesetzt, so dass die Katalase weniger Cofaktormoleküle zur Verfügung hat. Zudem wurde bei saurem pH eine verstärktes Vorkommen von H₂O₂ gemessen [Follmann *et. al.*, 2009]. Demnach gibt es physiologische

Bedingungen in denen eine Katalase kaum aktiv ist. Dies legt den Gebrauch einer Katalase-defizienten Mutante nahe. Diese Mutante wurde von der AG Kalinowski bereitgestellt.

Die Katalasemutante ($\Delta katA$) wurde ebenfalls in dem oben beschriebenen Tropftest untersucht. Es kommt in *C. glutamicum* $\Delta katA$ -Stamm nach Applikation von H_2O_2 zu keiner Bildung von O_2 . Abgestoppt wurde der Ansatz mit der Zugabe von Katalase. Abbildung 7 zeigt den Tropftest nach 5 min Inkubation mit H_2O_2 . Die $\Delta katA$ -Mutante weist generell ein leicht schlechteres Wachstum auf als der Wildtyp. Bei einem Stress von 50 mM H_2O_2 stellt die Katalasemutante ihr Wachstum dauerhaft ein.

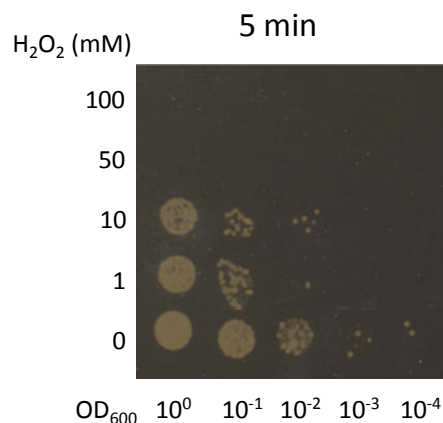


Abbildung 7: Tropftest der mit H_2O_2 gestressten *C. glutamicum* $\Delta katA$ -Mutante. Die Zellen wurden auf eine $OD_{600} 0,2$ eingestellt und mit 0, 1, 10, 50 und 100 mM H_2O_2 für 5 min inkubiert. Anschließend wurden auf eine BHI-Platte jeweils 2 μl von Verdünnungen bis 10^{-4} aufgetropft und 24 h bei 30 °C inkubiert.

In Wachstumsversuchen im Schüttelkobeeln mit *C. glutamicum* WT und $\Delta katA$ -Stamm wurden die Zellen bei $OD_{600} 5$ mit 1, 10 und 100 mM H_2O_2 gestresst und das Wachstum bis zu 24 h beobachtet. In Abbildung 8 sind die OD-Werte nach 24 h gegenübergestellt.

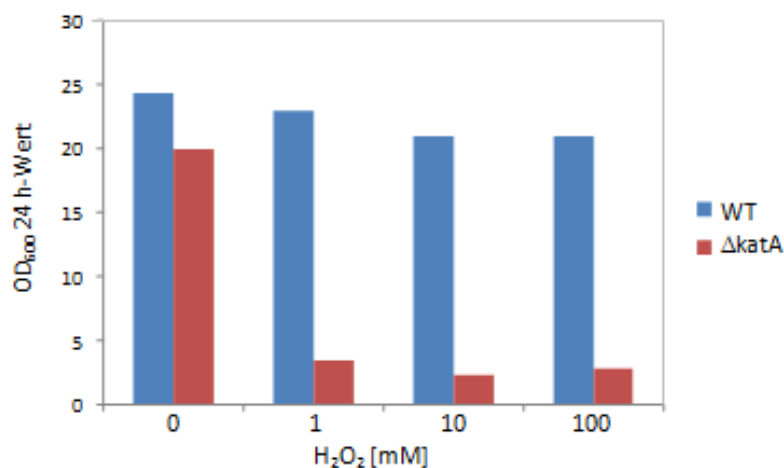


Abbildung 8: Die OD_{600} 24 h-Werte eines Wachstumsversuchs mit *C. glutamicum* Wildtyp (blau) und $\Delta katA$ -Stamm (rot). Bei $OD_{600} 5$ wurde den Zellen 0, 1, 10 und 100 mM H_2O_2 appliziert.

Schon bei geringen Konzentrationen von 1 mM H₂O₂ stellt die $\Delta katA$ -Mutante das Wachstum ein. Demnach ist diese sehr sensitiv gegenüber H₂O₂. Jedoch zeigt auch der Wildtyp niedrigere OD_{600nm} 24 h-Werte bei steigender H₂O₂-Konzentration.

Die Verknüpfung von pH und oxidativen Stress sollte außerdem anhand eines Wachstumsversuchs mit *C. glutamicum* WT und $\Delta katA$ -Stamm bei pH 6, pH 7,5 und pH 9 untersucht werden. Um gleichzeitig den Einfluss der Verfügbarkeit bivalenten Kationen zu testen, wurden Medien verwendet, die je eine Komponente der Spurenelementlösung (siehe Abschnitt 2.4.3) nicht beinhalten. Demnach werden Medien ohne Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ oder Ni²⁺ verwendet.

In Abbildung 9 ist der Wachstumsversuch dargestellt. Es wurde keine logarithmische Skalierung gewählt, um die Unterschiede im Wachstum deutlicher zu machen.

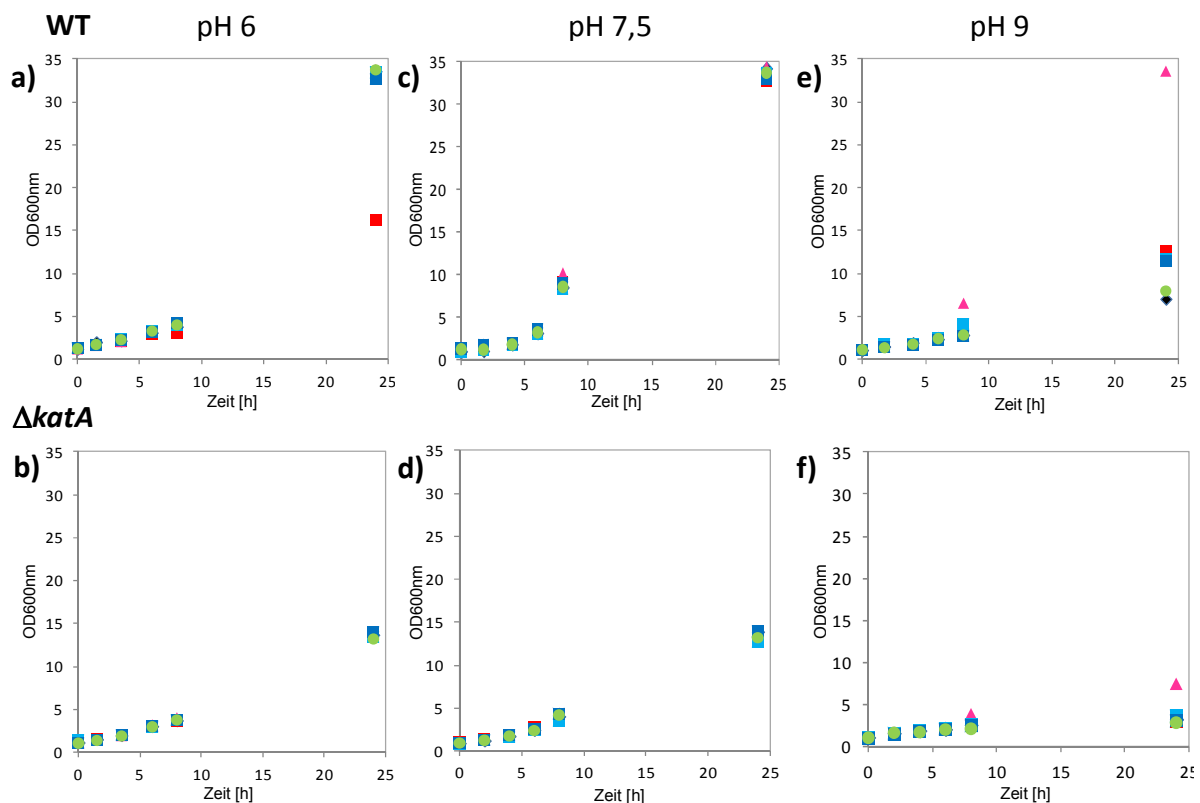


Abbildung 9: Wachstumsversuch mit *C. glutamicum* WT und $\Delta katA$ -Stamm bei pH 6, 7,5 und 9 und Medien in den je eine Komponente der Spurenelementlösung (siehe Abschnitt 2.4.3) entfernt wurde. Farblich gekennzeichnet sind die Medien in den entweder Eisen (rot), Mangan (pink), Kupfer (türkis), Zink (blau) und Nickel (grün) fehlt. In schwarz ist die Kontrolle dargestellt, in der alle Komponenten der Spurenelementlösung vorhanden sind. Um die Unterschiede im Wachstum besser deutlich zu machen, wurde keine logarithmische Skalierung verwendet.

Der *C. glutamicum* WT zeigt bei pH 7,5 eine Wachstumsrate von 0,41 (siehe Abbildung 9c). Der Mangel an bivalente Kationen scheint hier keinen Einfluss zu haben. Die Wachstumsrate der $\Delta katA$ -Mutante bei pH 7,5 beträgt 0,23 (siehe Abbildung 9d). Auch hier hat der Mangel an bivalenten Kationen keinen Einfluss auf das Wachstum. *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta katA$ -Stamm weisen bei pH 9 zu Beginn des Versuchs eine Wachstumsrate von 0,09 auf.

Nach 8 h Wachstum zeigen beide Stämme ein besseres Wachstum bei pH 9 in einem Medium ohne Mangan (Abbildung 9e und f). Bei pH 6 ist zu Beginn die Wachstumsrate von 0,18 beim WT ähnlich der $\Delta katA$ -Mutante Wachstumsrate von 0,14. Die End-OD des WTs bei pH 6 ist genauso hoch wie beim Wachstum des WTs bei pH 7,5. In dem Medium ohne Eisen wächst der WT jedoch bei pH 6 mit gleicher Wachstumsrate wie die $\Delta katA$ -Mutante (siehe Abbildung 9a und b). Wie bereits erwähnt wurde, konnte in der Arbeit von Martin Follmann gezeigt werden, dass es bei pH 6 und 9 zu einer verstärkten Bildung von H_2O_2 kommt. Dies wird durch das schlechtere Wachstum der $\Delta katA$ -Mutante bei pH 6 und 9 verdeutlicht. Anhand dieses Versuchs konnte der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, pH und der Verfügbarkeit an bivalenten Kationen erneut verdeutlicht werden. Mit der $\Delta katA$ -Mutante besteht des Weiteren ein Werkzeug, um den Einfluss von H_2O_2 auf *C. glutamicum* zu untersuchen.

Unter Standardbedingungen scheint jedoch H_2O_2 kein Problem für die Zelle darzustellen. Aus diesem Grund wurden andere reaktive Sauerstoffspezies getestet. Ein gern verwendeter Stressor ist Singulett-Sauerstoff (1O_2). Dieser wird entweder photochemisch z.B. durch einen geeigneten Farbstoff wie Rose Bengal (RB) oder durch den Zerfall von Hypochlorit gebildet. Da 1O_2 nicht direkt appliziert wird, kann daher die Endkonzentration in den Versuchen schwanken.

In Abbildung 10 ist ein Tropftest auf BHI-Platten mit 2-6 μM RB zu sehen. Der Wildtyp wurde 24 h mit Licht mit einer Beleuchtungsstärke von 1000 Lux und im Dunkeln inkubiert.

Auf den Platten, die im Dunkeln inkubiert wurden, ist normales Wachstum von *C. glutamicum* WT bei jeder Verdünnung sichtbar. Die bei Licht inkubierten Platten von *C. glutamicum* WT wiesen bei einer Konzentration von 6 μM RB und bei einer Zell-Verdünnung von 10^{-3} kein Wachstum mehr auf.

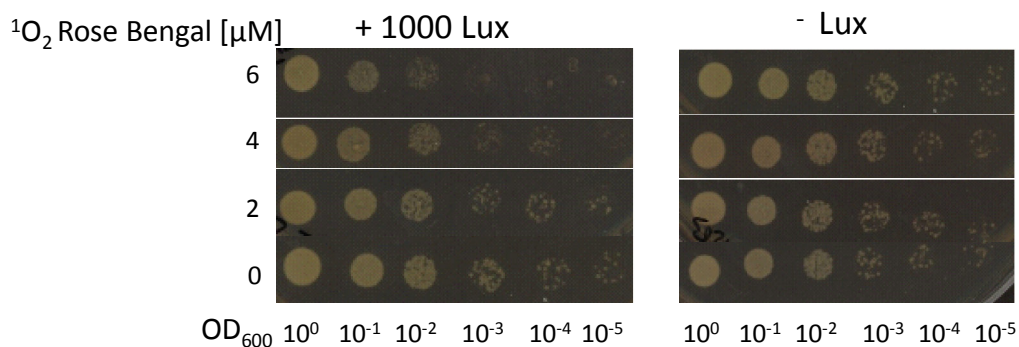


Abbildung 10: Tropftest von *C. glutamicum* WT auf Rose Bengal haltigen Platten. Die Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen Rose Bengal wurden zum einen im Dunkeln und zum anderen bei Licht (1000 Lux) für 24 h inkubiert. Die OD_{600} der aufgetropften Zellen betrug 0,2 und wurde bis zu 10^{-5} verdünnt

Demnach ist Singulett-Sauerstoff ein geeignetes Reagenz, um den physiologischen Einfluss von ROS bei *C. glutamicum* WT zu untersuchen.

Nachdem der Einfluss von H_2O_2 und $^1\text{O}_2$ auf ganze Zellen untersucht wurde, sollten wichtige Zellkomponenten wie DNA, Lipide und Proteine genauer betrachtet werden.

3.1.2. Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf DNA

Oxidative Schädigung der DNA kann zu Basenmodifikation, Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen. In ersten Versuchen wurde der Zusammenhang der oxidativen Schädigung durch die Fenton-Reaktion auf freie Lachssperma-DNA untersucht. In der Fenton-Reaktion reagieren H_2O_2 und Fe^{2+} miteinander zu Hydroxyl-Radikale sowie Hydroxidionen (siehe Gleichung 1). In Abbildung 11 sind die Kombinationen der Reagenzien und deren Einfluss auf die DNA dargestellt. Werden H_2O_2 und FeSO_4 einzeln eingesetzt wird die DNA nicht geschädigt. Im Ansatz 2,5 mM H_2O_2 mit 10 mM FeSO_4 ist noch eine leichte DNA-Bande bei 4000 kB zu erkennen. In Kombination 2,5 mM H_2O_2 mit 50 mM FeSO_4 kommt es sehr schnell zu einem Zerfall der DNA. Die in der Fenton-Reaktion gebildeten Hydroxyl-Radikale sind hochgradig reaktiv und führen zu Doppelstrangbrüchen in der DNA.

H_2O_2 [2,5 mM]	-	-	+	+	+	+	+
FeSO_4 [mM]	-	250	-	10	50	100	250

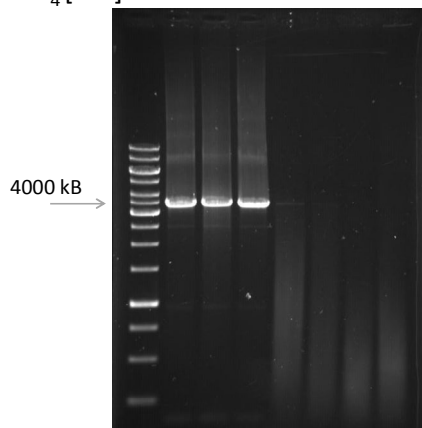


Abbildung 11: Einfluss der Fenton-Reaktion auf Lachssperma DNA. Die DNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde in unterschiedlichen Kombinationen mit H_2O_2 und FeSO_4 versetzt, 5 min inkubiert und die Proben mittels Gelelektrophorese analysiert.

Um Einzelstrangbrüche sichtbar machen zu können, wurde in einem nächsten Versuch die Nuklease *Bal31* verwendet, welche Einzelstrangbereiche identifiziert und dort schneidet. In Abbildung 12 wurde gereinigte genomische DNA aus *C. glutamicum* verwendet und diese mit 100 mM H_2O_2 15 min und RB ($^1\text{O}_2$) 10 μM 10 min und 1000 Lux gestresst. Anschließend wurde *Bal31* zugegeben und die Ansätze mittels Gelelektrophorese analysiert.

<i>Bal31</i>	-	-	-	+	+	+
H ₂ O ₂ [mM]	-	100	-	-	100	-
¹ O ₂ [μM]	-	-	10	-	-	10

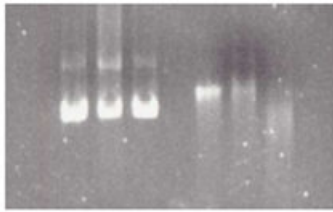


Abbildung 12: Einfluss von ROS auf gereinigte genomische DNA aus *C. glutamicum*. Gereinigte genomische DNA (1μg/μl) wurde mit 100 mM H₂O₂ (15 min) und 10 μM Rose Bengal (10 min bei 1000 Lux) inkubiert. Daraufhin wurde der *Bal31* Verdau durchgeführt. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese analysiert.

Ohne die Zugabe von *Bal31* scheint die gestresste DNA keine Schädigung durch ROS aufzuweisen. Die Zugabe der Nuklease macht jedoch sichtbar, dass sowohl H₂O₂ als auch insbesondere ¹O₂, DNA Einzelstrangbrüche bewirken.

Um den Einfluss von H₂O₂ und ¹O₂ auf DNA in lebenden *C. glutamicum* Zellen zu testen, wurden diese in Schüttelkolben angezogen. Bei einer OD₆₀₀ 5 wurden die Zellen mit 100 mM H₂O₂ 15 min und mit 10 μM RB 10 min bei 1000 Lux inkubiert. Im Anschluss wurde die genomische DNA isoliert und mit *Bal31* inkubiert. Die Proben wurden in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch analysiert.

Abbildung 13 zeigt keinen Verdau der genomischen DNA durch die *Bal31*-Nuklease. Die Funktionalität von *Bal31* wird durch das Fehlen der sonst typischen RNA-Bande verdeutlicht. Durch die Aktivität des Enzyms ist diese so stark degradiert, dass sie in dem Agarose-Gel nicht mehr sichtbar ist.

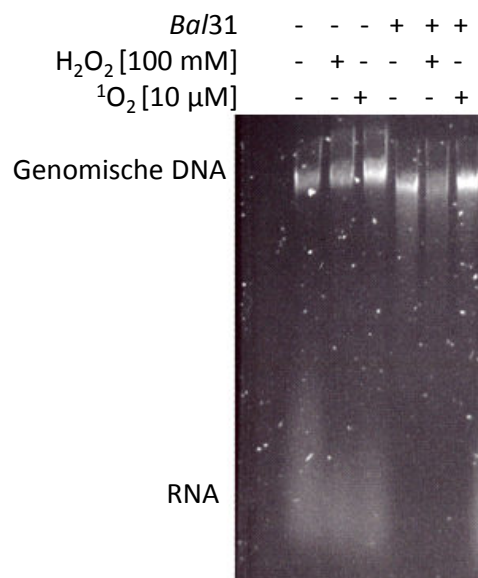


Abbildung 13: Einfluss von ROS auf die DNA lebender *C. glutamicum* Zellen. *C. glutamicum* WT wurde auf eine OD₆₀₀ 5 angezogen und mit 100 mM H₂O₂ 15 min inkubiert und mit 10 μM Rose Bengal 10 min bei 1000 Lux inkubiert. Die genomische DNA wurde isoliert und mittels *Bal31* verdaut. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese analysiert.

Im Gegensatz zu gereinigter genomischer DNA (siehe Abbildung 12) wird in lebenden *C. glutamicum* Zellen die DNA sehr gut vor ROS geschützt. Zudem könnte es sehr effektive Reparaturmechanismen in *C. glutamicum* geben.

3.1.3. Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Fettsäurezusammensetzung der Lipide

Zellwand und Zellmembran sind zentrale Strukturen lebender Zellen. Ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber ROS ist daher von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde die Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide unter ROS-Einwirkung untersucht. Werden *C. glutamicum* Zellen mit 100 mM H₂O₂ gestresst, zeigen sie eine plötzlich steigende Lumineszenz von ca. 1000 RLU/s (*Relative light unit/s*). Diese ist die optische Strahlung, die beim Übergang von einem angeregten Zustand zum Grundzustand entsteht, welcher durch die Reaktion von ROS mit Lipiden oder Proteinen gebildet werden kann. Die Lumineszenz erreicht innerhalb von 3 min wieder einen Grundwert von ca. 100 RLU/s. Die Δ katA-Mutante zeigt nach der Zugabe von H₂O₂ einen Wert von ca. 700 RLU/s, fällt jedoch deutlich langsamer nach 3 min auf einen Wert von 250 RLU/s (Daten nicht gezeigt). Demnach reagiert H₂O₂ mit Komponenten der Zellwand oder der Membran. Lipidperoxidation kommt überwiegend in mehrfach ungesättigten Fettsäureketten (*polyunsaturated fatty acids* - PUFAs) vor. In *C. glutamicum* bestehen die Lipide v.a. aus 18:1 und 16:0 Fettsäureresten. Daher spielt diese Art der oxidativen Schädigung bei *C. glutamicum* eine untergeordnete Rolle.

Auch wenn es nicht zu einer Lipidperoxidation kommt, sind Schädigungen der Membran durch ROS nicht auszuschließen. So ist beschrieben, dass auch einfach ungesättigte Fettsäuren mit ROS reagieren können [Frankel, 1980]. Infolgedessen wurden *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm bis zu einer OD₆₀₀ 5 angezogen und mit 100 mM H₂O₂ 15 min und mit 10 μ M RB 10 min bei 1000 Lux, welches als Reagenz zur Bildung von ¹O₂ verwendet wurde, gestresst. Die Proben wurden daraufhin einer Fettsäuremethylesterpräparation unterzogen. Die isolierten Fettsäuremethylester wurden anschließend mittels Gaschromatographie analysiert (siehe Abbildung 14).

Die Fettsäurezusammensetzungen von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm sind im ungestressten Zustand gleich. Werden die Zellen mit H₂O₂ gestresst, scheint dies auf die Fettsäurezusammensetzung keinen Einfluss zu haben. Werden die Stämme mit ¹O₂ gestresst

wird der Anteil von 18:1 und 16:0 Fettsäuren weniger und es werden mehr 15:0 und m17:0 (Heptadecansäuremethylester) gemessen. Ebenso konnte ein kleiner Anteil von 17:0 und 16:1 Fettsäuren identifiziert werden. Demnach hat $^1\text{O}_2$ einen deutlichen Einfluss auf die Zellmembran von *C. glutamicum*.

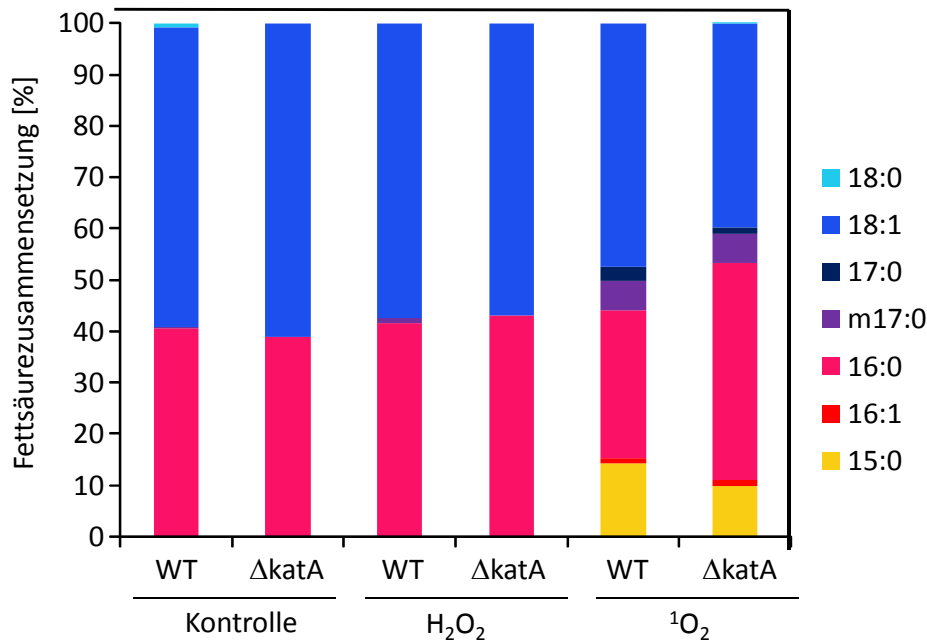


Abbildung 14: Fettsäurezusammensetzung von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm nach Applikation von H_2O_2 und $^1\text{O}_2$. *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm wurden bis zu einer OD_{600} 5 angezogen und mit 100 mM H_2O_2 (15min) und 10 mM RB mit 1000 Lux (10 min) gestresst. Anschließend wurden die Zellen einer Fettsäuremethylesterpräparation unterzogen und die isolierten Fettsäuren mittels Gaschromatographie analysiert.

3.1.4. Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf Proteine

Weitere wichtige Zellkomponenten sind die Proteine. Sie können eine große Anzahl von unterschiedlichen oxidativen Modifikationen und Schäden aufweisen. Eine Art der Modifikation ist die der oxidativen Proteincarbonylierung. Für eine Bachelorarbeit wurde eine Katalase-Insertionsmutante konstruiert, welche durch das pDrive Kit erstellt wurde [Ochrombel, 2011] Werden Zellextrakte von *C. glutamicum* WT und ikatA-Mutante mit H_2O_2 inkubiert, kommt es zu einer stärkeren Carbonylierung im Zellextrakt der ikatA-Mutante (Abbildung 15, [Seiferling, 2009]). Um Carbonylierungen von Proteinen sichtbar zu machen, wird der Oxyblot verwendet. Hierbei werden Carbonylgruppen von Aminosäuren mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DPHN) chemisch modifiziert. Die somit markierten Aminosäuren können daraufhin mit einem Antikörper detektiert werden. Die Stärke der Carbonylierung im WT bleibt nach 100 mM H_2O_2 -Stress gleich, wohingegen die ikatA-Mutante eine stärkere Carbonylierung nach der Stressung aufweist.

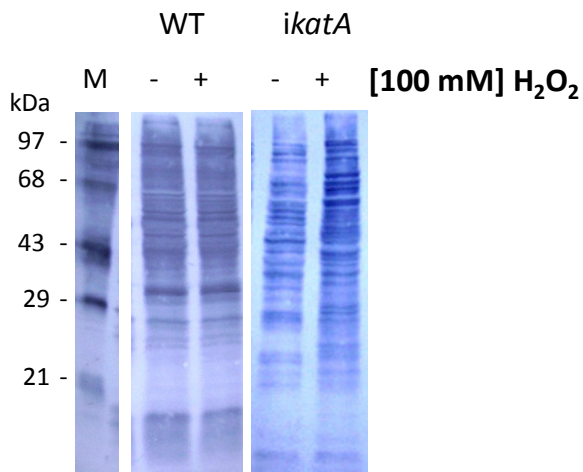


Abbildung 15: Oxyblot *C. glutamicum* WT und *ikatA*-Mutante Zellextrakte gestresst mit 100 mM H₂O₂ [nach Seiferling, 2009]

Da *C. glutamicum* WT durch die starke Katalase auch im Zellextrakt einen guten Schutz besitzt, wurden für die nächsten Versuche Zellextrakte des $\Delta katA$ -Stamms verwendet. In ersten Analysen soll die Auswirkung der Fenton-Reaktion auf Proteine beobachtet werden. Um den Einfluss von zellinternem Fe²⁺ zu testen, wurde einigen Proben 100 μ M Desferal zugegeben. Es wurden Ansätze mit unterschiedlichen Kombinationen Desferal, 100 mM H₂O₂ und 1 mM FeSO₄ hergestellt. In Abbildung 16 ist das Ergebnis des Versuchs abgebildet. Die geringste Carbonylierung ist in den Proben zu beobachten, welche Desferal enthalten. Gleichermäßen zeigt die Kontrolle, die kein Desferal, H₂O₂ und FeSO₄ beinhaltet, nur eine geringe Carbonylierung. Demnach führt das zellinterne freie Fe²⁺ kaum zu einer Fenton-Reaktion. Werden die Zellextrakte mit H₂O₂ oder FeSO₄ gestresst, kommt es zu einer stärkeren Carbonylierung. Befinden sich im Ansatz sowohl H₂O₂ als auch FeSO₄ weist der Oxyblot die stärkste Carbonylierung auf.

Desferal [100 μ M]	+	-	-	+	+	-	-
H ₂ O ₂ [100 mM]	-	-	+	-	+	-	+
FeSO ₄ [1 mM]	-	-	-	-	-	+	+

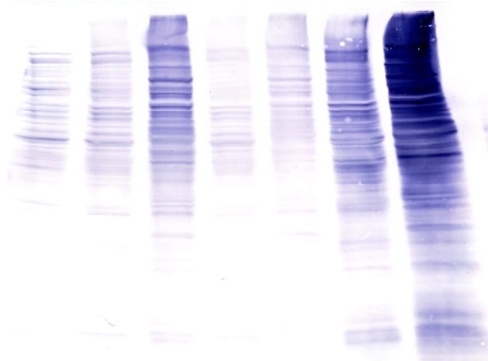


Abbildung 16: Oxyblot des Zellextrakts der Katalasemutante. Die Zellextrakte wurden in Kombinationen mit 100 μ M Desferal, 100 mM H₂O₂ und 1 mM FeSO₄ inkubiert.

Demnach ist der Oxyblot eine gute Methode um oxidative Modifikationen sichtbar zu machen. Die Schwäche des Oxyblots besteht darin, dass nur das gesamte Proteom abgebildet werden kann. Um Rückschlüsse auf einzelne Proteine ziehen zu können, müssen weitere Methoden wie massenspektrometrische Analysen etabliert werden. Bevor jedoch die Proben massenspektrometrischen Untersuchungen unterzogen werden, soll der Einfluss von oxidativem Stress auf Proteine in lebenden Zellen in der Fermentation getestet werden.

3.1.5. Fermentation von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm mit steigendem O₂-Anteil in der Zuluft

In der biotechnologischen Anwendung von *C. glutamicum* kann es in der Fermentation zu einem Ungleichgewicht der Sauerstoffzufuhr kommen. Dabei kann es passieren, dass es zu anaeroben Bereichen (z.B. dichte Zellmasse) im Fermenter kommt, die schnell durch aerobe Bereiche (z.B. verstärkte Rotation des Rührers) abgewechselt werden können. Dies kann zu oxidativem Stress führen und die Proteine, welche wichtig für die Aminosäureproduktion sind, beschädigen. Um diese Situation nachzustellen, wurden *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm einer Fermentation in 2 l Fermenter bei steigendem O₂-Anteil in der Zuluft unterzogen. Die Stämme wurden bei einem O₂-Anteil von 20 % (Luft) bis zu einer OD₆₀₀ 8 angezogen. Sobald diese OD₆₀₀ erreicht war, wurde die Sauerstoffzufuhr 20 min unterbrochen. Im Anschluss daran erfolgte das erneute Zuführen von O₂-haltiger Zuluft. Dabei wurde in den Stufen 15, 30, 45, 60, 75, 100 % Sauerstoffanteil in der Zuluft alle 20 min erhöht. Zuletzt erfolgte wieder eine Einstellung des Sauerstoffgehaltes auf 20 % O₂ in der Zuluft. Zum Ende der jeweiligen 20-minütigen Inkubation erfolgte die Probenentnahme für einen Oxyblot. In Abbildung 17 ist das entsprechende Ergebnis dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der WT (siehe Abbildung 17a) zu Beginn der Fermentation leichte Carbonylierungsmuster aufweist. Die darauffolgenden drei Proben (0, 15 und 30 % O₂-Anteil in der Zuluft) sind kaum carbonyliert. Sobald jedoch 45 % O₂ in der Zuluft vorhanden sind, kommt es erneut zu einer starken Oxidation der Proteine, die auch bei 100 % O₂ in der Zuluft gleichbleibt. Beim Zurückkehren auf 20 % O₂ in der Zuluft bleibt die ausgeprägte Carbonylierung der Proteine bestehen. Die Δ katA-Mutante (siehe Abbildung 17b) zeigt hingegen zu Beginn nur eine geringe Carbonylierung. Wenn in der Zuluft der Sauerstoff abgeschaltet wird, kommt es sofort zu einem Anstieg der Carbonylierung. Bei einem O₂-Anteil von 45 % wird die Carbonylierung deutlich stärker. Sobald ein O₂-Anteil von 75 % erreicht wird, erhöht sich die Carbonylierung

erneut, bis sie bei einem Anteil 100 % O₂ am stärksten ist und auch beim Herabsetzen des O₂-Anteils auf 20 % nicht wieder zurückgeht.

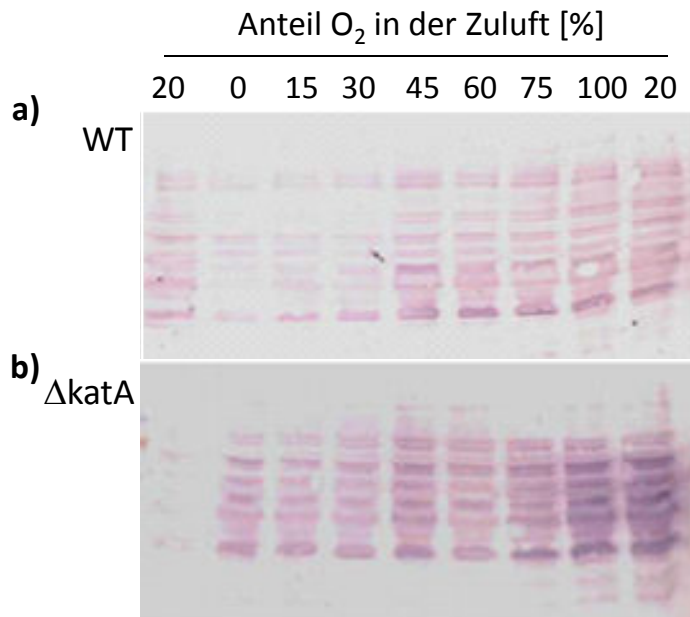


Abbildung 17: Oxyblot der Fermentation von *C. glutamicum* WT (a) und Δ katA-Stamm (b). Die Stämme wurden zu einer OD₆₀₀ 8 angezogen. Daraufhin erfolgte das Abschalten der O₂-haltigen Zuluft für 20 min. Anschließend wurde der O₂ Gehalt alle 20 min stufenweise (15, 30, 45, 60, 75, 100 % Anteil O₂ in der Zuluft) erhöht. Für den letzten Messpunkt wurde der O₂-Anteil wieder auf 20 % in der Zuluft herabgesetzt.

In der Fermentation, wie in den Zellextrakt-Versuchen, ist die Δ katA-Mutante viel sensitiver gegenüber oxidativem Stress als der Wildtyp. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es auch beim Wildtyp Bedingungen gibt, in denen es zu einer verstärkten oxidativen Carbonylierung der Proteine kommt.

3.2. Proteomanalysen

3.2.1. Massenspektrometrische Analyse der Proben der Fermentation mit steigendem O₂ Anteil in der Zuluft

Die oxidative Proteinmodifikation ist ein wichtiger Bestandteil des Verständnisses der Schädigung durch ROS in *C. glutamicum*. Der Oxyblot ist jedoch keine aussagekräftige Methode zur Identifizierung von carbonylierten Proteinen. Es ist von großem Interesse die Proteine zu detektieren, die insbesondere bei oxidativem Stress sensitiv sind. Für diese Problemstellung wurden massenspektrometrische Analysen heran gezogen.

In einem ersten Versuch wurden die Proben aus Abschnitt 3.1.5 von Wildtyp und Δ katA-Mutante mit 0 % und 100 % O₂ Anteil in der Zuluft auf ein „Maxi-SDS“-Gel (30 x 20 cm) aufgetragen, um die Proteinbanden besser voneinander zu trennen. Anschließend wurden eine SDS-PAGE und ein Oxyblot erstellt. Banden, die besonders stark im Oxyblot carbonyliert

Ergebnisse

waren, wurden aus dem SDS-Gel geschnitten und im ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) massenspektrometrisch analysiert. Die Proben wurden vom ZMMK nicht explizit auf oxidative Modifikationen untersucht. Jedoch ist es möglich, sogenannte Monooxidationen zu identifizieren. In Tabelle 6 sind die Proteine aufgeführt, welche eine Oxidation tragen und deren Peptidabdeckung (*Coverage*) über 45 % liegt.

Es ist auffällig, dass neben Translationsfaktoren wie EF-Tu und ribosomalen Proteinen, welche häufig in der Zelle vertreten sind, viele Enzyme des Zentralstoffwechsels oxidiert werden. Insbesondere konnten viele Enzyme der Glykolyse, wie z.B. Fructosebisphosphat-Aldoase und Enolase identifiziert werden. Ein weiteres interessantes Enzym ist die Homocystein-Methyltransferase (MetE) aus dem Methioninstoffwechsel. Diese Analyse zeigt nur einen Teil möglicher Kandidaten für sensitive Proteine, da definierte Banden ausgeschnitten und nicht das gesamte Proteom analysiert wurde.

Tabelle 6: Oxidierte Proteine aus der massenspektrometrischen Analyse des ZMMK. Proben aus Versuchsteil 3.1.5 wurden nach dem Auftrag auf ein SDS-Maxi-Gel für eine SDS-PAGE und einen Oxyblot verwendet. Stark carbonylierte Banden im Oxyblot wurden im SDS-Gel ausgeschnitten und im ZMMK analysiert. Proteine, welche eine oxidative Modifikation aufweisen und eine Peptidabdeckung (*Coverage*) von mehr als 45 % haben, wurden in die Tabelle aufgenommen. Die letzte Spalte zeigt farblich, zu welchen Stoffwechselwegen die Proteine gehören. Proteinbiosynthese (**rot**), Glykolyse (**blau**), Citratzyklus (**gelb**), Fettsäurebiosynthese (**grün**) Aminosäuremetabolismus (**orange**) und Energiestoffwechsel (**lila**), oxidative Stressantwort (**weiß**) und Andere (**schwarz**).

Cg-Nr.	Genname	Proteinname	Abdeckung[%]	
cg0482	gpmA	PHOSPHOGLYCEROMUTASE	53,2	
cg0583	fusA	ELONGATIONSFACTOR G	71,1	
cg0598	rplB	50S RIBOSOMALES PROTEIN L2	56,8	
cg0802	accBC	BIOTIN-CARBOXYLASE	45,5	
cg0803	thtR	THIOSULFAT-SCHWEFELTRANSFERASE	47,2	
cg0973	Pgi	GLUCOSE-6-PHOSPHAT-ISOMERASE	47	
cg1111	Eno	ENOLASE	58,1	
cg1290	metE	HOMOCYSTEIN-METHYLTRANSFERASE	45,6	
cg1368	atpD	ATP-SYNTASE ALPHA- UNTEREINHEIT	58,8	
cg1479	glgP1	PUTATIVE GLYCOGEN-PHOSPHORYLASE	61,9	
cg2103	dtxR	EISEN-ABHÄNGIGES REGULATORISCHES PROTEIN-DTXR	52,2	
cg2221	tsf	TRANSLATIONSELONGATION FACTOR TS (EF-TS)	80,4	
cg2613	mdh	MALAT-DEHYDROGENASE-OXIDOREDUKTASE	61,3	
cg2705	amyE	MALTOSE-BINDEPROTEIN PROTEIN	52,1	
cg3068	fba	FRUCTOSEBISPHOSPHAT-ALDOLASE	58,4	
cg3237	sod	MANGAN-ABHÄNGIGE SUPEROXIDE DISMUTASE	77	

3.2.2. Proteomanalyse von gestressten Zellextrakten

Um die Gesamt-Modifikation des *C. glutamicum* Proteoms untersuchen zu können, wurden Zellextrakte von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm hergestellt und diese mit 100 mM H_2O_2 gestresst. Für die Proteomanalysen wurden sowohl ungestresste als auch gestresste Proben verwendet und zwischen Membran- und Zytosolfraktion unterschieden. Die Zellextrakte wurden tryptisch verdaut. Die Probenaufbereitung und massenspektrometrische Messungen wurden von der AG Poetsch, Universität Bochum, durchgeführt. Die Analyse zur Identifizierung der Modifikationen erfolgte in der *C. glutamicum* Datenbank [Kalinowski *et al.*, 2003] mit dem SEQUEST Algorithmus, entweder integriert im ProteomeDiscoverer 1.2.0.208 oder 1.3.0.339 (Thermo Electron © 2008-2011). Es wurde nach insgesamt 21 Modifikationen gesucht. Mittels „MS Office Excel 2007“ wurden die aufbereiteten Rohdaten daraufhin analysiert.

In Abbildung 18 sind die Proteome von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Mutante dargestellt. Jeder Ring beschreibt eine posttranslationale Modifikation (PTM). Exemplarisch sind Methionin Mono- und Dioxidation, Prolin zu Pyrrolidinon und Prolin Carbonylierung sowie Cystein zu Cys-Sulfensäure und Cystein Di- bzw. Trioxidation aufgeführt. Jeder Zacken in den Ringen beschreibt ein Protein, welches die gesuchte Modifikation trägt. Die Länge des Zackens zeigt die Häufigkeit dieser PTM im Protein. Im Δ katA-Stamm Proteom kommt es zu weitaus mehr oxidativen Modifikationen als im WT.

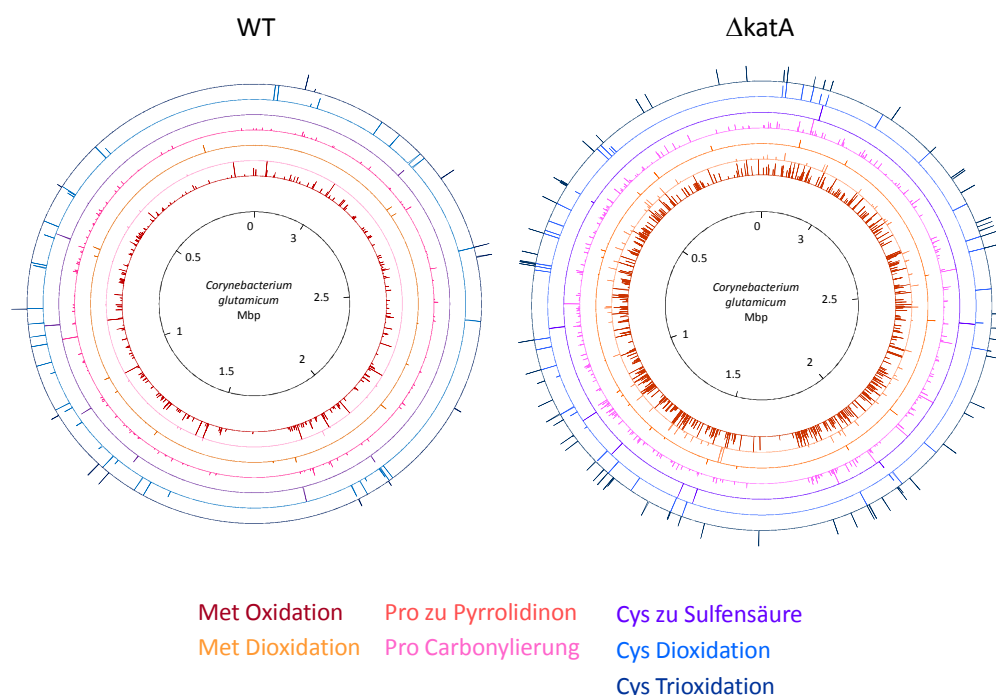


Abbildung 18: Proteom von *C glutamicum* WT und Δ katA-Stamm. Jeder Ring beschreibt eine farblich dazu abgestimmte oxidative Modifikation. Die Länge der Zacken gibt Auskunft darüber, welches Protein wie häufig diese Modifikation trägt.

Ebenfalls weisen die Proteine der Membranfraktion mehr Modifikationen auf als die Proteine des Zytosols (Daten nicht gezeigt). Anhand dieses Versuchs ist es möglich, für die folgenden MS-Analysen eine definierte Gruppe von PTMs zu wählen, welche in *C. glutamicum* auftreten können.

In Tabelle 7 sind diese PTMs zusammengestellt. Einzelne Monooxidationen von Proteinen sind nicht voneinander zu unterscheiden, da der Massenzuwachs gleich ist. Monooxidationen werden daher in den folgenden Versuchen zusammengezählt, was jedoch auch zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

Tabelle 7: Ausgewählte oxidative Proteinmodifikationen für massenspektrometrische Analysen

Aminosäure	Modifikation
Lysin	Amino adipinsäure
Methionin	Oxidation / Dioxidation
Arginin	Glutamatsemialdehyd
Prolin	Carbonylierung / Pyroglutaminsäure / Pyrrolidinon
Cystein	Dioxidation / Trioxidation / Sulfensäure
Tryptophan	Oxidation / Kynurenin / Hydroxykynurenin / Nitrosylierung
Histidin	Oxidation / Asparagin / Aspartat
Leucin	Oxidation
Tyrosin	Nitrotyrosin

3.2.3. Proteomanalyse von gestressten Zellen

Nachdem die Gesamt-Proteinmodifikation von gestressten Zellextrakten von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm analysiert wurde, wurde der gleiche Ansatz mit lebenden Zellen durchgeführt. Sowohl *C. glutamicum* WT als auch der Δ katA-Stamm wurden mit 100 mM H₂O₂ gestresst. Auch ungestresste Zellen sollten als Kontrolle in der LC-MS/MS vermessen werden. Danach wurden die Zellen mit TRIS-Puffer, welcher DTT, Desferal und Protease Inhibitormix beinhaltet, aufgeschlossen und Zytosol- von Membranfraktion getrennt. Anschließend wurden die Proben tryptisch verdaut und in der LC-MS/MS vermessen. Eine Identifizierung der Membranproteine war nicht möglich, da Desferal die massenspektrometrischen Messungen beeinträchtigte. Mittels eines Analytikprogramms (siehe Abschnitt 3.2.2) war es möglich, die MS-Läufe der zytosolischen Proteine nach definierten oxidativen Modifikationen zu durchsuchen. Die in Excel aufbereiteten Rohdaten

Ergebnisse

wurden daraufhin analysiert. Die Daten vom WT und Δ katA-Mutante im ungestressten sowie im gestressten Zustand wurden nach der Anzahl der gefundenen Modifikationen sortiert. Es wurden die Proteine berücksichtigt, welche eine gute Peptidabdeckung hatten und im Verhältnis den höchsten Anteil an modifizierten Peptiden aufweisen. Die 20 auffälligsten Proteine sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Lister der TOP 20 modifizierten Enzyme aus Abschnitt 3.2.3.

Cg.-Nr.	Enzyme	WT Anteil modifizierte Peptide [%]	katA Anteil modifizierte Peptide [%]
Cg1551	UNIVERSALES STRESSPROTEIN USPA	9,07	12,70
Cg0786	PUTATIVE URACIL-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	8,75	16,24
Cg0949	CITRATE-SYNTHASE	7,11	6,10
Cg1737	ACONITASE	6,87	5,91
Cg0587	ELONGATIONS FACTOR TU	6,30	7,33
Cg2217	RIBOSOM RECYCLING FACTOR	5,57	5,68
Cg2840	BUTYRYL-COA:ACETAT COENZYME A TRANSFERASE	5,26	4,77
Cg0766	ISOCITRAT-DEHYDROGENASE	5,13	5,09
Cg0583	ELONGATIONS FACTOR G	5,04	7,35
Cg0576	DNA/ RNA POLYMERASE BETA-KETTE	4,49	4,06
Cg3255	UNIVERSALES STRESSPROTEIN	4,47	15,72
Cg1145	FUMARAT-HYDRATASE	4,06	4,61
Cg3068	FRUCTOSEBISPHOSPHAT-ALDOLASE	4,05	4,25
Cg0802	BIOTIN CARBOXYLASE UND BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN	4,01	3,05
Cg2466	PYRUVAT-DEHYDROGENASE E1 KOMPONENTE	3,70	4,04
Cg1774	TRANSKETOLASE	3,40	3,72
Cg2613	MALAT-DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE	2,07	3,39
Cg1280	2-OXOGLUTARAT-DEHYDROGENASE	1,65	5,44
Cg2833	O-ACETYL SERIN (THIOL)-LYASE	1,25	1,08
Cg1111	ENOLASE	0,88	0,76

Erneut konnte ein Großteil der identifizierten Proteine dem Zentralstoffwechsel zugeordnet werden. In dem gestressten WT kommt es zu einer leicht höheren Anzahl oxidativ modifizierter Peptide. Dies zeigt, dass es trotz Katalase zu oxidativen Schäden im WT unter H_2O_2 -Einfluss kommen kann. Weiterhin konnte erneut bestätigt werden, dass Proteine der Glykolyse stark oxidativ modifiziert werden. Tabelle 9 stellt die Zentralenstoffwechselwege Glykolyse, Citratzyklus, Pentosephosphatweg und Fettsäuremetabolismus einander gegenüber.

Ergebnisse

In Tabelle 9 sind die Daten des Wildtyps im ungestressten und gestressten Zustand dargestellt. Es sind nur die Modifikationen von den 18 gesuchten aufgeführt, welche in den analysierten Peptiden gefunden wurden

Tabelle 9: Übersicht der Modifikationen in Proteine der Zentralstoffwechselwege. Dargestellt sind Glykolyse (blau), Citratzyklus (gelb), Pentosephosphatweg (hellblau) und Fettsäuremetabolismus (grün). Die Daten der Proteomanalyse aus ungestressten (links) und lebend gestressten (rechts) *C. glutamicum* WT Zellen sind einander gegenüber gestellt. Farblich gekennzeichnet ist die Anzahl der gefundenen Peptide (hell grün) und die Anzahl der Peptide die eine Modifikation tragen (rot).

		WT+02										WT-02											
		Methionin-Oxidation	Lysin zu Amino adipic acid	Arginin zu Glutamic Semialdehyd	Prolin-Carbonylierung	Acetylierung von Lysin	Oxidation von Leucin	Prolin zu Pyrrolidion	Cystein zu Sulfenic acid	Oxidation von Histidin	Dioxidation von Methionin	Oxidation von Tryptophan	Methionin-Oxidation	Lysin zu Amino adipic acid	Arginin zu Glutamic Semialdehyd	Prolin-Carbonylierung	Acetylierung von Lysin	Oxidation von Leucin	Prolin zu Pyrrolidion	Cystein zu Sulfenic acid	Oxidation von Histidin	Dioxidation von Methionin	Oxidation von Tryptophan
Cg0973	Glucose-6-phosphate-Isomerase	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1409	6-Phosphofruktokinase	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg3068	Fructosebisphosphat-Aldolase	126	3	0	4	0	8	0	0	3	0	2	126	4	0	5	0	6	0	3	0	3	0
Cg1789	Triosephosphate-Isomerase	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1069	Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cg1791	Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase	42	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cg1790	Phosphoglycerat-Kinase	71	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	43	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg0482	Phosphoglyceromutase	115	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cg1111	Enolase	280	5	0	0	0	4	0	0	2	0	0	223	10	0	0	0	5	0	3	0	0	0
Cg2291	Pyruvat-Kinase	29	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Cg2466	Pyruvat-Dehydrogenase Untereinheit E1	51	5	0	0	2	0	2	0	0	0	0	51	5	0	2	0	3	0	0	0	0	0
Cg0791	Pyruvat-Carboxylase	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg0798	Citrate-Synthase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1737	Aconitat Hydratase	40	5	0	0	9	0	4	0	1	1	0	34	3	0	0	9	0	2	0	1	0	0
Cg0766	Isocitrat-Dehydrogenase	74	8	0	0	6	0	4	0	0	0	0	78	19	0	13	0	7	0	0	0	0	0
Cg1280	Alpha-Ketoglutarat-Decarboxylase	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	1	0	0	3	0	0	0	1	0	0
Cg2421	Dihydroliipoamid- Acetyltransferase	31	2	0	0	7	0	4	0	0	0	2	33	3	0	8	0	9	0	0	0	0	2
Cg2836	Succinyl-CoA Synthetase alpha-Untereinheit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Cg0445	Succinat-Dehydrogenase Cd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1145	Fumarat-Hydratase	42	3	0	0	2	0	1	0	2	0	0	38	4	0	0	3	0	3	0	0	4	0
Cg2613	Malat-Dehydrogenase	34	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	37	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0
Cg0973	Glucose-6-phosphate-Isomerase	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1778	Glucose-6-phosphate 1-Dehydrogenase	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1780	6-Phosphogluconolactonase	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1643	6-Phosphogluconate-Dehydrogenase	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1801	Ribulose-phosphat-3-Epimerase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1774	Transketolase	42	7	0	0	2	0	1	0	1	0	0	34	5	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Cg1776	Transaldolase	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg2658	Ribose-5-phosphate-Isomerase	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cg1075	Ribose-phosphate-Pyrophosphokinase	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg0957	Fettsäure-Synthase	52	2	0	1	0	0	1	0	0	2	0	41	2	0	0	0	3	0	0	1	0	0
Cg2743	fettsäure-Synthase	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Cg0344	3-Oxoacyl-(acyl-carrier protein) Reduktase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg0825	3-Oxoacyl-(acyl-carrier protein) Reduktase	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg0951	Acetyl-coenzyme A Carboxylase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg0480	Langketten-Fettsäure-CoA-Ligase	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1049	3-Hydroxyisobutyryl-CoA-Hydrolase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg2625	Acetyl-CoA Acetyltransferase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cg1725	Methymanonyl-CoA-Mutase	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Von den Enzymen der Glykolyse zeigen die meisten modifizierten Peptide die Fructosebisphosphat-Aldolase, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, die Enolase und die Pyruvatdehydrogenase. Sowohl die Fructosebisphosphat-Aldolase als auch die

Enolase wurden bereits in Abschnitt 3.2.1 als interessante Ziele für oxidativen Stress identifiziert. Im Citratzyklus konnte in fast allen Enzymen modifizierte Peptide detektiert werden, wohingegen im Pentosephosphatweg nur die Transketolase viele Modifikationen zeigt. Im Fettsäuremetabolismus besitzt die Fettsäuresynthase einige oxidierte Peptide. Jedoch ist die Peptidabdeckung der Proteine im Fettsäuremetabolismus nicht so gut wie in den anderen Stoffwechselwegen. Wurden viele Peptide zu einem Enzym gefunden, deutet dies nicht, dass auch viele Modifikationen gefunden wurden. Ein Beispiel dafür ist die Phosphoglyceratkinase, die bei 77 gefunden Peptiden (*Coverage* 75 %) nur eine Modifikation aufweist. Zur genaueren Analyse des Einflusses von ROS auf die Enzymaktivität wurden aufgrund der beschriebenen MS-Messungen die Fructosebisphosphat-Aldolase (FBA), die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die Isocitratdehydrogenase (ICDH) ausgewählt.

3.2.4. Quantitative Proteomanalyse

Bei den bisherigen MS-Messungen wurde ausschließlich die qualitative Proteomik betrachtet. In einem weiteren Versuch sollte die quantitative Proteomik als Analysemethode herangezogen werden. Hierbei ist es möglich, Unterschiede in der Proteinabundanz zu identifizieren. Zur Quantifizierung wird die Methode der stabilen Isotopenmarkierung (SILAC) mit $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Isotopen angewendet. Um den ^{15}N -Standard zu erstellen, wurden *C. glutamicum* WT Zellen mit markiertem Ammoniumsulfat fermentiert. Der Verlauf der Fermentation ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Zellen wurden zu einer OD_{600} 7-8 angezogen und dann die Zuluft für 1 h unterbrochen. Im Anschluss erfolgte die erneute Inkubation bei Zuluft für 1 h. Zu 5 verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen (mit roten Zahlen gekennzeichnet). Sowohl *C. glutamicum* WT als auch ΔkatA -Stamm wurden nach dem gleichen Schema in dreifach-Bestimmung mit ^{14}N angezogen und Proben entnommen. Die schwarze Linie in Abbildung 19 beschreibt das Wachstum der Zellen. Der ^{15}N -Standard und die Vergleichsproben wurden in der AG Poetsch weiter bearbeitet. Die Proben der fünf Zeitpunkte des ^{15}N -Standard wurden aufgeschlossen, tryptisch verdaut und vereinigt. Die Proben des Versuchs wurden ebenfalls aufgeschlossen und tryptisch verdaut und jeweils mit dem Standard versehen. Die Ansätze wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Daten wurden durch Stefan Albaum, Universität Bielefeld, mittels des Analytikprogramms QuPE ausgewertet.

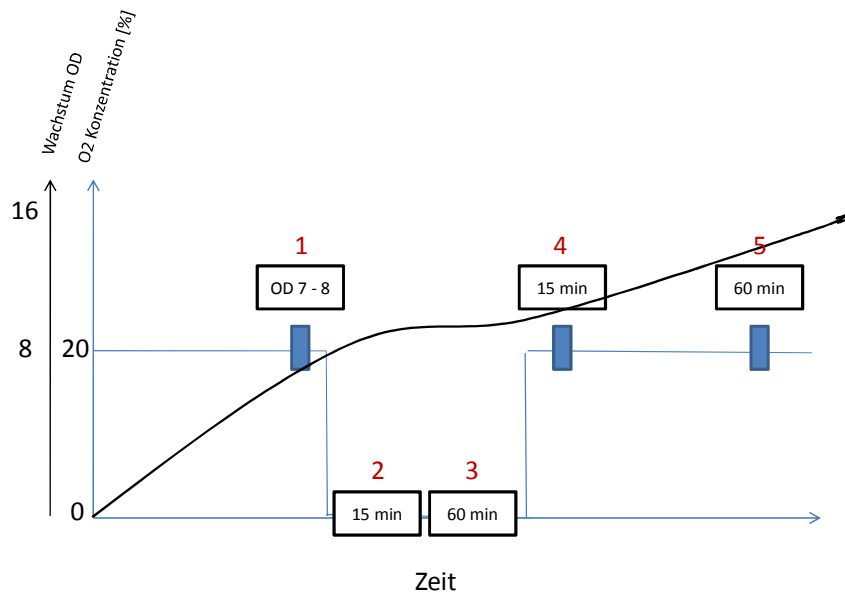


Abbildung 19: Schema der Fermentation des ¹⁵N-Standards und der Proben für die quantitative Proteomik. Dargestellt in blau ist die O₂ Konzentration in der Zuluft. Die schwarze Linie beschreibt die Wachstumskurve der Zellen. Die roten Zahlen markieren die Zeitpunkte, an denen die Proben genommen wurden.

Mittels der SILIAC Methode war es möglich 1160 Proteine zu identifizieren und 541 davon zu quantifizieren. Dabei konnte mit der Software ANOVA in QuPE festgestellt werden, dass in WT und Δ katA-Mutante 97 Proteine unterschiedlich häufig exprimiert werden.

In Abbildung 20 ist repräsentativ für andere Stoffwechselwege der KeGG Stoffwechselweg der Glykolyse dargestellt [KeGG PATHWAY DATABASE <http://www.genome.jp/kegg/>]. QuPE zeigt die Daten der Proteomanalyse in dem Stoffwechselweg mittels einer Intensitätsdarstellung (*heatmap*) an. Dabei bedeutet grün, dass weniger Peptide dieses Proteins zu diesem Zeitpunkt identifiziert wurden als im Standard, und rot, dass mehr Peptide identifiziert wurden als im Standard. Schwarz bedeutet, dass gleich viele Peptide zu diesem Protein identifiziert werden konnten wie im Standard. Zu jedem der fünf Zeitpunkte gibt es einen Balken sowohl für WT und als auch für die Δ katA-Mutante.

Es wird deutlich, dass es noch sehr viele Lücken in der Abdeckung der Proteine des Proteoms gibt. Dies ist auf die noch nicht optimale bioinformatische Auswertung sowohl des Analytikprogramms der Massenspektrometrie als auch der Auswertungssoftware QuPE zurückzuführen.

Die Abundanz einzelner ausgewählter Enzyme kann bereits in QuPE eingesehen werden. In Abschnitt 3.3.2 wird die Abundanz von FBA, GAPDH und ICDH genauer betrachtet.

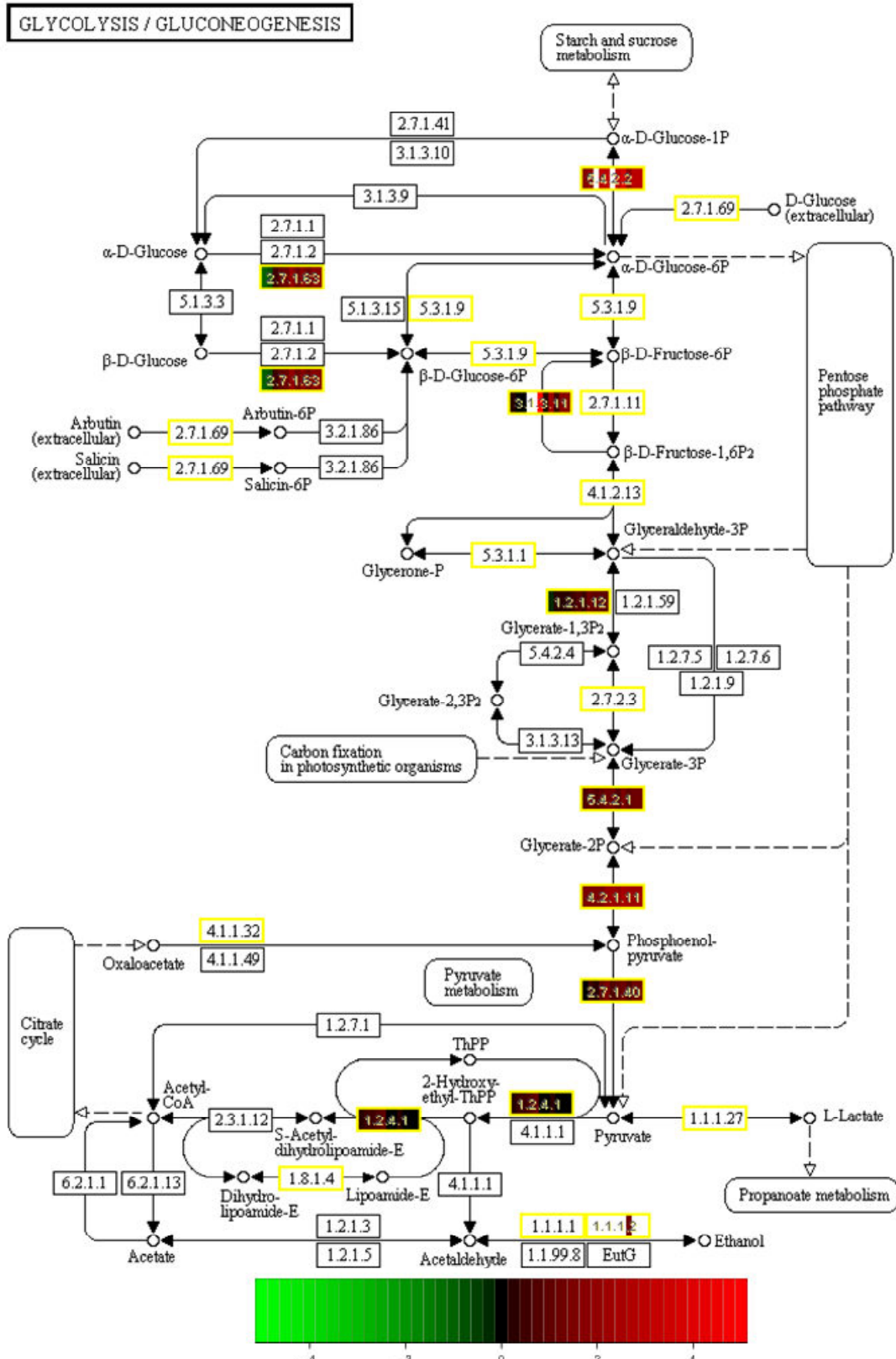


Abbildung 20: KeGG-Stoffwechselweg der Glykolyse aus QuPE. Daten der Quantitativen Proteomik (3.2.4) wurden in der Glykolyse abgebildet. In den Enzymnummern befindet sich die berechnete Abundanz. Die ersten fünf Striche gehören zu den 5 Messpunkten dem WT, die hinteren fünf Striche gehören zu den 5 Messpunkten der ΔkatA-Mutante. Die Hitze Karte beschreibt die Abundanz der Proteine zum Standard. Grün = weniger Peptide identifiziert als im Standard; rot = mehr Peptide identifiziert als der Standard; schwarz = genauso viele Peptide wie im Standard.

Neben der Abundanz der gefundenen Peptide, konnten auch die gefundenen Modifikationen den Zeitpunkten dem Gesamt-Proteom zugeordnet werden. Dabei ist auffällig, dass zu Zeitpunkt 1 der WT um den Faktor 1,8 mehr Modifikationen aufweist als die Katalasemutante (siehe Abbildung 21). Dies entspricht den Beobachtungen im Oxyblot (siehe Abschnitt 3.1.5). Zu den Zeitpunkten 2, 3 und 4 zeigen WT und Δ katA-Mutante eine ähnlich Anzahl an Modifikationen. Zu Zeitpunkt 5 weist die Δ katA-Mutante um den Faktor 2,3 mehr Modifikationen auf als der WT.

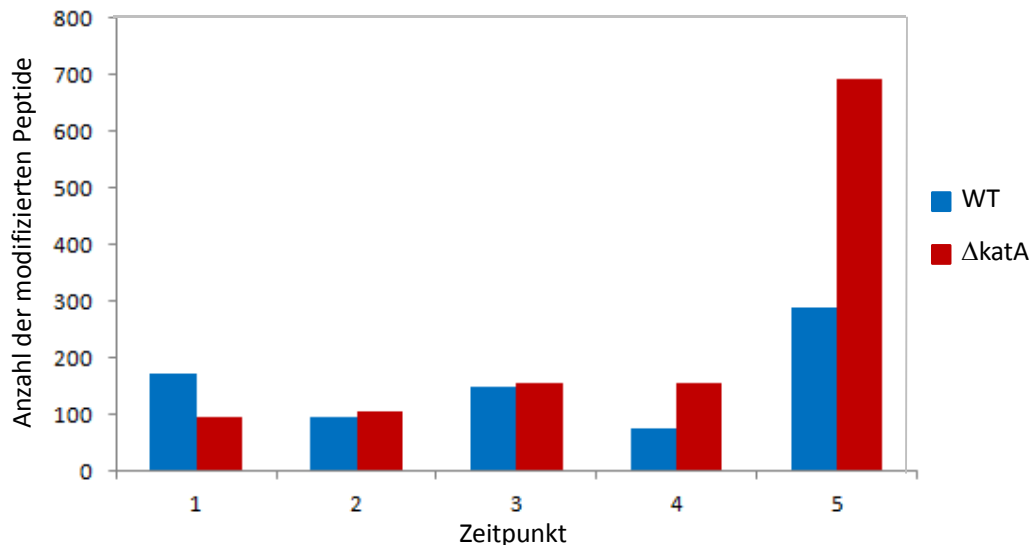


Abbildung 21: Anzahl der modifizierten Peptide, der Fermenterproben von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Mutante zu den 5 Probenentnahme-Zeitpunkten.

Eine graphische Zuordnung von Modifikationen zu den einzelnen Proteinen ist bisher mit diesem Programm nicht möglich.

3.3. Einfluss von oxidativem Stress auf ausgewählte Enzyme

3.3.1. Darstellung von oxidativ modifizierten Aminosäuren in 3D-Strukturmodellen

In Kapitel 3.2 wurden mittels Proteomanalyse sensitive Enzyme identifiziert, mit denen der Einfluss von ROS auf die Enzymaktivität untersucht werden soll. Bei den Enzymen handelt es sich um die FBA und die GAPDH aus der Glykolyse und die ICDH aus dem Citratzyklus.

Um die modifizierten Peptide der ausgewählten Enzyme besser betrachten zu können, wurde von jedem Enzym ein 3D-Modell herangezogen. War noch keine publizierte Kristallstruktur vorhanden, wurde dieses mittels des Computerprogramms 3D-PSSM moduliert.

Die FBA katalysiert die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GADP). Bei der FBA handelt es sich um ein

Tetramer. Die Untereinheiten werden mit Hilfe eines Helix-Schleife-Helix Motivs mit einander verbunden. Das aktive Zentrum befindet sich in einem β -Fass. Dieses besitzt als Cofaktor ein Zink-Ion. Bei *C. glutamicum* handelt es sich um eine Aldolase der Klasse II A. Diese unterscheidet sich von FBAs der Klasse II B, in dem sie längere Sequenzen zwischen den aktiven Zentren hat, die Schleifen (Loops) ausbilden können. Im Gegensatz zu eukaryotischen Aldolasen die zur Klasse I gehören, wird das Substrat nicht über eine Schiffsche Base stabilisiert sondern durch das Metallion [von der Osten *et al.*, 1989]. In Abbildung 22 ist die Proteinstruktur dargestellt. Die modifizierten Peptide, welche farblich dargestellt sind, liegen in den Bereichen, in welchen sich die Zink-Bindedomänen im β -Fass und im Helix-Schleife-Helix-Motiv, welches zur Koordination der Untereinheiten von Bedeutung ist, befinden.



Abbildung 22: Die modulierte Kristallstruktur einer Untereinheit der FBA. Das 3D-Modell wurde mittels der Software 3DPSSM moduliert. In Grün dargestellt ist die Proteingrundstruktur. In Gelb sind die Peptide eingezeichnet, welche in den LC-MS/MS Analysen Abschnitt 3.2.3 identifiziert worden sind eine Modifikation zu tragen. In Rot dargestellt sind die AS, die in der MS-Analyse als potentiell modifizierte AS gefunden wurden.

Die GAPDH katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Die energetisch ungünstige Abspaltung eines Wasserstoff-Ions der Aldehydgruppe des Glycerinaldehyd-3-Phosphats wird durch die kovalente Bindung einer Sulfhydrylgruppe eines Cysteins zugänglich gemacht. Dabei wird ein nukleophiler Rest eingeführt und das Wasserstoff-Ion wird heraus gelöst und zwischen Enzym und Substrat entsteht ein Thioester. Die energiereiche Verbindung bindet ein freies Phosphat und bildet dabei 1,3-Bisphosphoglycerat. Das Hydrid-Ion geht eine nicht kovalente Bindung mit einem NAD^+ ein [Stryer, 1996]. Die Thiolgruppen der Cysteine können bei vorhanden sein von ROS Disulfidbrücken ausbilden, wodurch das Enzym reversibel inaktiviert wird und es zum

Stillstand der Glykolyse kommt [Leichert *et. al.*, 2008]. In Abbildung 23 ist die vorhergesagt Kristallstruktur der GAPDH zu sehen. Es handelt sich dabei um ein Tetramer. Exemplarisch wurde nur eine Untereinheit mit den modifizierten Peptiden markiert. Basierend aus den MS-Daten Abschnitt 3.2.3 lagen die Peptide die eine Modifikation tragen nicht im aktiven Zentrum.

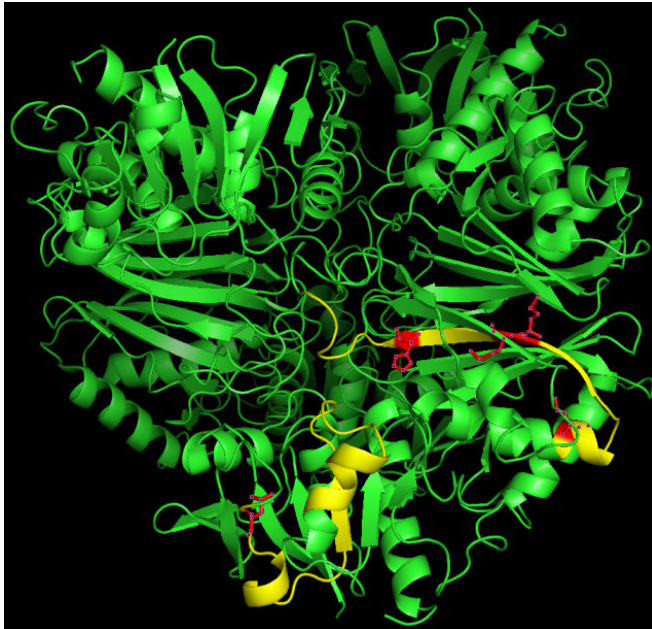


Abbildung 23: Die modulierte Kristallstruktur der GAPDH. Das 3D-Modell wurde mittels der Software 3DPSSM moduliert. In Grün dargestellt ist die Proteingrundstruktur. Zum Überblick wurde in einer Untereinheit die Peptide gelb eingezeichnet, welche in den LC-MS/MS Analysen Abschnitt 3.2.3 identifiziert worden sind eine Modifikation zu tragen. In Rot dargestellt sind die AS, die in der MS-Analyse als potentiell modifizierte AS gefunden wurden.

Die ICDH von *C. glutamicum* ist ein monomeres Enzym. Sie katalysiert die Reaktion der oxidativen Decarboxylierung von Isocitrat, wobei NADPH und α -Ketoglutarat entstehen. Das aktive Zentrum von dimeren ICDH-Enzymen, wie sie u.a. in *E. coli* vorkommen, wird durch die asymmetrische Zusammensetzung der zwei Untereinheiten gebildet. Dies ist hier nicht der Fall. Als Cofaktor dient ein Mg^{2+} -Ion, welches jedoch auch durch ein Mn^{2+} -Ion ersetzt werden kann. Die Kristallstruktur dieses Enzyms existiert bereits [Imabayashi *et al.*, 2006]. Isocitrat wird durch Ser130, Asn133, Arg137 und Arg143 koordiniert. An dieser Aminosäure Region treten keine modifizierte Peptide auf. Das Mg^{2+} -Ion wird durch Asp346, Asp548 und Asp544 koordiniert. Asp346 kommt in einer Region vor, in der modifizierte Peptide gefunden wurden. Es könnte die Möglichkeit bestehen, dass dieses Aspartat oxidiert wird und keine Verbindung zum Mg^{2+} -Ion aufbauen kann, was zur Instabilität des aktiven Zentrums führen würde.

NADP wird in der ICDH durch Ser581, Ala582, His585, Trp597, Arg645 und Arg696 koordiniert. Sowohl Ser581 als auch Ala582 liegen in einer Region in der modifizierte Peptide

vorkommen. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Bindung von NADP eine Schwachstelle in der ICDH bei oxidativen Stress sein kann. Zur besseren Orientierung befindet sich die Kristallstruktur in Abbildung 24.



Abbildung 24: Kristallstruktur der ICDH [Imabayashi *et. al.*, 2006]. In Grün dargestellt ist die Proteingrundstruktur. Zum Überblick wurde in einer Untereinheit die Peptide gelb eingezeichnet, welche in den LC-MS/MS Analysen Abschnitt 3.2.3 identifiziert worden sind eine Modifikation zu tragen. In Rot dargestellt sind die AS, die in der MS-Analyse als potentiell modifizierte AS gefunden wurden.

3.3.2. FBA, GAPDH und ICDH in der quantitativen Proteomanalyse

In Abschnitt 3.2.4 wurden Untersuchungen zur quantitativen Proteomik durchgeführt. In Abbildung 25 sind die Boxplots der quantitativen Proteomanalyse in der Fermentation von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm zu den 5 Zeitpunkten von FBA, GAPDH und ICDH dargestellt.

Die *Ratio(M)*-Werte werden über die Differenz des ^{15}N -Standards zu den 3 biologischen Replikaten mittels QuPE ermittelt. Die *Ratio(M)*-Werte zeigen die unterschiedliche Anzahl der identifizierten Peptide von ^{15}N -Standards und den untersuchten Proben im betrachteten Protein zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Zahlen 1-5 bezeichnen, an welchem Zeitpunkt die Proben entnommen wurden. Die oberen 5 Balken des Boxplots gehören zu den Daten des Wildtyps und die unteren 5 Balken beziehen sich auf die Daten der Δ katA-Mutante. Der Median bezeichnet den Bereich, in welche 50 % der Datenwerte liegen, die kleiner oder gleich diesem sind. Die Box selbst beschreibt 25 % bzw. 75 % (oberes und unteres Quartil)

der Datenwerte, die sich in diesem befinden. Die Antennen zeigen Datenwerte an, die sich im 1,5-fache des Interquartilsabstands einordnen. Die Kreise werden als Ausreißer bezeichnet. Wenn die Differenz der Mediane der Zeitpunkte 1 und 5 größer als 1 ist, bedeutet dies eine Regulation.

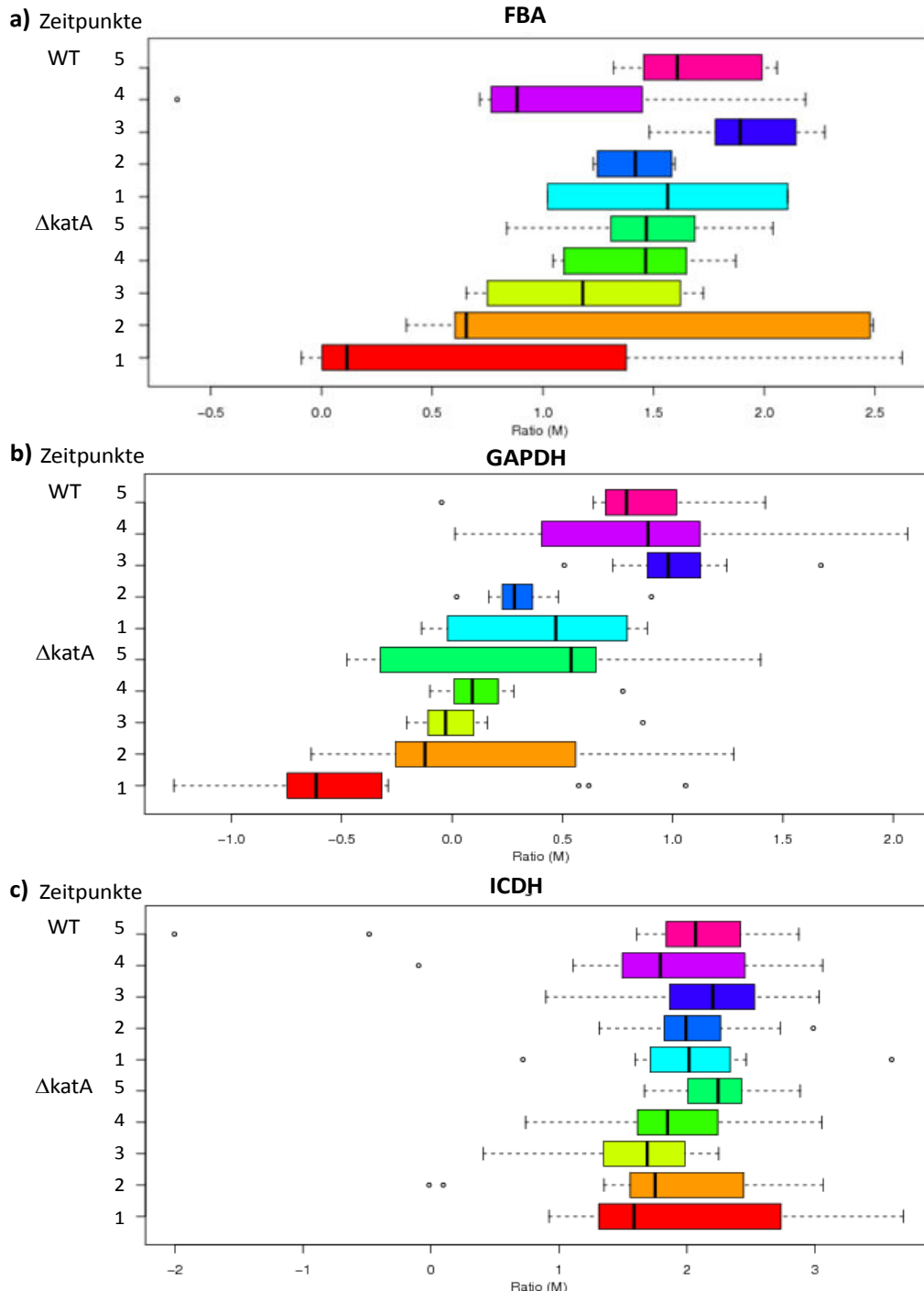


Abbildung 25: Boxplots von FBA (a), GAPDH (b) und ICDH (c) der quantitativen Proteomanalyse aus Abschnitt 3.2.4. (nach QuPE, vereinfachte Darstellung) Die Zahlen 1-5 bezeichnen, an welchem Zeitpunkt die Proben entnommen wurden. Die oberen 5 Balken des Boxplots gehören zu den Daten des WT. Die unteren 5 Balken beziehen sich auf die Daten des $\Delta katA$ -Mutante. Der Median, bezeichnet den Bereich, in welchem 50 % der Datenwerte liegen, die kleiner oder gleich diesem sind. Die Box selbst beschreibt 25 % bzw. 75% (oberes und unteres Quartil) der Datenwerte, die sich in diesem befinden. Die Antennen zeigen Datenwerte an, die sich im 1,5-fache des Interquartilsabstands einordnen. Die Kreise werden als Ausreißer bezeichnet. Ist die Differenz der Mediane der Zeitpunkte 1 und 5 größer als 1, bedeutet dies eine Regulation.

In Abbildung 25a ist der Boxplot der FBA dargestellt. In dem Fall der FBA beträgt die Differenz der Δ katA-Mutante 1,5. Beim WT schwankt die Differenz etwas über die Zeit, wird aber nie größer als 0,5. Somit wird die FBA in der Δ katA-Mutante hochreguliert, wohingegen sie beim WT gleichbleibt.

In der Abbildung 25b ist der Boxplot der GAPDH dargestellt. Die Differenz der Medianen der Δ katA-Mutante hat einen Wert von 1,2, dies zeigt eine Hochregulation. Die Datenwerte des WT ergeben eine Differenz von 0,3. Dies ist ein Zeichen für keine Regulation. Die GAPDH scheint wie die FBA in der Katalasemutante hochreguliert zu werden, wenn es zur plötzlichen Sauerstoffzufuhr kommt.

In Abbildung 25c ist der Boxplot der ICDH dargestellt. Die Differenz der Δ katA-Mutante hat einen Wert von 0,7. Die Werte des WT zeigen eine Differenz von 0,2. Sowohl in der Mutante als auch im WT ist keine Regulation dieses Enzyms sichtbar.

3.3.3. Einfluss von H₂O₂ auf die Enzymaktivität von Proteinen aus Zellextrakten

Die Sensitivität der FBA, GAPDH und ICDH wurden gegenüber H₂O₂ untersucht. Es wurden *C. glutamicum* WT und die Δ katA-Mutante zu einer OD₆₀₀ 8-10 angezogen und pelletiert. Die Zellpellets wurden mit TRIS-Puffer, welcher 2 mM DTT, 2 mM Desferal und Protease Inhibitormix beinhaltetete, aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Reagenz bestimmt. Um die Proben gegebenenfalls in der LC-MS/MS anschließend vermessen zu können, wurde ein TRIS/HCL-Puffer mit pH 7,5 verwendet. In dem Versuchsansatz befanden sich immer ca. 0,5 µg/µl Protein Endkonzentration des Zellextrakts. Die Enzymaktivität wurde photometrisch im Photometer und im Plattenlesegerät (Tecan) gemessen. Die verwendeten Substratkonzentrationen wurden über die Enzymkinetik bestimmt.

Zu Beginn des Versuchs wurde die Aktivität der Zellextrakte ungestresst vermessen. Im Anschluss wurden sowohl der WT-Zellextrakt als auch der Δ katA-Stamm-Zellextrakt mit 10 und 100 mM H₂O₂ 15 min gestresst. In Abbildung 26 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt. Die Aktivitäten der Enzyme aus gestressten WT-Zellextrakten sind nicht aufgeführt, da sich durch die Anwesenheit von viel Katalase die Aktivität nicht verändert hat. Zum besseren Vergleich sind die Enzymaktivitäten prozentual aufgeführt. Die Aktivität des WTs beträgt bei der FBA 3,4 nkatal/mg Zellextrakt, bei GAPDH 1,62 nkatal/mg Zellextrakt und bei ICDH 5,72 nkatal/mg Zellextrakt.

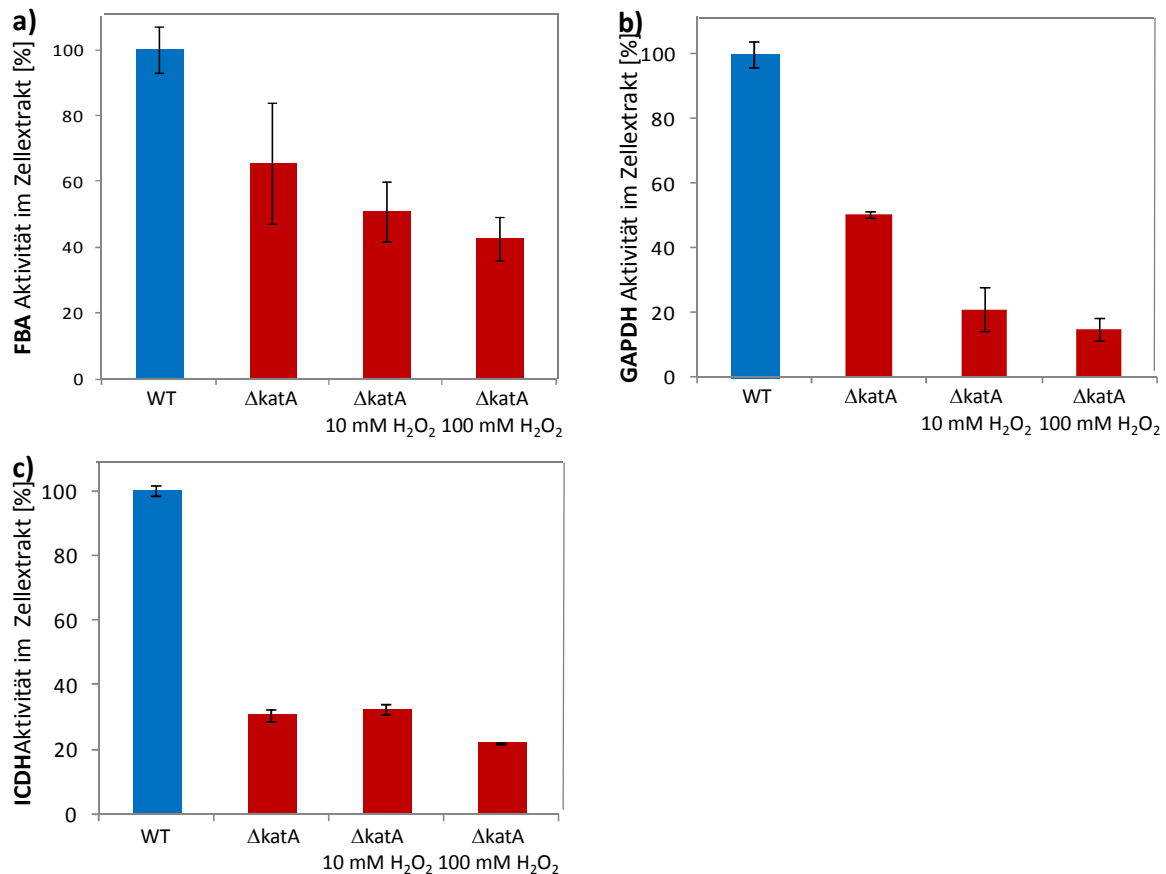


Abbildung 26: Einfluss von H₂O₂ auf die Enzymaktivität von FBA (a), GAPDH (b) und ICDH (c) gemessen in Zellextrakten. *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm wurden zu einer OD₆₀₀ 8-10 angezogen und die Zellen mit 2 mM DTT haltigem Puffer aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mit 10 und 100 mM H₂O₂ 15 min inkubiert und daraufhin die Aktivität gemessen. Zum besseren Vergleich sind die Aktivitäten in Prozent dargestellt. 100 % FBA Aktivität entsprechen 3,4 nkat/mg Zellextrakt. 100 % GAPDH Aktivität entsprechen 1,62 nkat/mg Zellextrakt und 100 % ICDH Aktivität entsprechen 5,72 nkat/mg Zellextrakt.

Obwohl WT und Δ katA-Mutante mit gleicher OD₆₀₀ verwendet wurden, ist die Enzymaktivität der Proteine des Zellextraktes der ungestressten Δ katA-Mutante fast immer ca. 50 % geringer als die des Wildtyps. Die Aktivität der FBA verringert sich bei 10 und 100 mM H₂O₂ jeweils um ca. 10 % (Abbildung 26a). Die Aktivität der GAPDH fällt nach dem Stress von 10 mM H₂O₂ in Δ katA-Stamm Zellextrakt deutlich von 50 % auf 25 %. Bei der Applikation von 100 mM H₂O₂ kommt es nur noch zu einer Aktivität von ca. 15 % (Abbildung 26b). Betrachtet man jedoch die ICDH Aktivität, wird diese bei 10 mM H₂O₂ im Vergleich zum ungestressten Δ katA-Stamm-Zellextrakt nicht beeinträchtigt. Bei einem Stress von 100 mM H₂O₂ fällt die ICDH Aktivität von 28 % auf 20 %. Demnach ist die ICDH am resistentesten gegenüber H₂O₂. Jedoch ist hier der Unterschied von *C. glutamicum* WT ICDH und Δ katA-Stamm ICDH am größten (Abbildung 26c). Von den drei getesteten Enzymen ist die GAPDH am sensitivsten gegenüber H₂O₂.

3.3.4. Einfluss von $^1\text{O}_2$ auf die Enzymaktivität von Proteinen aus Zellextrakten

Nachdem der Einfluss von H_2O_2 auf Proteine im *C. glutamicum* Zellextrakt untersucht wurde, wurde die Auswirkung von $^1\text{O}_2$ getestet. Singulett-Sauerstoff kann sowohl über Rose Bengal (RB) als auch über NaOCl dargestellt werden. Für die Untersuchungen im Zellextrakt wurde RB verwendet. Die Erstellung der Zellextrakte erfolgte wie in Absatz 3.3.1 beschrieben. Die Zellextrakte wurden mit 1, 10, 20 und 50 μM RB versetzt und 10 min bei 1000 Lux inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität gemessen. Zum besseren Vergleich sind die Enzymaktivitäten in Abbildung 27 prozentual dargestellt. Dabei entspricht 100 % bei der FBA (rot) 1,5 nkatal/mg Zellextrakt, 100 % bei der GAPDH (blau) 0,6 nkatal/mg Zellextrakt und bei der ICDH (gelb) entsprechen 100 % 7,6 nkatal/mg Zellextrakt. Der stärkste Einfluss von $^1\text{O}_2$ ist bei der ICDH zu sehen. Schon bei 1 μM RB liegt die Aktivität nur noch bei 60 % und fällt bei 50 μM RB weiter auf 20 %. Die FBA weist bei 1 μM RB eine Aktivität von 75 % auf, diese jedoch fällt bei 50 μM RB ebenfalls auf ca. 20 % Restaktivität. Die GAPDH hingegen zeigt bei 1 μM RB eine Aktivität von 85 %, die sich dann auf 70 % Aktivität bei 50 μM RB einpendelt.

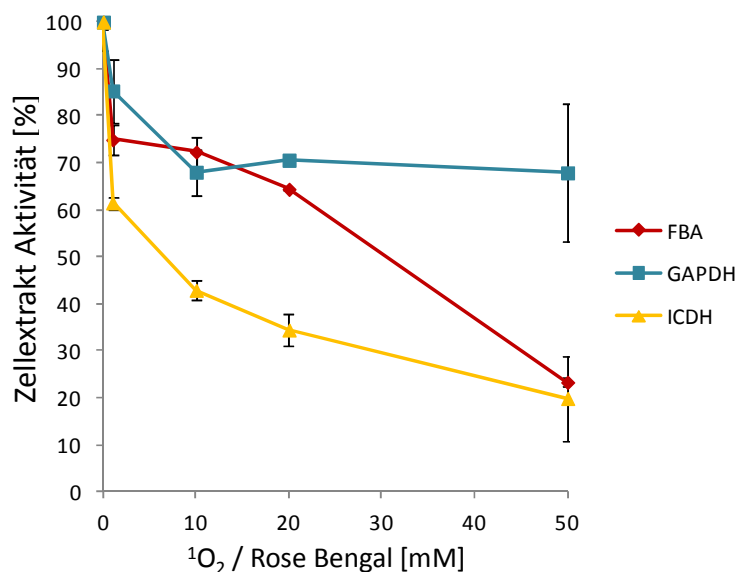


Abbildung 27: Einfluss von $^1\text{O}_2$ auf die Enzymaktivität von FBA, GAPDH und ICDH gemessen in Zellextrakten. *C. glutamicum* WT und ΔkatA -Stamm wurden zu einer OD_{600} 8-10 angezogen und die Zellen mit 2 mM DTT haltigem TRIS-Puffer aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mit 1, 10, 20 und 50 μM Rose Bengal (RB) 10 min bei 1000 Lux inkubiert. Daraufhin wurde die Aktivität gemessen. Zum besseren Vergleich sind die Aktivitäten in Prozent dargestellt. 100 % FBA entsprechen 1,5 nkatal/mg Zellextrakt. 100 % GAPDH entsprechen 0,6 nkatal/mg Zellextrakt und 100 % ICDH entsprechen 7,6 nkatal/mg Zellextrakt.

Der Einfluss von $^1\text{O}_2$ ist genau umgekehrt zu dem von H_2O_2 betrachtet man nur die Werte des *C. glutamicum* ΔkatA -Stamm-Zellextrakts. Während bei H_2O_2 -Stress die ICDH nur geringen Aktivitätsverlust zeigt, ist die Aktivität bei RB-Applikation stark eingeschränkt. Die GAPDH jedoch scheint stärker auf H_2O_2 -Stress zu reagieren als auf $^1\text{O}_2$ -Stress. Kommt es nach

der Applikation von RB nicht zu einer Inkubation bei Licht, wird auch die Enzymaktivität kaum beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

3.3.5. Massenspektrometrische Analysen der Zellextrakte aus den Enzymtests

Die gestressten Zellextrakte, welche für Enzymtest verwendet wurden, wurden ebenfalls massenspektrometrisch analysiert. Die Visualisierung von Carbonylierungen einzelner Proteine ist mittels Oxyblot im Zellextrakt nicht möglich, da alle Carbonylierungen, der im Zellextrakt vorhandenen Proteine, detektiert werden würden. Daher wurden die Proben anhand von LC-MS/MS untersucht.

Die Ansätze der Zellextrakte *C. glutamicum* WT und Δ katA-Mutante ungestresst, WT mit 20 μ M RB und 100 mM H₂O₂, Δ katA-Mutante 10 und 100 H₂O₂ wurden vermessen.

Die ersten Analysen erfolgten mittels qualitativer Proteomik. In den Proben, die mit 20 μ M Rose Bengal gestresst wurden, konnten keine der gesuchten PTM gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die Zellextrakte der Δ katA-Mutante, welche mit 10 und 100 mM H₂O₂ gestresst wurden, zeigten in den ausgewählten Proteinen unterschiedlich viele Modifikationen. Dies ist am Beispiel von FBA und ICDH Abbildung 28 und Abbildung 29 gezeigt. Um die Peptid-Abdeckung des Proteins zu veranschaulichen, wurden die Peptide dort eingezeichnet, wo sie sich in der Sekundärstruktur (x-Achse) im Enzym befinden. Die gefundenen Peptide und die Häufigkeit, mit der sie gefunden wurden, sind in blau dargestellt. Den 18 gesuchten Modifikationen wurden Farben zugeteilt, die in der Legende zu entnehmen sind. Monooxidationen wurden zusammengefasst, da sie aus technischen Gründen nicht voneinander unterscheidbar sind, und werden in rot dargestellt. Wurde eine Modifikation in einem Peptid gefunden, wird dieses Peptid in der Farbe der Modifikation im Grafen dargestellt. Sowohl in der FBA als auch in der ICDH ist von 10 mM auf 100 mM H₂O₂ ein Zuwachs an Modifikationen zu erkennen. Die Anzahl der gefundenen PTMs korreliert jedoch nicht mit der Verminderung der Enzymaktivität der gestressten Zellextrakte aus Abschnitt 3.3.3.

Ergebnisse

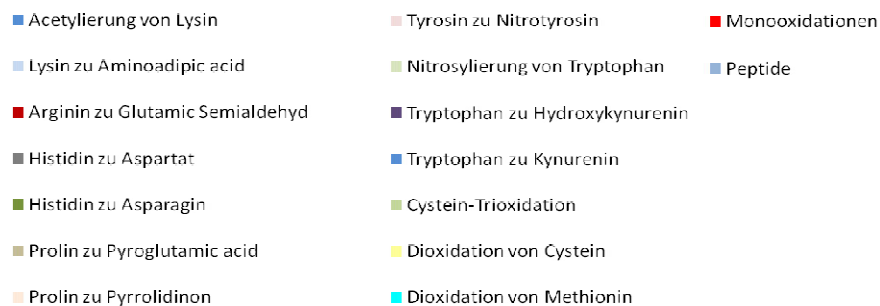
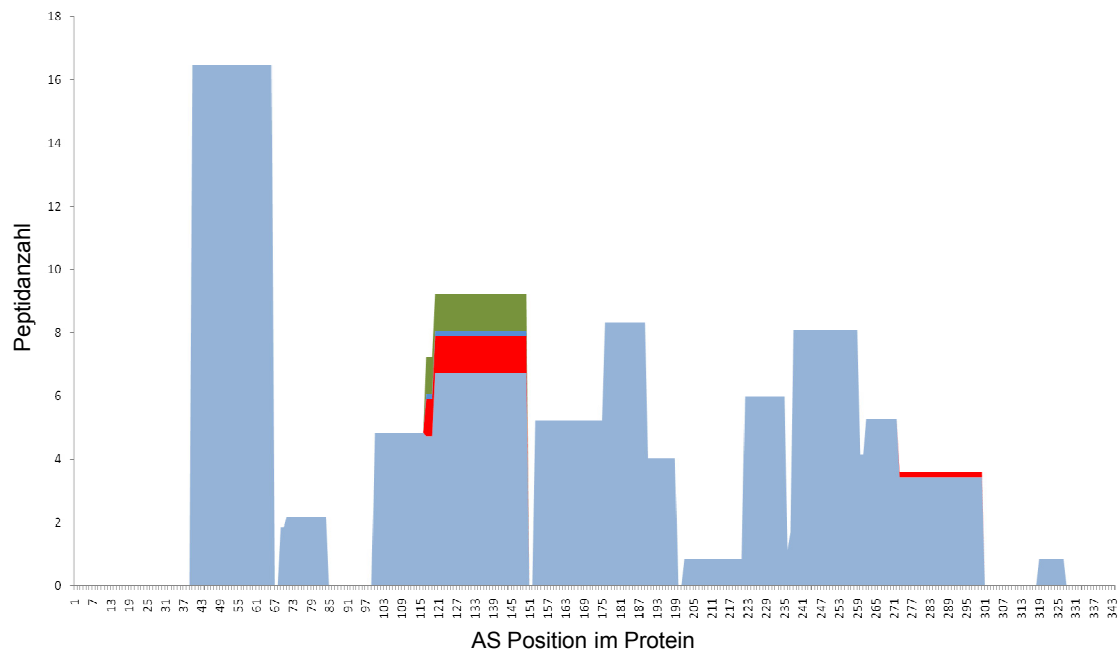
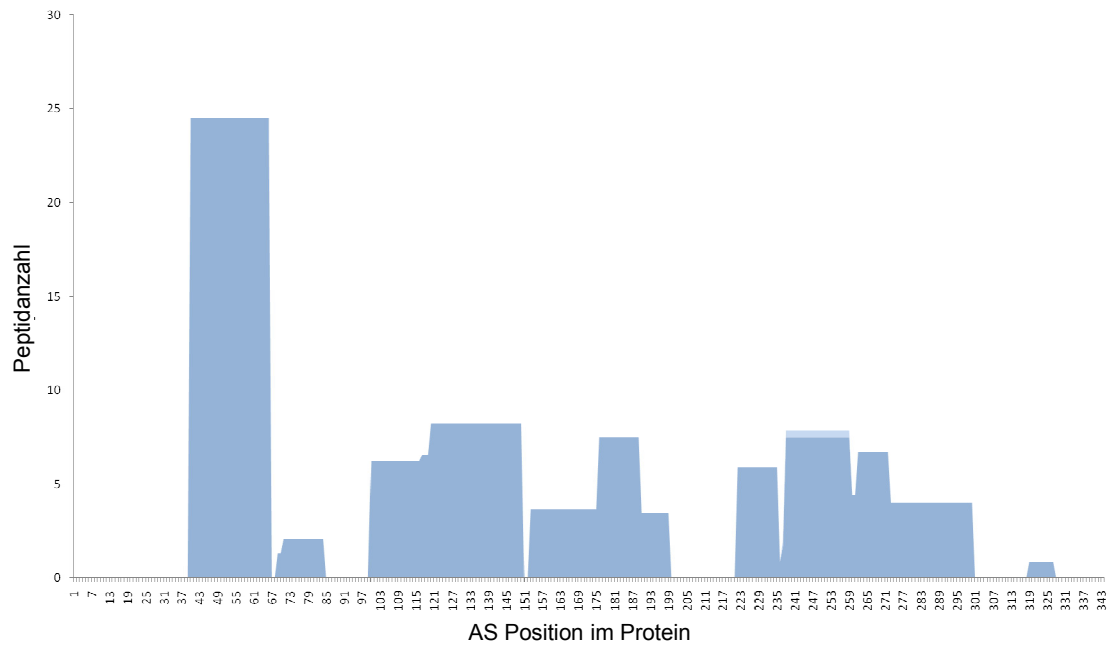


Abbildung 28: Daten der Proteomanalyse der FBA aus Abschnitt 3.3.5. Dargestellt ist die Anzahl der gefundenen Peptide abgebildet auf der AS-Abfolge. Die FBA besteht aus 343 AS. In Blau gekennzeichnet sind die Peptide. In der Legende sind die PTMs Farben zugeordnet. Trägt ein gefundenes Peptid solch eine PTM wird es farblich in der AS-Abfolge dargestellt. Die Zellextrakte der Δ katA-Mutante wurden mit 10 mM (oben) und 100 mM H_2O_2 (unten) gestresst.

Ergebnisse

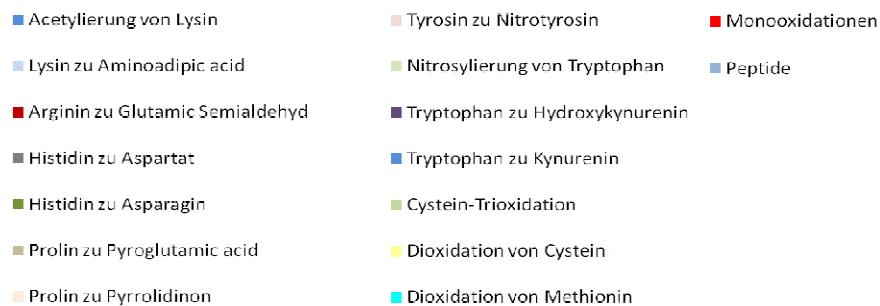
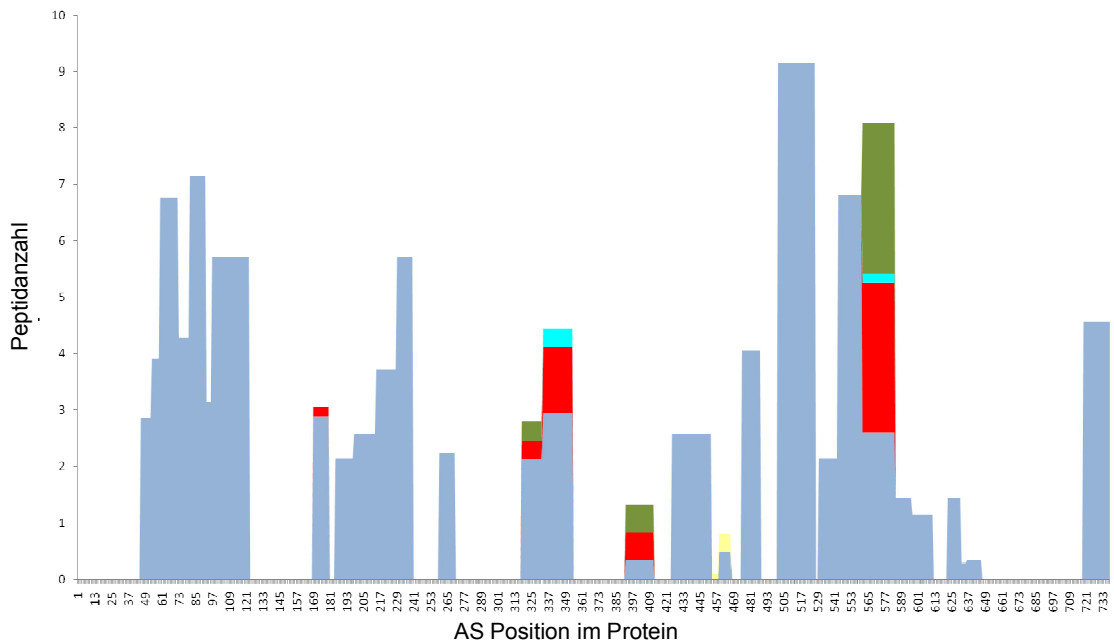
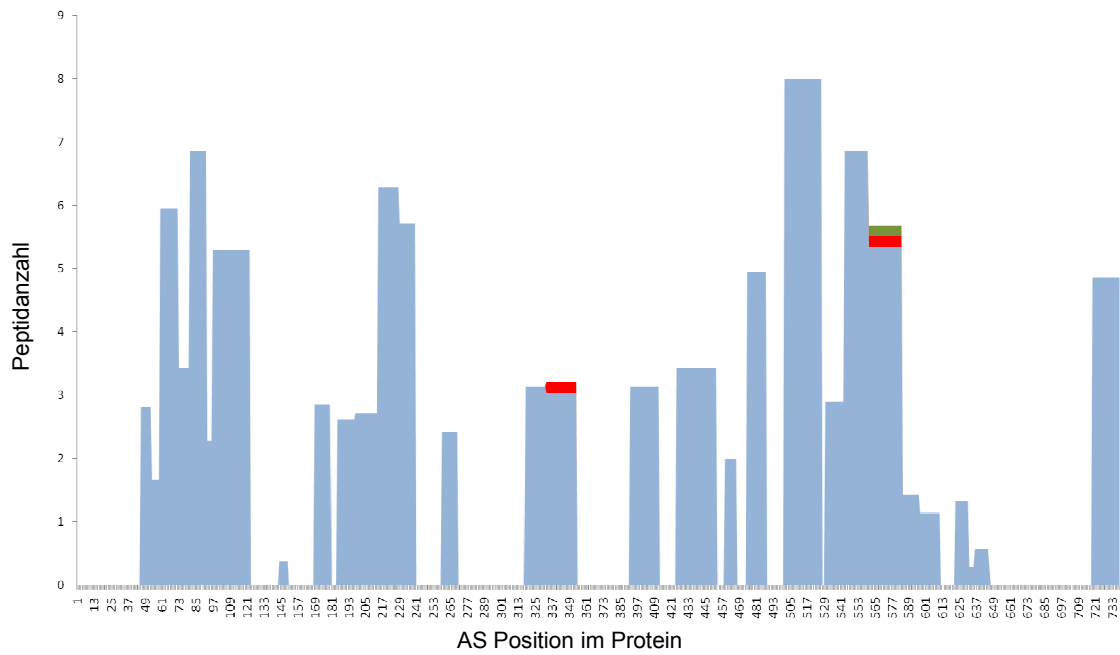


Abbildung 29: Daten der Proteomanalyse der ICDH aus Abschnitt 3.3.5. Dargestellt ist die Anzahl der gefundenen Peptide abgebildet auf der AS-Abfolge. Die ICDH besteht aus 733 AS. In Blau gekennzeichnet sind die Peptide. In der Legende sind die PTMs Farben zugeordnet. Trägt ein gefundenes Peptid solch eine PTM wird es farblich in der AS-Abfolge dargestellt. Die Zellextrakte der Δ kata-Mutante wurden mit 10 mM (oben) und 100 mM H_2O_2 (unten) gestress.

Da die Daten der quantitativen Proteomik nicht mit den verminderten Aktivitäten der Enzymtests übereinstimmten, wurden die Analysen mit qualitativer Proteomik wiederholt. Bisher ist es jedoch nicht möglich mit dem Programm QuPE die gefundenen Modifikationen auf einzelne Enzyme abzubilden. In Abbildung 30 ist der vorläufige Stand der Analysen gezeigt. Die Anzahl der gefunden, modifizierten Peptide konnte den unterschiedlichen Stressoren zugeordnet und auf das gesamte Proteom abgebildet werden.

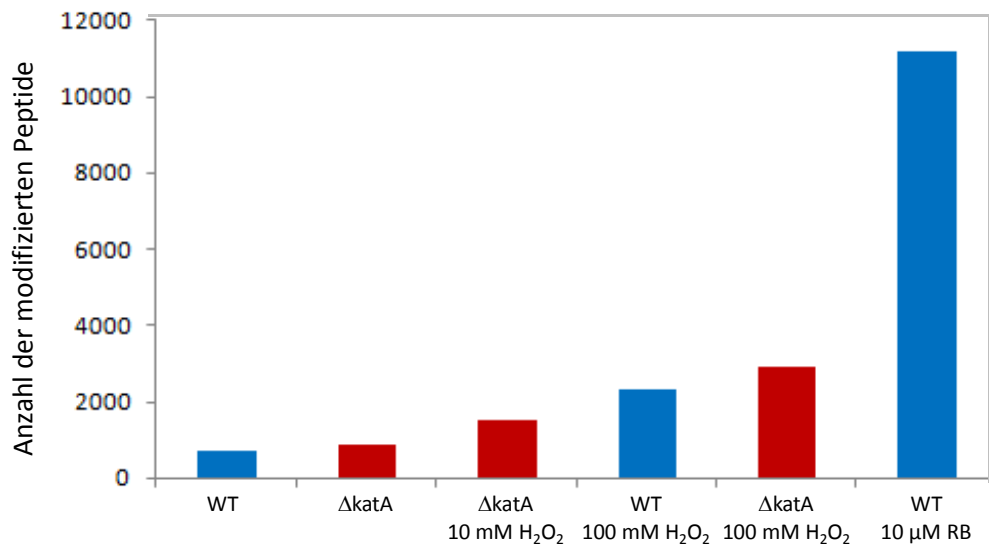


Abbildung 30: Anzahl der Peptide des Proteoms, die bei unterschiedlichen ROS-Stressoren eine PTM aufweisen. Gezeigt sind die quantitativen MS-Messungen der ungestressten und mit 10, 100 H₂O₂ und mit 20 μM RB gestressten Zellextrakte von WT(blau) und ΔkatA-Mutante (rot).

In den Proteomanalysen wurden für WT ungestresst 60000 Peptide gefunden, für WT mit 100 mM H₂O₂ gestresst wurden 50000 Peptide gefunden und für WT mit 20 μM RB gestresst wurden 75000 Peptide gefunden. In den Proteomanalysen der Katalasemutante wurden im ungestressten Ansatz 100000 Peptide gefunden, im Ansatz mit 10 mM H₂O₂ wurden 65000 Peptide gefunden und im Ansatz mit 100 mM H₂O₂ wurden 55000 Peptide gefunden. In Abbildung 30 ist die Anzahl der Peptide dargestellt, welche eine Modifikation in den unterschiedlichen Ansätzen tragen. Demnach haben *C. glutamicum* WT und ΔkatA-Mutante ähnlich viele PTMs im ungestressten Zustand. Dies bedeutet, dass ca. 1 % aller gefundenen Peptide eine PTM tragen. In der Katalasemutante steigt die Anzahl der modifizierten Peptide von 2,3 % bei 10 mM H₂O₂ auf 5 % bei 100 mM H₂O₂. Betrachtet man den WT, zeigt auch dieser bei 100 mM H₂O₂ mehr Modifikationen, ca. 4 % der gefundenen Peptide tragen eine PTM. Jedoch scheint der stärkste Stressor ¹O₂ zu sein. Es wurden ca. 11000 PTMs im WT mit RB gefunden, was ca. 13,5 % der gefundenen Peptide ausmacht.

3.3.6. Aufreinigung der FBA, GAPDH und ICDH

Massenspektrometrische Analysen sind zeitaufwendig. Aus diesem Grund musste eine Strategie erarbeitet werden, bei der es möglich ist, auf schnellem Wege PTMs in einzelnen Proteinen zu visualisieren. Um im Oxyblot Carbonylierungen einzelner Enzyme sichtbar zu machen, müssten diese aufgereinigt werden. Es wurden Überexpressionsplasmide (pASK-IBA3 mit C-terminalen Strep-tag) von FBA, GAPDH und ICDH konstruiert. Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21 überexprimiert und dann über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule aufgereinigt.

Die Aufreinigung der FBA erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit [Schlidt, 2011]. Wie in Abbildung 31 zu sehen, konnte die FBA (39 kDa) sowohl im Coomassie-Gel als auch im Westernblot detektiert werden. Die am höchsten konzentrierte Elution wies einen Proteingehalt von 0,08 µg/µl auf. Das Enzym zeigte jedoch keine Aktivität. Selbst nach Optimierung der Reinigung und des Enzymtests sowie der Umklonierung des Strep-tags zeigte sich keine Verbesserung. Es wurde ein Oxyblot mit den Proben der Reinigung erstellt. Dieser zeigte, dass das Enzym sehr viele Carbonylierungen aufwies (Abbildung 31). Aber auch eine Reinigung der FBA unter anaeroben Bedingungen im anaeroben Zelt in völlig sauerstofffreier Umgebung führte zu keiner Verbesserung der Enzymaktivität.

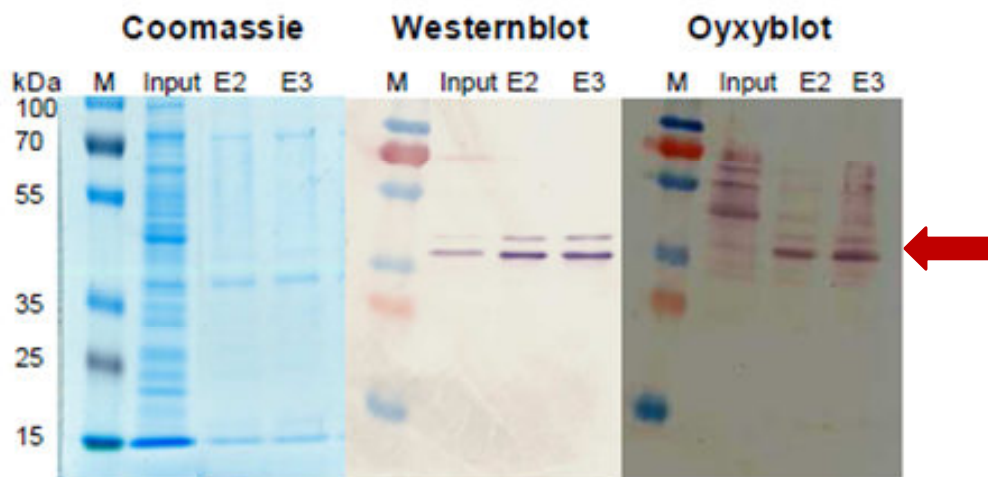


Abbildung 31: Reinging der FBA. Die FBA wurde in den pASK-IBA3 kloniert und in *E. coli* BL21 überexprimiert. Die Reinigung erfolgte über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule. Links ist das Coomassie-Gel von Input (I) und Elution 2 (E2) und 3 (E3) zusehen. In der Mitte befindet sich der Westernblot und auf der rechten Seite ist der Oxyblot zusehen. Die FBA hat eine molekulare Masse von 39 kDa (roter Pfeil).

Die Aufreinigung der GAPDH erfolgte ebenfalls über einen pASK-IBA3 Vektor und wurde mittels *E. coli* BL21 überexprimiert. Die Aufreinigung wurde über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule durchgeführt. In Abbildung 32 ist das Coomassie-Gel der Aufreinigung zu sehen. Die GAPDH hat ein Molekulargewicht von 37 kDa (blauer Pfeil). Die Elution mit dem

höchsten Proteinanteil besitzt eine Konzentration von 5,5 µg/µl. Es ist möglich, das Enzym aktiv zu reinigen.

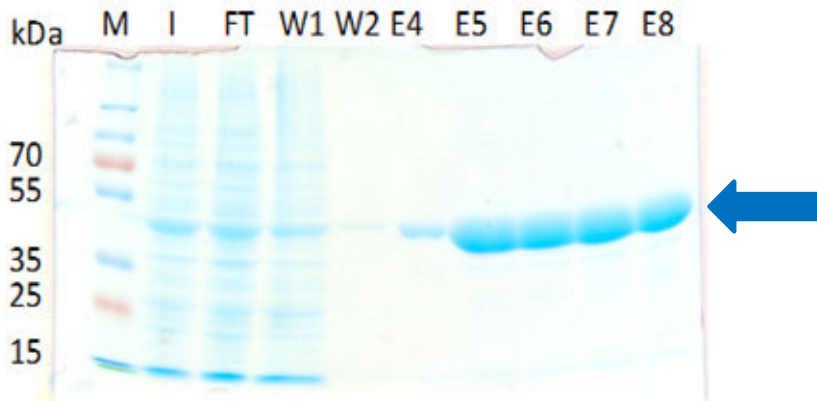


Abbildung 32: Coomassie-Gel der Reinigung der GAPDH. Die GAPDH wurde in den pASK-IBA3 kloniert und in *E. coli* BL21 überexprimiert. Die Reinigung erfolgte über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule. Die Molekularemasse der GAPDH beträgt 37 kDa (blauer Pfeil). Es konnte eine Proteinkonzentration von 5,5 µg/µl ermittelt werden.

Die Reinigung der ICDH erfolgte ebenso über einen pASK-IBA3 Vektor und wurde mittels *E. coli* BL21 überexprimiert. In Abbildung 33 ist das Coomassie-Gel der Aufreinigung zu sehen. Die ICDH hat ein Molekulargewicht von 80 kDa. Die Elution mit dem höchsten Proteinanteil besitzt eine Konzentration von 0,5 µg/µl. Es ist möglich das Enzym aktiv zu reinigen.

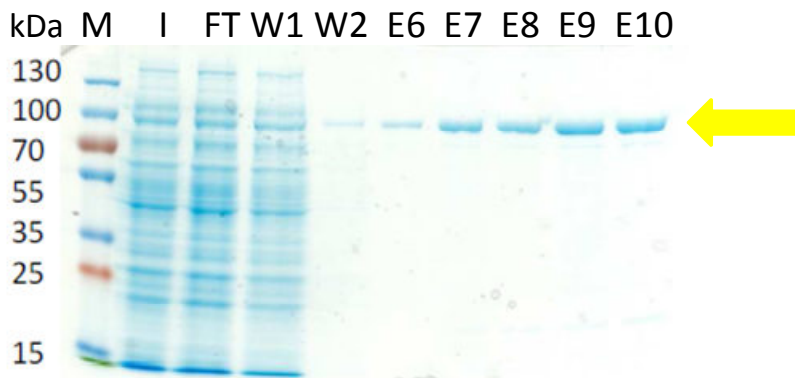


Abbildung 33: Coomassie-Gel der Reinigung der ICDH. Die ICDH wurde in den pASK-IBA3 kloniert und in *E. coli* BL21 überexprimiert. Die Reinigung erfolgte über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule. Die Molekularemasse der ICDH beträgt 80 kDa (gelber Pfeil). Es konnte eine Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl ermittelt werden.

3.3.7. Einfluss von H₂O₂-Stress auf die gereinigte GAPDH und ICDH

Nachdem die GAPDH und ICDH erfolgreich gereinigt wurden, wurde der Einfluss von H₂O₂ auf die Enzymaktivität untersucht.

Die GAPDH erwies sich als sehr sensitiv gegenüber H₂O₂. Daher wurden im Enzymtest nur niedrige H₂O₂-Konzentrationen und ca. 0,075 µg/µl Endkonzentration Protein eingesetzt.

Ergebnisse

Enzym und Puffer wurden mit 0,001, 0,01, 0,1, 1 und 10 mM H₂O₂ 15 min inkubiert und die Enzymaktivität gemessen. Zudem wurden die GAPDH mit der gleichen Konzentration H₂O₂ für einen Oxyblot gestresst. Die Banden auf dem Oxyblot der GAPDH wurden mit dem Computerprogramm PCBAS densitrometrisch vermessen. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der beiden Versuche zusammengestellt. 100 % GAPDH Aktivität entspricht 37,5 nkatal/mg Protein. Es ist zu beobachten, dass die Aktivität sinkt je stärker die Carbonylierung wird. Die GAPDH ist viel sensitiver für H₂O₂ als in den Messungen der Zellextrakte. Bei 1 mM H₂O₂ ist die GAPDH komplett inaktiv, wohingegen die GAPDH in den Zellextrakten noch Aktivität zeigt (siehe Abschnitt 3.3.3).

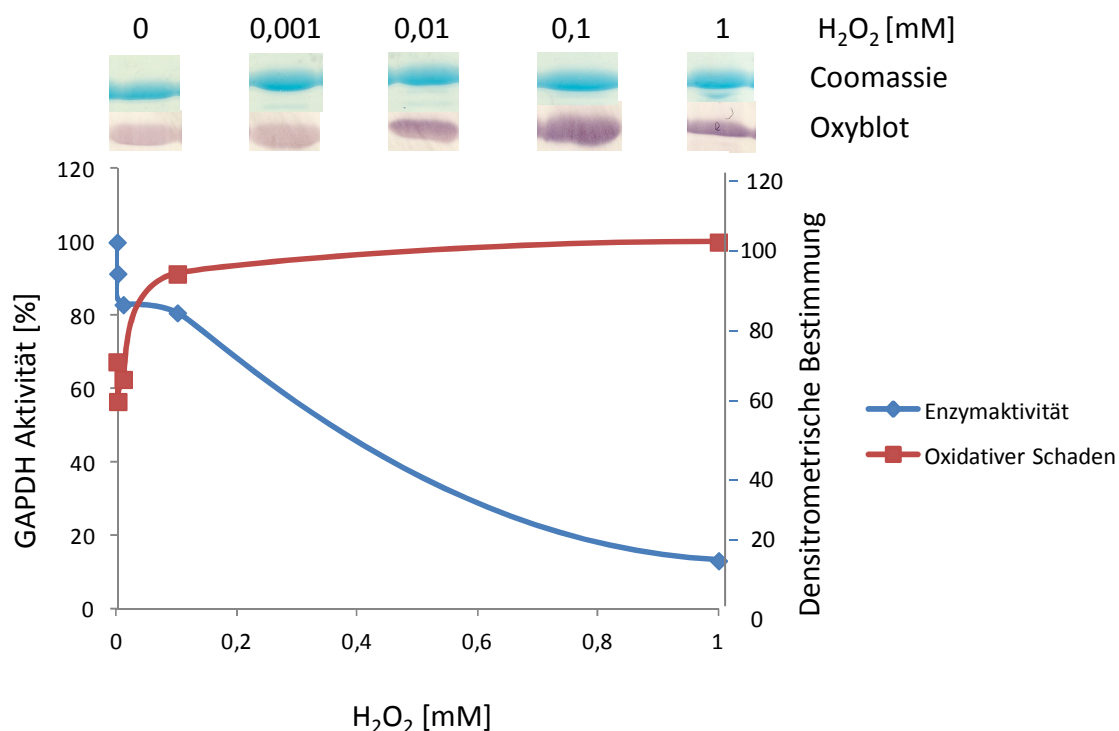


Abbildung 34: Einfluss von H₂O₂ auf gereinigte GAPDH gezeigt an Enzymaktivität und Oxyblot. Das Enzym wurde mit 0, 0,001, 0,01, 0,1, und 1 mM H₂O₂ 15 min inkubiert. Die Enzymaktivität wurde zum besseren Vergleich in Prozent dargestellt. 100 % GAPDH Aktivität entspricht 37,5 nkatal/mg Protein. Der Oxyblot wurde mittels des Computerprogramms PCBAS densitrometrisch ausgewertet.

In den ICDH Enzymtest wurden ca. 0,005 µg/µl Endkonzentration Protein eingesetzt. Enzym und Puffer wurden mit 10, 25, 50, 75 und 100 mM H₂O₂ 15 min inkubiert und die Enzymaktivität gemessen. Die ICDH wurde mit der gleichen Konzentration H₂O₂ für einen Oxyblot gestresst. Die Banden der ICDH wurden mit dem Computerprogramm PCBAS densitrometrisch vermessen. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der beiden Versuche zusammengestellt. 100 % ICDH Aktivität entspricht 510 nkatal/mg Protein. Die gereinigte ICDH ist resistenter gegenüber H₂O₂ als die GAPDH. Wie bei der GAPDH zeigt die ICDH eine

geringere Aktivität je stärker sie carbonyliert ist. Die gereinigte ICDH ist etwas sensiver für H_2O_2 als in den Messungen der ICDH Aktivität in Zellextrakten (siehe Abschnitt 3.3.3).

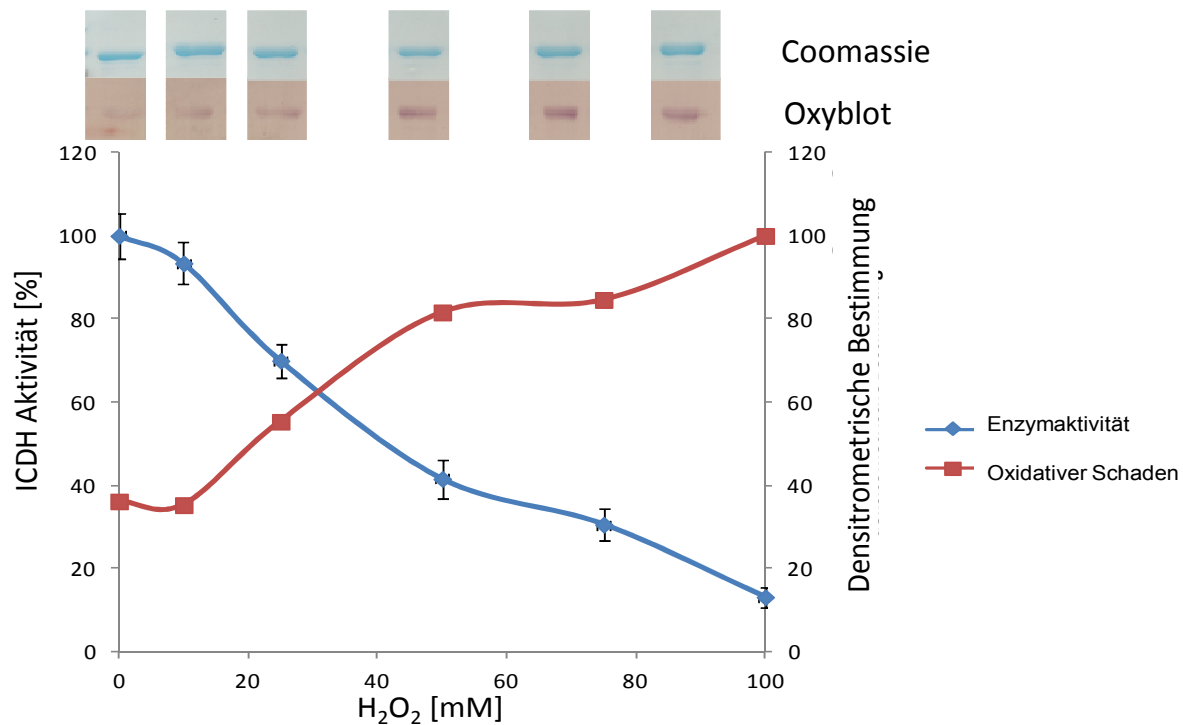


Abbildung 35: Einfluss von H_2O_2 auf gereinigte ICDH zeigt an Enzymaktivität und Oxyblot. Das Enzym wurde mit 10, 25, 50, 75 und 100 mM H_2O_2 15 min inkubiert. Die Enzymaktivität wurde zum besseren Vergleich in Prozent dargestellt. 100 % ICDH Aktivität entspricht 510 nkatal/mg Protein. Der Oxyblot wurde mittels des Computerprogramms PCBAS densitrometrisch ausgewertet.

Sowohl GAPDH als auch ICDH zeigen eine Korrelation zwischen appliziertem Stress, oxidativer Modifikation und Verminderung der Enzymaktivität.

3.3.8. Einfluss von 1O_2 auf die gereinigte GAPDH und ICDH

Nachdem der Einfluss von H_2O_2 auf die gereinigten Enzyme gezeigt werden konnte, wurde nun der Einfluss von 1O_2 untersucht. Für die Bildung von 1O_2 wurde Rose Bengal verwendet. Die Enzymtests wurden wie in Abschnitt 3.3.7 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass verschiedene Konzentrationen RB verwendet wurden. Inkubiert wurden die Proben 10 min bei 1000 Lux. In Abbildung 36a sind die Aktivitäten der GAPDH gezeigt. Das Enzym wurde mit 1, 10 und 20 μM RB gestresst. 100 % Aktivität der GAPDH beträgt 35 nkatal/mg Protein. Bei 1 μM RB liegt die Aktivität bei 86 %, bei 10 μM RB 32 % und bei 20 μM bei 4,5 %. Die gereinigte GAPDH ist sensiver als die GAPDH in den Zellextraktmessungen (siehe Abschnitt 3.3.4).

In Abbildung 36b sind die Aktivitäten der ICDH dargestellt. Das Enzym wurde mit 1, 5, 10, 20 und 50 μM RB gestresst. Die 100 % Aktivität der ICDH entspricht 260 nkatal/mg Protein. Bei 1 μM RB liegt die Aktivität bei 86 %, bei 10 μM RB 61 % und bei 20 μM bei 40 %. Die gereinigte ICDH verhält sich ähnlich wie die ICDH in den Zellextraktmessungen (siehe Abschnitt 3.3.4). Es war nicht möglich die mit RB gestressten Proben im Oxyblot zu visualisieren.

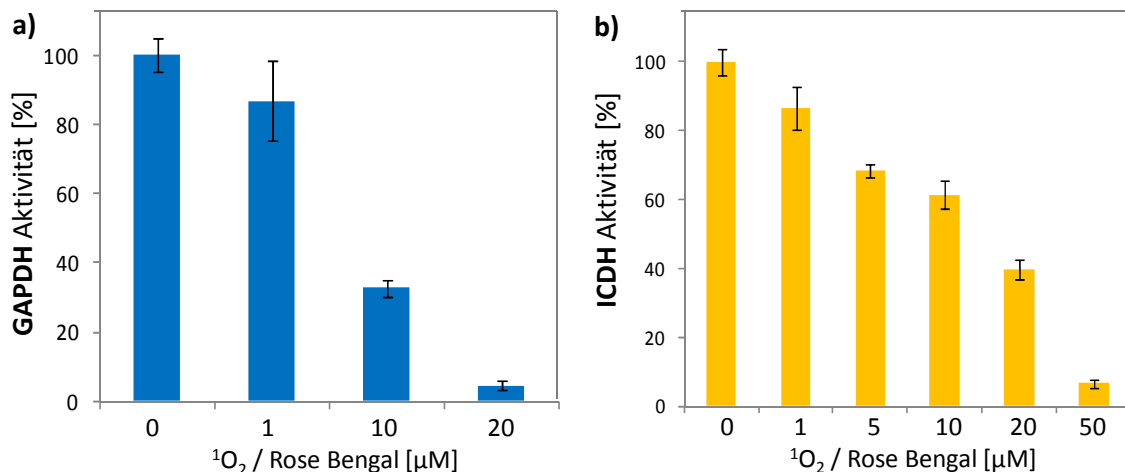


Abbildung 36: Einfluss von $^1\text{O}_2$ auf die Enzymaktivität von gereinigter GAPDH (links) und ICDH (rechts). Die GAPDH wurden mit 1, 10 und 20 μM Rose Bengal (RB) 10 min bei 1000 Lux inkubiert und daraufhin die Aktivität gemessen. Die ICDH wurde mit 1, 5, 10, 20 und 50 μM RB 10 min bei 1000 Lux inkubiert. Zum besseren Vergleich sind die Aktivitäten in Prozent dargestellt. 100 % GAPDH entsprechen 35 nkatal/mg Protein und 100 % ICDH entsprechen 260 nkatal/mg Protein.

3.4. Strategien zur Identifizierung von ROS-Schutzmechanismen in *C. glutamicum*

3.4.1. ROS-Schutz durch die Überexpression der Alkylhydroperoxid-Reduktase (AhpCF) aus *E. coli* in *C. glutamicum*

In Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, inwieweit die ausgewählten Enzyme auf oxidativen Stress reagieren. Im nächsten Schritt wurden anhand dieser Enzyme Strategien untersucht, in denen *C. glutamicum* WT durch enzymatische und nicht-enzymatische ROS-Schutzmechanismen eine Verbesserung der ROS-Resistenz zeigt. Zudem soll so ein besseres Verständnis für ROS-Schutzmechanismen in *C. glutamicum* gewonnen werden.

C. glutamicum besitzt nur eine Katalase, um sich vor H_2O_2 zu schützen. Andere Bakterien wie *E. coli* und *Bacillus subtilis* besitzen neben einer Katalase eine Alkylhydroperoxid-Reduktase (AhpC). In *E. coli* sind die Gene dieses Enzyms in einem Operon lokalisiert *ahpC* und *ahpF*. Die Katalase ist unter bestimmten Bedingungen nur eingeschränkt aktiv, z. B. bei starken pH-Schwankungen und unter Eisenmangel. Eine Überexpression der AhpCF aus *E. coli* in

C. glutamicum könnte zu einer verbesserten Resistenz gegenüber H_2O_2 führen. Damit man den Einfluss der AhpCF besser erkennen kann, wurde diese in dem $\Delta katA$ -Stamm überexprimiert. Zum Vergleich wurde in diesem Stamm auch die *C. glutamicum* Katalase komplementiert. Als Überexpressionsplasmid wurde der pEKEx2 gewählt. *C. glutamicum* WT, $\Delta katA$ -Stamm, $\Delta katA_pEKEx2_katA$ -Stamm und $\Delta katA_pekex2_ahpCF$ -Stamm wurden zu einer OD_{600} 5 angezogen und auf OD_{600} 0,2 verdünnt. Die Stämme wurden daraufhin mit 1, 10 und 100 mM H_2O_2 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Katalase gestoppt, die Zellen bis 10^{-4} verdünnt und auf BHI Platten getropft. Abbildung 37 zeigt, dass alle Stämme bei 1 mM H_2O_2 ein gleich gutes Wachstum aufweisen. Wird mit 10 mM H_2O_2 gestresst, zeigt die $\Delta katA$ -Mutante ein schlechtes Wachstum, wohingegen die $\Delta katA_pEKEx2_ahpCF$ -Mutante ein etwas besseres Wachstum zeigt. Die $\Delta katA_pEKEx2_katA$ -Mutante ist genauso resistent wie der Wildtyp. Die Applikation von 100 mM H_2O_2 ist für die $\Delta katA$ -Mutante letal. Der $\Delta katA_pEKEx2_ahpCF$ -Stamm zeigt weiterhin ein geringes Wachstum als der WT.

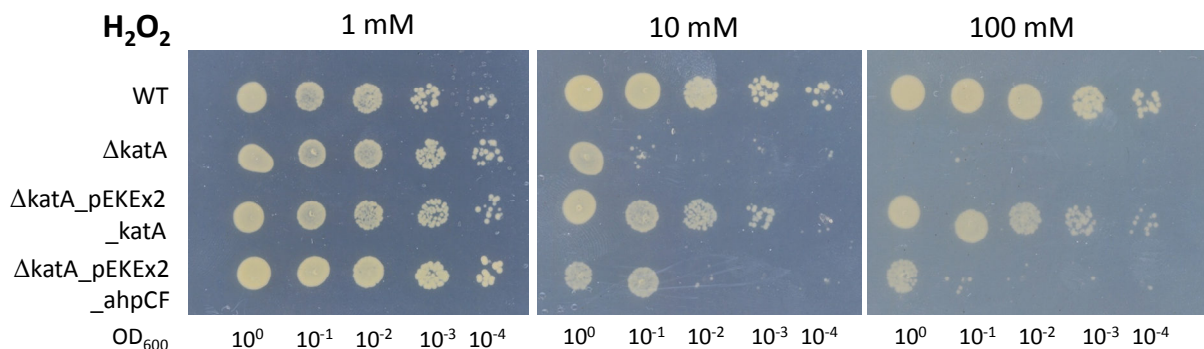


Abbildung 37: Tropftest von *C. glutamicum* WT, $\Delta katA$ -Mutante, $\Delta katA_pEKEx2_katA$ -Stamm und $\Delta katA_pEKEx2_ahpCF$ -Stamm bei unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 . Die Stämme wurden auf OD_{600} 0,2 verdünnt und mit 1, 10 und 100 mM H_2O_2 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit Katalase gestoppt und die Zellen bis 10^{-4} verdünnt. Es wurden 2 μ l der Zellen auf BHI-Platten aufgetropft. Diese wurden 24 h bei 30 °C inkubiert.

Somit ist es möglich, AhpCF aktiv in *C. glutamicum* zu exprimieren und die Katalasemutante geringfügig zu schützen. Jedoch bietet die *C. glutamicum* Katalase einen weitaus besseren Schutz bei H_2O_2 -Stress.

3.4.2. Verbesserung der ROS-Resistenz mittels Expression heterologer FBAs in *C. glutamicum*

Anhand der FBA wurde die Schutzfunktion von heterologen Enzymen und den damit einhergehenden veränderten strukturellen Eigenschaften der Tertiärstruktur in *C. glutamicum* getestet. Durch die andere AS-Zusammensetzung und unterschiedlich

exponierten AS an der Oberfläche des Proteins, könnten die sensitiven Bereiche der FBA besser geschützt werden. Aus diesem Grund wurde eine Δ fba mit der homologen als auch drei heterologen FBAs komplementiert. Für die Komplementation wurden neben der *C. glutamicum* FBA (cg), die FBAs aus *Deinococcus radiodurans* (dr), *Streptococcus gordonii* (sg) und *Propionibacterium acnes* (pa) verwendet.

D. radiodurans ist ein extremophiles Bakterium. Es kann bei Strahlendosen von 60 Gy/h wachsen [Makarova *et al.*, 2001]. Ein Teil der Organismen überlebt sogar akute Strahlendosen von bis zu 17500 Gy. Ein Menschen zum Vergleich hat bei einer akuten Bestrahlung ab 6 Gy ohne massive medizinische Intensivversorgung kaum Überlebenschancen [Daly *et al.*, 1997]. Entdeckt wurde *D. radiodurans*, als Fleischkonserven mit ionisierender Strahlung bestrahlt wurden, um Keime abzutöten [Anderson, 1956]. Radioaktive Strahlung bedingt zudem oxidativen Stress. *D. radiodurans* ist dafür bekannt, sehr resistent gegenüber beiden Stressoren zu sein [Daly *et al.*, 2010]. Die FBA aus *D. radiodurans* ist eine FBA Klasse II B. Sie bildet kürzere Sequenzen zwischen den aktiven Zentren, in denen nur bedingt Schleifen (Loops) gebildet werden können.

S. gordonii gehört zu den homofermentativen Milchsäurebakterien. Es bildet unter anderem mit *Streptococcus sanguinis* Biofilme als Zahnbelag. Dieses Bakterium ist in der Lage, sich gegen andere Bakterien wie zum Beispiel *Streptococcus mutans* zu behaupten, indem es H₂O₂ produziert. Hierbei scheint H₂O₂ das eigene Wachstum nicht zu beeinträchtigen [Kreth *et al.*, 2008]. Demnach sollten seine Enzyme ebenfalls gut vor oxidativem Stress geschützt sein.

Als Negativ-Vergleich wurde *P. acnes*, ein vermutlich sensitives, anaerob lebendes Bakterium gewählt. *P. acnes* ist ein Hautbakterium was u.a. für die Bildung von Akne verantwortlich ist [Citron *et al.*, 1991].

Es wurde einen Abgleich der FBA Aminosäuresequenzen der vier Bakterienstämme erstellt. Dieser ist in Abbildung 38 zu finden. Da sie recht unterschiedlich sind, sollten große Unterschiede in ihrer ROS-Resistenz zu erwarten sein.

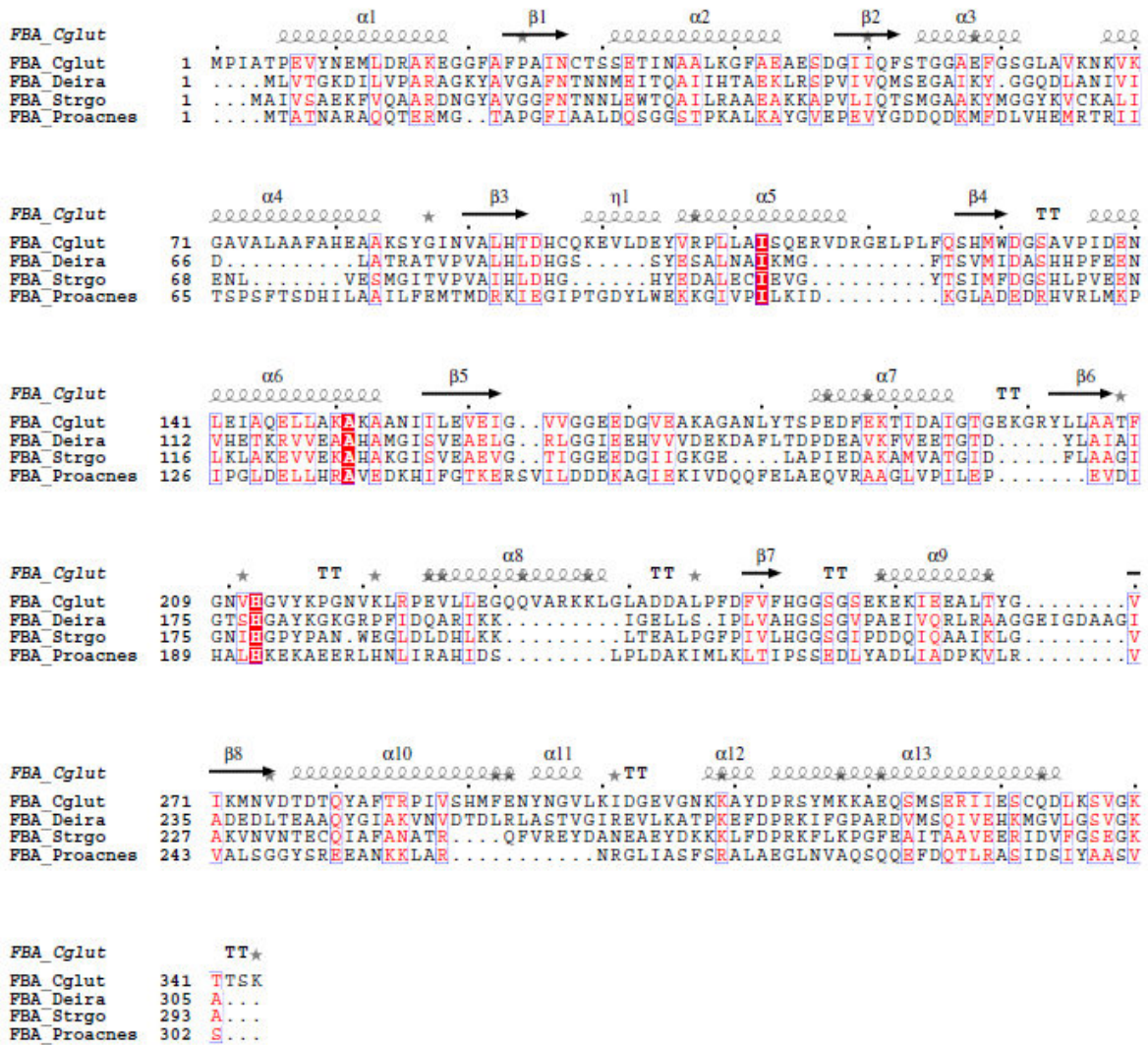


Abbildung 38: Alignment der FBA aus *C. glutamicum*, *D. radiodurans*, *S. gordonii* und *P. acnes*. Für das Alignment wurde das Programm ESPrpt 2.1 verwendet. Rot unterlegte Bereiche zeigen die gleiche AS an dieser Stelle. AS in roten Buchstaben bedeuten, dass sie zu gleichen biochemischen AS-Gruppe gehören. Über dem Alignment befindet sich die FBA Tertiärstruktur der FBA aus *C. glutamicum*

Für diesen Versuch wurde eine FBA defiziente-Mutante (Δfba) aus der AG Wendisch verwendet. Die FBAs wurden in dem Vektor pEKEx2 kloniert und in der Δfba -Mutante überexprimiert. Die Δfba -Mutante kann auf Glukose-haltigem MMI-Medium nicht wachsen. Daher wurden die Komplementationsmutanten auf solch einem Medium angezogen. In Abbildung 39 ist die Komplementation dargestellt (*C. glutamicum* WT_pEKEx2 = schwarz; $\Delta fba_pEKEx2_fba_cg$ = blau; $\Delta fba_pEKEx2_fba_dr$ = rot; $\Delta fba_pEKEx2_fba_sg$ = lila; $\Delta fba_pEKEx2_fba_pa$ = orange).

Die Δfba -Mutante zeigt kein Wachstum, wohingegen die Komplementationsmutanten ein genauso gutes Wachstum zeigen wie der WT. Demnach konnten die FBAs in *C. glutamicum* Δfba -Stamm aktiv exprimiert werden.

Ergebnisse

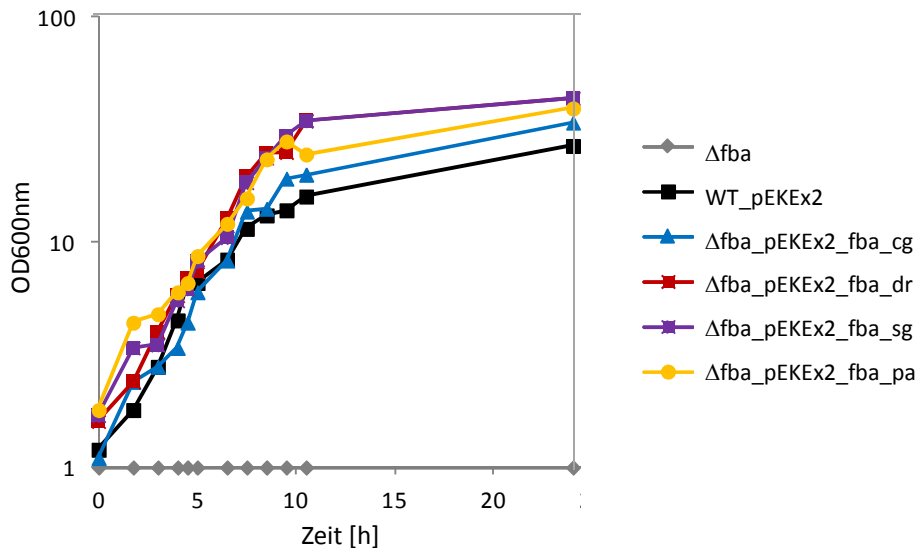


Abbildung 39: Wachstumsversuch der Δfba -Mutante und deren Komplementationsstämme im Vergleich zum WT. Die FBA aus *C. glutamicum* (cg), *D. radiodurans* (dr), *S. gordonii* (sg) und *P. acnes* (pa) wurden in den Vektor pEKEEx2 kloniert und in MMI-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle-Quelle angezogen. Das Wachstum wurde über 24 h beobachtet.

Im nächsten Schritt sollten die Stämme oxidativ gestresst werden. Da alle Stämme eine aktive Katalase besitzen, wird Rose Bengal als Reagenz verwendet. Der Wachstumsversuch wurde wiederholt und die Zellen bei dem Erreichen einer Zelldichte von ca. OD_{600} 7 mit 10 und 20 μM RB versetzt und bei Tageslicht inkubiert. Da der Farbstoff nicht entfernt werden kann, kommt es zu einer ständigen Bildung von $^1\text{O}_2$. Die Stämme wurden 4 h nach dem Stress weiter beobachtet. Anschließend wurden die Zellen für einen Enzymtest geerntet. Als Kontrolle wurden Zellen angezogen, die ungestresst vermessen wurden.

In Abbildung 40 ist das Wachstum von den gestressten Stämmen mit den ungestressten verglichen. Nachdem die Ansätze mit 10 μM RB gestresst worden sind, kommt es bei allen Stämmen zu einem raschen dauerhaften Einbruch des Wachstums.

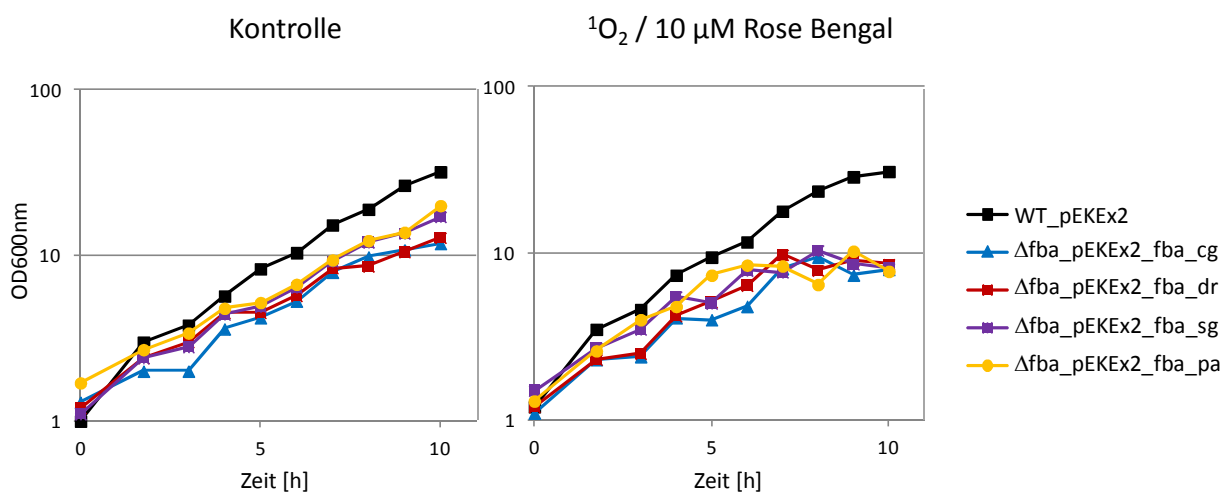


Abbildung 40: Wachstumsversuch der Δfba -Komplementationsstämme im Vergleich zum *C. glutamicum* WT unter Einfluss von $^1\text{O}_2$ gebildet durch Rose Bengal. Die Zellen wurden angezogen und bei Erreichen einer Zelldichte von OD_{600} 7 mit 10 und 20 μM RB gestresst. Das Wachstum wurde weitere 4 h beobachtet. Auf der linken Seite ist die ungestresste Kontrolle zu sehen. Auf der rechten Seite die Stämme, welche mit 10 μM RB gestresst wurden.

Die Zellextrakte der ungestressten und gestressten Stämme wurden einem Enzymtest unterzogen. In Abbildung 41 sind die Aktivitäten der unterschiedlichen FBAs einander gegenübergestellt. Zum besseren Vergleich wurden die FBAs der ungestressten Stämme auf 100 % Aktivität gesetzt (WT FBA 100 % = 2,9 nkatal/mg Zellextrakt; *C. glutamicum* FBA 100 % = 1,7 nkatal/mg Zellextrakt; *D. radiodurans* FBA 100 % = 0,23 nkatal/mg Zellextrakt; *S. gordonii* FBA 100 % = 0,36 nkatal/mg Zellextrakt; *P. acnes* FBA 100 % = 1,34 nkatal/mg Zellextrakt). Die erste Säule beschreibt den ungestressten Zustand (links), die zweite Säule den mit 10 µM RB (mittig) und die dritte Säule mit 20 µM RB gestressten Zustand (rechts). Werden die Stämme mit 10 µM RB gestresst, kommt es bei *C. glutamicum* und *D. radiodurans* überexprimierten FBAs zu keinem Aktivitätsverlust wie bei den anderen. Den stärksten Einbruch zeigt, wie zu erwarten, die FBA aus *P. acnes*. Werden die Stämme mit 20 µM RB gestresst, zeigen alle einen drastischen Verlust der FBA Aktivität. Demnach war es nicht möglich anhand der ausgewählten Enzyme die ROS-Resistenz in *C. glutamicum* zu verbessern, demnach handelt es sich bei den ausgewählten Enzymen um keine ROS resistenteren Enzyme.

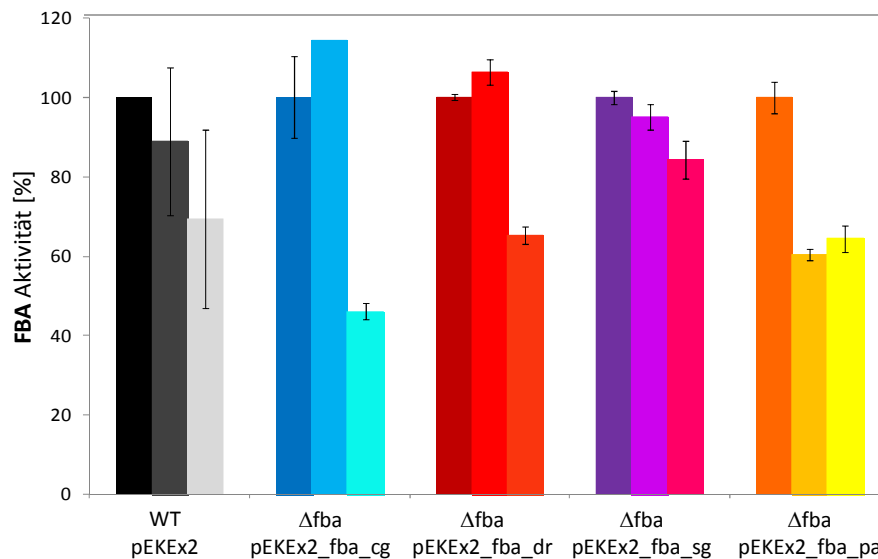


Abbildung 41: FBA Aktivitäten der *C. glutamicum* Δfba-Komplementationsstämme verglichen mit dem *C. glutamicum* WT. Es wurden die ungestressten Stämme (links) und die mit 10 µM RB (mittig) und 20 µM RB (rechts) gestressten Stämme vermessen. Die Aktivität der ungestressten Stämme wurde je zu 100 % gesetzt, damit die FBA Aktivitäten besser mit einander verglichen werden können. WT FBA 100 % = 2,9 nkatal/mg Zellextrakt; *C. glutamicum* FBA (cg) 100 % = 1,7 nkatal/mg Zellextrakt; *D. radiodurans* FBA (dr) 100 % = 0,23 nkatal/mg Zellextrakt; *S. gordonii* FBA (sg) 100 % = 0,36 nkatal/mg Zellextrakt; *P. acnes* FBA (pa) 100 % = 1,34 nkatal/mg Zellextrakt

Zusätzlich wurde der gleiche Versuch mit NaOCl anstatt RB durchgeführt. Die optimale Anwendung für NaOCl liegt bei OD₆₀₀ 8 und 0,005 % NaOCl. In einem Wachstumsversuch zeigten alle gestressten Komplementationsstämme sowie auch der WT einen kurzen Einbruch des Wachstums. Nach spätestens 2 Stunden erholte sich bei allen Stämmen das

Wachstum wieder (Daten nicht gezeigt). Wie im vorherigen Versuch wurden Proben für einen FBA Enzymtest entnommen. Hierbei zeigte sich, dass die FBA kaum einen Verlust in ihrer Aktivität aufwies (Daten nicht gezeigt). Für Wachstumsversuche ist NaOCl nur bedingt brauchbar, da das Reagenz viel flüchtiger ist als RB und der Stress nur kurze Zeit andauert. *C. glutamicum* scheint für einen kurzen $^1\text{O}_2$ -Stress durch NaOCl einen guten Schutzmechanismus zu haben.

3.4.3. Der Einfluss von Mycothiol auf die ROS-Resistenz in *C. glutamicum*

Neben enzymatischen Schutzmechanismen sind auch nicht-enzymatische Schutzmechanismen beschrieben. Dazu gehört u.a. das Antioxidans Mycothiol. ROS reagiert mit den freien Thiolgruppen, welche zu Disulfidbrücken oxidiert werden. An der Biosynthese von Mycothiol sind die vier Enzyme MshA, MshB, MshC und MshD beteiligt. Mutanten, welche die letzten beiden Schritte der Biosynthese nicht mehr besitzen, können Mycothiol nicht mehr bilden [Feng *et. al.*, 2006]. Die *C. glutamicum* ΔmshC - und ΔmshD -Stämme wurden zusammen mit dem WT angezogen. Bei einer OD_{600} 8 wurden die Stämme mit 0,005 % NaOCl gestresst und das Wachstum weiter beobachtet. Nach 2 h erholt sich der WT wieder. Jedoch zeigen die beiden Mutanten nach der Applikation von NaOCl kein Wachstum mehr (siehe Abbildung 42). Im ungestressten Zustand zeigen ΔmshC und ΔmshD ein ähnlich gutes Wachstum wie der WT.

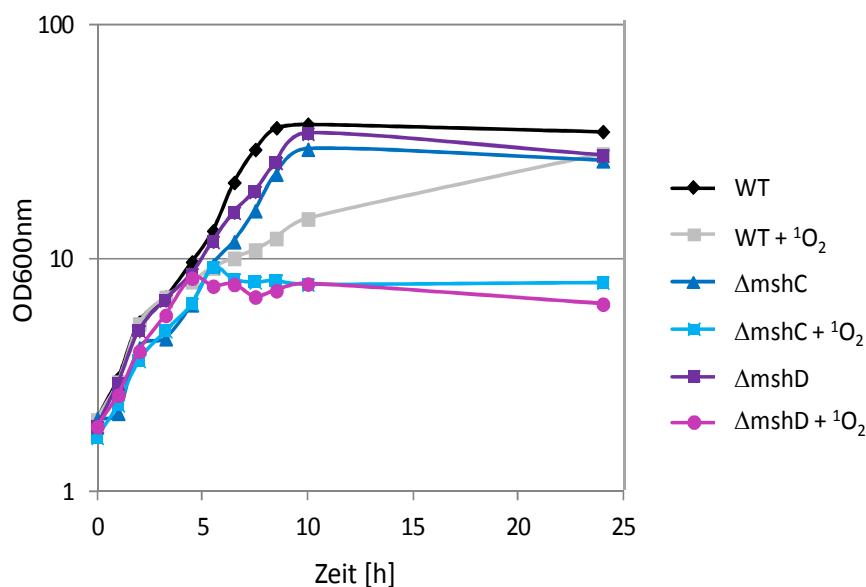


Abbildung 42: Wachstumsversuch *C. glutamicum* WT, ΔmshC - und ΔmshD -Stamm mit und ohne NaOCl. Die Zellen wurden zu einer OD_{600} 8 angezogen und mit 0,005 % NaOCl gestresst. Dargestellt ist das Wachstum gegenüber ungestressten Stämmen.

Werden die Stämme mit Rose Bengal gestresst, kommt es sowohl beim WT als auch bei den Mutanten zu einem Einbruch im Wachstum (Daten nicht gezeigt). Um einen Unterschied zwischen diesen Stämmen auszumachen, scheint RB nicht der richtige Stressor zu sein, da das Reagenz stabiler ist und der Stress somit zu lange anliegt.

Gleichermaßen wurde das Wachstum der Δ mshC- und Δ mshD-Stämme im Zusammenhang mit H_2O_2 getestet. Als Kontrollstämme wurden *C. glutamicum* WT und Δ katA-Mutante verwendet. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} 5 mit 100 mM H_2O_2 gestresst. Abbildung 43 zeigt, dass H_2O_2 nur einen leichten Einfluss auf das Wachstum von Mycothiol-defizienten Stämmen hat.

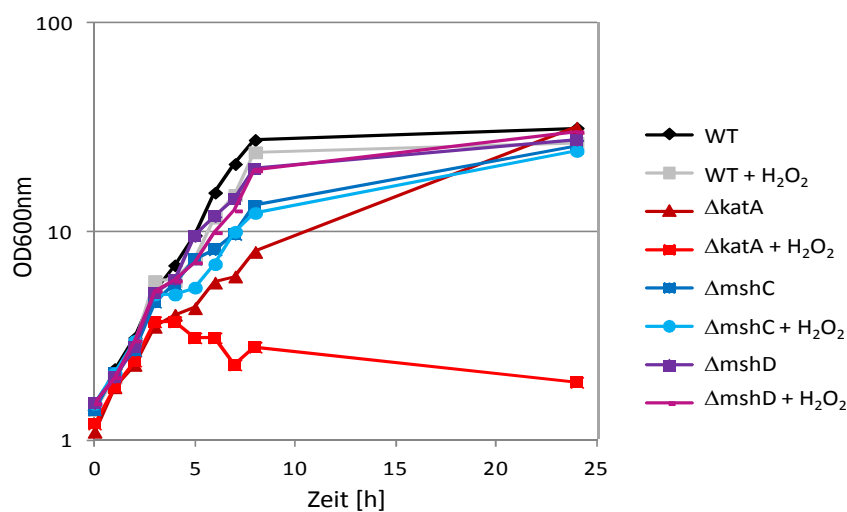


Abbildung 43: Wachstumsversuch von *C. glutamicum* WT, Δ katA-Mutante, Δ mshC- und Δ mshD-Stamm mit und ohne H_2O_2 . Die Zellen wurden zu einer OD_{600} 5 angezogen und mit 100 mM H_2O_2 gestresst. Dargestellt ist das Wachstum gegenüber ungestressten Stämmen.

Nach der Applikation von H_2O_2 kommt es zu einem leichten Einbruch des Wachstums in den Mycothiol-defizienten Mutanten, von dem sich die Zellen schnell erholen. Die Katalasemutante zeigt kein Wachstum mehr. Die Stämme werden u.a. durch die aktive Katalase geschützt. Demnach könnte Mycothiol in erster Linie ein Schutzmechanismus gegenüber 1O_2 -Stress, gebildet durch NaOCl.

3.4.4. Einfluss proteinfreier Zellextrakte auf die Enzymaktivität

Um den Einfluss nicht-enzymatischer Schutzmechanismen wie u.a. Mycothiol zu untersuchen, wurde proteinfreier Zellextrakt von *C. glutamicum*, *E. coli*, *D. radiodurans* und der Mycothiol-defizienten Stämme erstellt. In *D. radiodurans* konnte gezeigt werden, dass niedermolekulare Substanzen im proteinfreien Zellextrakt einen Schutz der Proteine bieten [Daly *et al.*, 2010]. Die Notwendigkeit anaerober Bedingungen wurde deutlich, da der

Zellextrakt nach Aufschluss trotz des Vorhandenseins von reduzierenden Reagenzien rasch oxidierte. Für diesen Versuch wurden die Enzyme GAPDH und ICDH ebenfalls im anaeroben Zelt gereinigt. Die Zellextrakte wurden aufgekocht, um die Proteine zu inaktivieren und zentrifugiert, um diese aus dem Überstand zu entfernen. Es wurden sowohl Enzymtest als auch Oxyblots durchgeführt. Für die Tests wurden, 0,02 µg/µl Protein in ca. 200 µl 1-2 µg/µl Zellextrakt eingesetzt und die Aktivität ungestresst und mit 0,025 % NaOCl 10 min gestresst vermessen. In Abbildung 44 sind die Aktivitäten der GAPDH dargestellt. Die Aktivitäten der ungestressten GAPDH in den einzelnen Zellextrakten wurde auf 100 % gesetzt (100 % Kontrolle = 13,5 nkatal/mg Protein, 100 % *C. glutamicum* = 18 nkatal/mg Protein, 100 % *E. coli* = 18 nkatal/mg Protein, 100 % *D. radiodurans* = 11 nkatal/mg Protein, 100 % ΔmshD = 16 nkatal/mg Protein). Der einzige Zellextrakt, der einen Schutz auf die GAPDH Aktivität zeigt, ist der aus *D. radiodurans*. Der Zellextrakt aus dem ΔmshD-Stamm verhält sich ähnlich wie der des Wildtyps.

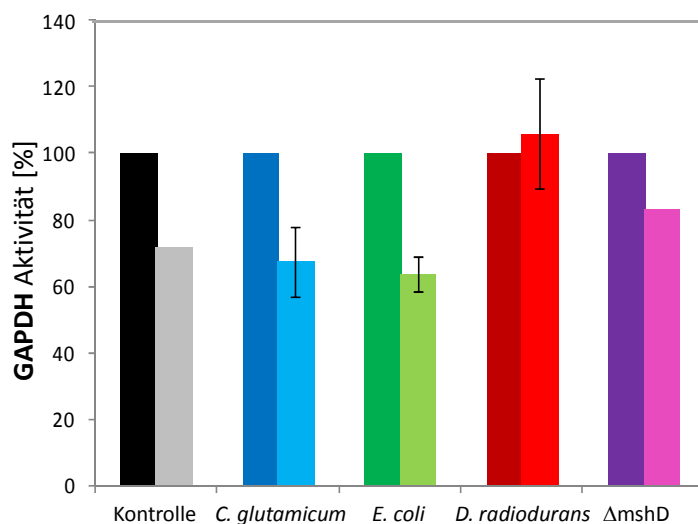


Abbildung 44: GAPDH Enzymtest in Zellextrakten von *C. glutamicum*, *E. coli*, *D. radiodurans* und ΔmshD-Mutante. Die Enzymaktivität wurde ungestresst und mit 0,025 % NaOCl gestresst vermessen. Als Kontrolle diente ein Ansatz im dem statt Zellextrakt Tris-Puffer verwendet wurde. Die Aktivitäten der GAPDH in den einzelnen Zellextrakten wurde auf 100 % gesetzt (100 % Kontrolle = 13,5 nkatal/mg Protein, 100 % *C. glutamicum* = 18 nkatal/mg Protein, 100 % *E. coli* = 18 nkatal/mg Protein, 100 % *D. radiodurans* = 11 nkatal/mg Protein, 100 % ΔmshD-Mutante = 16 nkatal/mg Protein)

Zur besseren Visualisierung der Schädigung der GAPDH wurde auf gleiche Weise ein Oxyblot erstellt. Um die GAPDH auf dem Blot besser zu detektieren, wurde nach dem Digitalisieren des Oxyblots auf die gleiche Membran ein Westernblot durchgeführt. In Abbildung 45 sind Oxyblot (links) und Westernblot (rechts) dargestellt. Es konnten Banden bei ca. 37 kDa detektiert werden. Dies entspricht der Molekularenmasse der GAPDH.

Ergebnisse

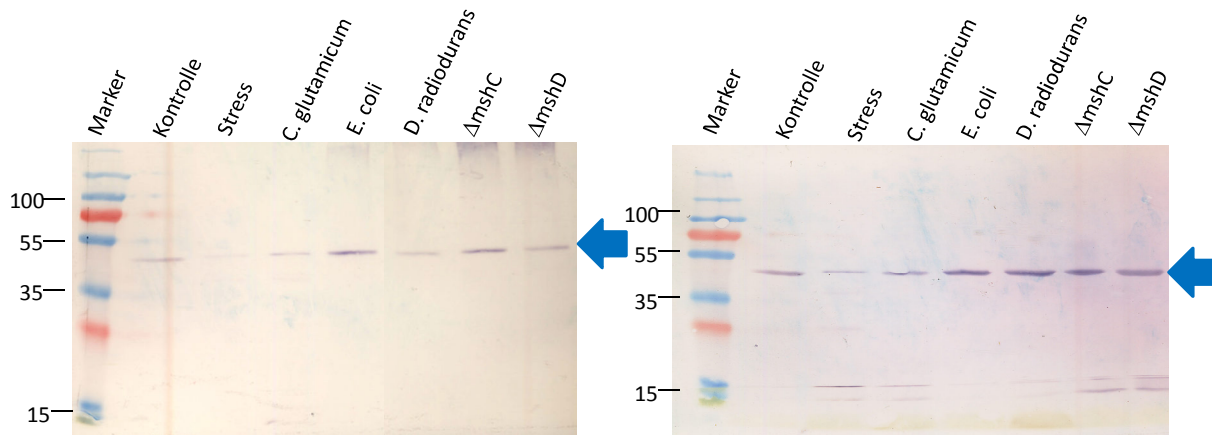


Abbildung 45: Oxyblot (links) und Westernblot (rechts) der GAPDH. Die GAPDH wurde in Zellextrakten von *C. glutamicum*, *E. coli*, *D. radiodurans* sowie Δ mshC-Mutante und Δ mshD-Mutante gestresst. Als Kontrolle diente eine ungestresste Probe und eine Probe gestresst in Tris-Puffer an stell von Zellextrakt. Nachdem der Oxyblot digitalisiert wurde, wurde die Membran für einen Westernblot verwendet.

Die Banden im Oxyblot bei Kontrolle, Stress, *C. glutamicum* Zellextrakt, *D. radiodurans* Zellextrakt und Δ mshD-Mutante sind viel schwächer, als die von *E. coli* und der Δ mshC-Mutante. Das schwächere Signal würde weniger Carbonylierung bedeuten. Betrachtet man jedoch den Westernblot, ist es auffällig, dass die Bande beim Stress ebenfalls geringer ist, als bei den restlichen Proben. Dies spricht dafür, dass es zu einer Degradation des Proteins gekommen ist. Ein Indiz dafür sind die Banden, welche sich bei ca. 15 kDa im Westernblot gebildet haben. Demnach kommt es in *E. coli* Zellextrakt zu einer starken Carbonylierung der GAPDH, aber nicht zu einer Degradation. Bei Stress ohne Zellextrakt, *C. glutamicum* Zellextrakt und den Zellextrakten der Mutanten kommt es zu einer geringeren Carbonylierung, aber zu einer höheren Degradation des Proteins. Wie schon bereits im Enzymtest ermittelt, zeigt die GAPDH im *D. radiodurans* Zellextrakte die geringsten Carbonylierungen und die wenigsten Banden in der Degradation. Die Reproduktion dieser Versuche unterliegt einer erhöhten Variabilität, da NaOCl sehr flüchtig ist.

Derselbe Versuch wurde mit der ICDH durchgeführt. Für die Tests wurden 0,002 μ g/ μ l Protein in ca. 200 μ l 1-2 μ g/ μ l Zellextrakt eingesetzt und die Aktivität ungestresst und mit 0,025 % NaOCl 10 min gestresst vermessen. In Abbildung 46 sind die Aktivitäten der ICDH dargestellt. Die Aktivitäten der ungestressten ICDH in den einzelnen Zellextrakten wurde auf 100 % gesetzt (100 % Kontrolle = 95 nkatal/mg Protein, 100 % *C. glutamicum* = 168 nkatal/mg Protein, 100 % *E. coli* = 40 nkatal/mg Protein, 100 % *D. radiodurans* = 151 nkatal/mg Protein, 100 % Δ mshD-Mutante = 125 nkatal/mg Protein). Im Gegensatz zum Versuchsansatz der GAPDH zeigt, neben dem *D. radiodurans* Zellextrakt, der *C. glutamicum*

Zellextrakt und der Zellextrakt der Δ mshD-Mutante eine schützende Funktion bei der ICDH. Keinen Schutz hingegen bietet der Zellextrakt von *E. coli*.

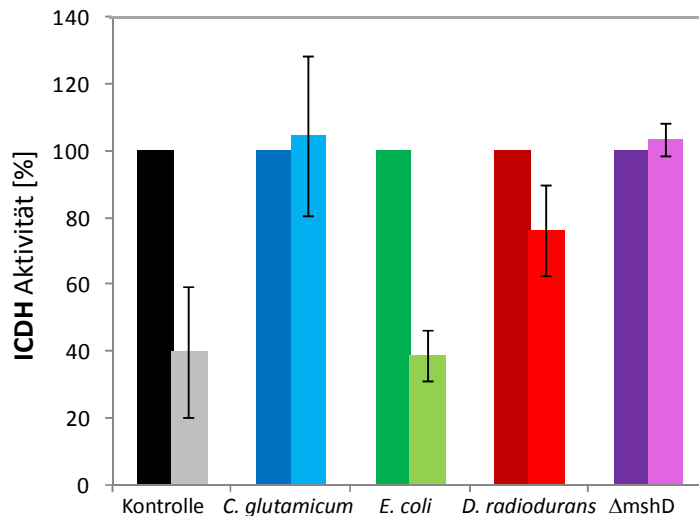


Abbildung 46: ICDH Enzymtest in Zellextrakten von *C. glutamicum*, *E. coli*, *D. radiodurans* und Δ mshD-Mutante. Die Enzymaktivität wurde ungestresst und mit 0,025 % NaOCl gestresst gemessen. Als Kontrolle diente ein Ansatz im dem statt Zellextrakt Tris-Puffer verwendet wurde. Die Aktivitäten der ICDH in den einzelnen Zellextrakten wurde auf 100 % gesetzt (100 % Kontrolle = 95 nkatal/mg Protein, 100 % *C. glutamicum* = 168 nkatal/mg Protein, 100 % *E. coli* = 40 nkatal/mg Protein, 100 % *D. radiodurans* = 151 nkatal/mg Protein, 100 % Δ mshD-Mutante = 125 nkatal/mg Protein)

Von der ICDH wurden ebenfalls zur besseren Visualisierung der Schädigung ein Oxyblot und anschließend ein Westernblot durchgeführt. In Abbildung 47 sind Oxyblot (links) und Westernblot (rechts) der ICDH dargestellt. Es konnten Banden bei ca. 80 kDa detektiert werden. Dies entspricht dem Molekulargewicht der ICDH.

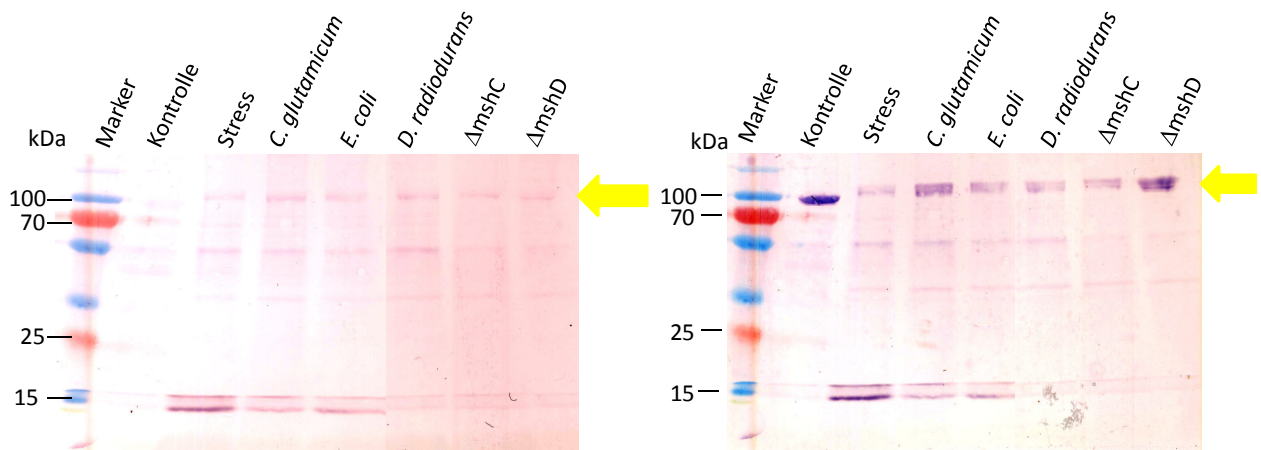


Abbildung 47: Oxyblot (links) und Westernblot (rechts) der ICDH. Die ICDH wurde in Zellextrakten von *C. glutamicum*, *E. coli*, *D. radiodurans* sowie Δ mshC-Mutante und Δ mshD-Mutante gestresst. Als Kontrolle dienen eine ungestresste Probe und eine Probe gestresst in Tris-Puffer an Stelle von Zellextrakt. Nachdem der Oxyblot digitalisiert wurde, wurde die selber Membran für einen Westernblot verwendet.

Anhand des Oxyblots ist in Höhe der ICDH zu erkennen, dass die ungestresste Kontrolle nicht carbonyliert ist. Alle anderen Banden zeigen eine ungefähr gleich starke Carbonylierung. Es ist jedoch auffällig, dass bei ca. 65, 35 und 15 kDa Banden detektiert wurden. Dies würde für eine Degradation des Enzyms sprechen. Im Gegensatz zum Enzymtest, zeigt die ICDH im

C. glutamicum Zellextrakt ein hohes Maß an Proteindegradation. Der Abbau der ICDH ist bei *D. radiodurans* und Δ mshC-Mutante und Δ mshD-Mutante Zellextrakt viel geringer. Im Westernblot wird jedoch deutlich, dass die stärksten Banden bei der ungestressten Kontrolle, *C. glutamicum* und Δ mshD-Mutante Zellextrakt zu finden sind. Demnach ist hier noch sehr viel Protein übrig, wohingegen bei der gestressten Kontrolle, *E. coli*, *D. radiodurans* und Δ mshC-Mutante Zellextrakten die Proteinbande viel schwächer ist. Wenn man die Ergebnisse der beiden Blots zusammenfasst, zeigen auch hier *C. glutamicum* und *D. radiodurans* Zellextrakte einen guten ROS-Schutz. Der Einfluss von Mycothiol konnte nicht gezeigt werden. Daher muss es noch weitere Komponenten im Zellextrakt geben, die die Enzyme schützen.

3.4.5. Einfluss von Methionin auf die Enzymaktivität unter ROS-Stress

Eine weitere schützende Komponente im proteinfreien Zellextrakt sind freie Aminosäuren [Daly *et al.*, 2010]. *C. glutamicum* kann eine hohe interne AS-Konzentration erreichen. Methionin ist eine der Aminosäuren, die sehr anfällig für ROS ist. Da Methionin ROS abfängt, macht es sie dadurch unschädlich. Enzyme besitzen sogenannte „Opfer-Methionine“, die bei oxidativen Stress anstelle von anderen AS mit ROS reagieren sollen [Levine *et al.*, 1996].

Um den Schutz durch Methionin zu testen, wurde gereinigte ICDH mit 10 mM Methionin inkubiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 gestresst. In Abbildung 48 ist der Enzymtest gezeigt.

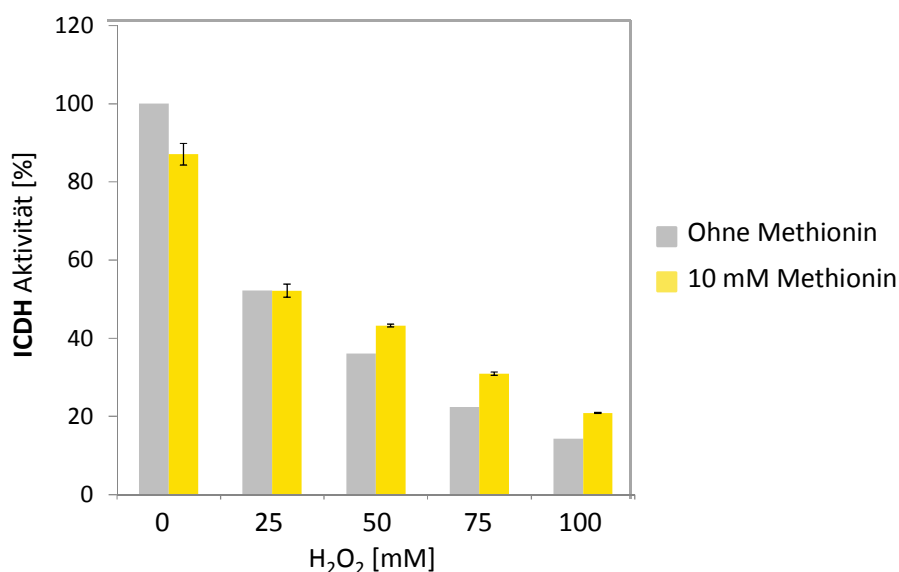


Abbildung 48: ICDH Enzymaktivität ohne und mit 10 mM Methionin bei unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 . Die ICDH Aktivitäten wurden von den ungestressten Proben ohne Methionin auf 100 % gesetzt. (100 % Aktivität kein H_2O_2 = 650 nkatal/mg Protein).

Die Aktivität der gestressten Ansätze ohne Methionin wurde immer auf 100 % Aktivität gesetzt um die Unterschiede besser sichtbar zu machen (100 % ICDH Aktivität kein H₂O₂ = 650 nkatal/mg Protein). Je höher der H₂O₂-Stress ist, desto besser beschützt Methionin die Aktivität der ICDH.

In Proteomanalysen zeigt die ICDH im gestressten Ansatz mit und ohne Methionin gleich viele Modifikationen (Daten nicht gezeigt). Die Qualität der MS-Läufe war allerdings nicht sehr gut, so dass diese Messungen nur eingeschränkt aussagekräftig sind.

Es wurden zudem im *C. glutamicum* WT interne Methionin-Messungen mittels HPLC durchgeführt, nachdem die Zellen mit NaOCl gestresst wurden (Daten nicht gezeigt). Der interne Anstieg der Methionin-Konzentration war nur sehr gering, so dass davon auszugehen ist, dass unter *in vivo* Bedingungen die Akkumulation von Methionin nicht die Hauptkomponente beim Schutz gegen ROS im proteinfreien Zellextrakt darstellt.

4. Diskussion

4.1. Einfluss von oxidativem Stress auf *Corynebacterium glutamicum* Zellkomponenten

Als aerob lebender Organismus wird *Corynebacterium glutamicum* in seiner natürlichen Umgebung als auch in der biotechnologischen Anwendung mit reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS) konfrontiert. ROS können Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen verursachen, die bis zum Zelltod führen können. Über das Ausmaß der oxidativen Schäden in *C. glutamicum* war bisher nichts bekannt. Mittels Applikation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet durch Rose Bengal und Natriumhydroxid und der Anwendungen von Bioreaktoren mit definierbarer O_2 -Zufuhr, war es möglich einen guten Einblick in die oxidative Schädigung in *C. glutamicum* zu erhalten.

4.1.1. *C. glutamicum* ist sensitiv für Singulett-Sauerstoff

Der ROS-Einfluss wurde an lebenden *C. glutamicum* Zellen untersucht. Als Stressoren wurden Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet durch Rose Bengal und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* WT sehr resistent gegenüber H_2O_2 -Stress ist, aber sensitiver gegenüber $^1\text{O}_2$. Schon 10 μM RB reichten, damit das Wachstum in *C. glutamicum* zum Erliegen kam. Auf der anderen Seite konnte *C. glutamicum* einen kurzfristigen Schock mit 1 M H_2O_2 aushalten. Nach der H_2O_2 -Applikation kam es unverzüglich zu der Freisetzung von O_2 und nach einem kurzen Wachstumseinbruch können die Zellen weiter wachsen. Wurde *C. glutamicum* jedoch für einen längeren Zeitraum von ca. 1 h 1 M H_2O_2 ausgesetzt, stellte *C. glutamicum* das Wachstum ein (siehe Abbildung 6). *E. coli* zum Vergleich stirbt bereits bei einer mikromolaren Konzentration H_2O_2 [Imlay, 2008]. Der bessere Schutz von *C. glutamicum* gegenüber H_2O_2 liegt an dem Vorhanden sein von viel Katalase.

Sowohl in Tropftestanalysen mit Rose Bengal (RB) haltigen BHI-Platten (siehe Abbildung 10) als auch in Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass der WT weitaus sensitiver für RB-Stress ist und dieser viele modifizierte Peptide zu Folge hat (siehe Abbildung 30). Dass *C. glutamicum* sehr anfällig für $^1\text{O}_2$ ist, könnte in seiner Entstehung als photooxidativer Stress begründet sein. *C. glutamicum* als Bodenbakterium kommt nur selten mit Licht in Kontakt und besitzt keine Photosysteme, welche die Entstehung von $^1\text{O}_2$ begünstigen. Im Gegensatz zu Pflanzen und Cyanobakterien herrschte hier kein evolutiver Druck, Schutzmechanismen

für $^1\text{O}_2$ -Stress zu optimieren. Im Lebensraum Boden besteht jedoch eine größere Wahrscheinlichkeit, einer höheren Metallionenkonzentration ausgesetzt zu sein. Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer Fenton-Reaktion, bei der Fe^{2+} mit H_2O_2 reagiert und das reaktive Hydroxylradikal bildet, sehr hoch. Daher ist es wichtig für die Zelle H_2O_2 schnellst möglich abzubauen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Katalase-defiziente Mutante (ΔkatA) in *C. glutamicum* sehr sensitiv für H_2O_2 ist.

4.1.2. Zusammenhang oxidativer Stress und externer pH-Wert - Eisen(II) und Mangan(II) haben einen starken pH-abhängigen Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum*

Es gibt Situationen, in denen die Katalase in *C. glutamicum* kaum bis gar nicht aktiv ist. Starke pH-Schwankungen und Eisenmangel können zu Aktivitätseinbußen der Katalase führen. In diesem Zusammenhang wurde eine Verknüpfung von extremen pH-Werten und oxidativem Stress genauer untersucht [Follmann *et al.*, 2009]. *C. glutamicum* kann eine effektive pH-Homöostase bei einem externen pH-Wert von 6 – 9 betreiben. Bei der Anzucht von *C. glutamicum* in Minimalmedium konnten bei pH 6 große Mengen H_2O_2 detektiert werden (6,5 μM), unter neutralen Bedingungen 2,2 μM H_2O_2 und bei pH 9 wurden nur noch 0,9 μM H_2O_2 detektiert. Durch die Kombination von Proteom- und Transkriptom-Analysen konnte gezeigt werden, dass Eisen-abhängige Enzyme wie Succinat-Dehydrogenase, Aconitase oder Katalase bei pH 6 reprimiert werden [Follmann *et al.*, 2009]. Diese essentielle Bedeutung von Eisen ist ebenfalls in Abbildung 9a (WT pH 6 ohne Eisen (rot)) zu beobachten. Der *C. glutamicum* WT zeigt ein schlechteres Wachstum unter Eisenmangel, wohingegen dieser Effekt bei der Katalasemutante nicht zu sehen ist. Diese zeigt jedoch generell ein schlechteres Wachstum bei pH 6.

Die gleichen Gene, welche bei pH 6 reprimiert werden, werden bei einem alkalischen pH stark induziert [Follmann *et al.*, 2009]. Dies ist wiederum ein Hinweis dafür, dass bei einem pH 9 die Eisenverfügbarkeit erhöht ist. Es ist ein negativer Einfluss auf das Wachstum von Mangan zu beobachten. Wachstumsversuche von WT und Mutante, in denen kein Mangan verfügbar war, zeigten bei pH 9 ein besseres Wachstum (siehe Abbildung 9e und f). Dieser Effekt ist ungewöhnlich, da beschrieben ist, dass Mangan bei oxidativem Stress die Zelle schützt [Daly *et al.*, 2007]. Zudem gibt es Befunde, dass *C. glutamicum* bei alkalischem pH Mangan in der Zelle akkumulieren [Marin, persönliche Mitteilung]. Diese Akkumulation von

Mn²⁺ könnte generell toxisch für die Zelle sein, da sowohl *C. glutamicum* WT als auch Δ katA-Mutante bei pH 9 ohne Mn²⁺ besser wachsen. Es könnte möglich sein, dass der Überschuss an bivalenten Kationen in der Zelle die Fenton-Reaktion begünstigt.

4.1.3. *C. glutamicum* bietet einen ausreichenden Schutz der DNA

Untersuchungen an Lachssperma DNA und gereinigter genomischer DNA aus *C. glutamicum* zeigen, dass H₂O₂ in Kombination mit Fe²⁺ und ¹O₂ gebildet durch Rose Bengal zu Doppel- und Einzelstrangbrüchen (*Double Strand Breaks* - DSB und *Single Strand Breaks* - SSB) in der DNA führt (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12). Betrachtet man jedoch die genomische DNA aus *in vivo* gestressten Zellen, weist die DNA keine Strangbrüche auf (siehe Abbildung 13). Demnach ist die DNA in *C. glutamicum* gut geschützt. Zudem könnte *C. glutamicum* sehr gut funktionierende DNA-Reparaturmechanismen besitzen. In *E. coli* können DNA-Einzelstrangbereiche mittels RecA detektiert werden. Sobald RecA beschädigte DNA gefunden hat, spaltet es den Repressor LexA, der seinerseits die Gene für die DNA Reparatur freigibt [Craig *et al.*, 1981; Little, 1994]. Dieser Mechanismus ist hoch konserviert und kommt u.a. auch in *C. glutamicum* vor. Desweiteren wird bei H₂O₂-Stress durch OxyR Dps (Eisenbinde Protein) aktiviert, welches ebenfalls bei der Stabilisierung von SSB eine wichtige Rolle spielt [Zheng *et al.*, 2008]. In *C. diphtheriae* und *C. glutamicum* ist der Eisen-abhängige Transkriptionsfaktor DtxR als Aktivator für Dps beschrieben worden. DtxR wiederum wird in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit und durch oxidativen Stress aktiviert [Yellaboina *et al.*, 2004; Wennerhold und Bott, 2006]. Die Struktur von Dps ist dem des Ferritin sehr ähnlich, so dass die Möglichkeit besteht, dass durch die Bindung von freiem Eisen, Dps die DNA zusätzlich schützt [Grant *et al.*, 1998].

4.1.4. Singulett-Sauerstoff reagiert mit Fettsäuren der Membranlipide

Werden *C. glutamicum* Zellen mit ROS gestresst, kommt es zu einer messbaren Autolumineszenz. Dieses Phänomen ist durch die endogene Entstehung von angeregten Zuständen durch oxidative Reaktionen bedingt. Hauptsächlich werden während der Lipidperoxidation lichtemittierende Moleküle, wie Triplett Carbonyle und Singulett-Sauerstoff generiert, welche zur Autolumineszenz führen. Insbesondere in der Detektion von oxidativem Stress in Pflanzen ist dieses Phänomen von großer Bedeutung [Havaux *et al.*,

2006]. Bisher ist noch unklar, welche Komponenten von *C. glutamicum* zur Autolumineszenz führen, da nur mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids* – PUFAs) Lipidperoxidation bedingen [Helliwell, 2006]. *C. glutamicum* besitzt in der Zellmembran Lipide nur mit 18:1 und 16:0 Fettsäureketten [Brennan und Lehane, 1971]. Demnach kann hier keine Lipidperoxidation stattfinden. Je nach Wachstumsbedingungen können jedoch die Mycolsäuren, welche sich in der äußeren Membran befinden, 32:0, 32:1 und 32:2 Fettsäureschwänzen ausbilden [Collins *et al.*, 1982]. Bei sog. Lepra-Derivaten von Corynebakterien sind auch 32:4 Fettsäuren beschrieben worden [Gailly *et al.*, 1982]. Die Autolumineszenz kann möglicherweise auch von Membranproteinen herrühren, die ebenfalls mit H₂O₂ reagieren [Møller, 2007].

Um den Einfluss des oxidativen Stresses auf die Lipide der Membran zu untersuchen, wurde die Fettsäurezusammensetzung von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm bei H₂O₂- und ¹O₂-Stress gebildet durch RB analysiert. Diese Analyse wurde mittels der Bildung von Fettsäuremethylestern durchgeführt. Dabei war auffällig, dass H₂O₂ zu keiner Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung führte, wohingegen bei ¹O₂-Stress auch mehrere kurzkettige Fettsäuren detektiert werden konnten (siehe Abbildung 14). Singulett-Sauerstoff ist eines der Hauptreagenzien der Lipidperoxidation. [Halliwell, 2006]. Auch einfach ungesättigte Fettsäuren können zu Hydroperoxiden oxidiert werden [Frankel, 1980]. Zudem konnte die Bildung von Malondialdehyd nachgewiesen werden, welches ein Hauptabbauprodukt der Lipidperoxidation ist [Koch-Koerfges, unveröffentlicht].

4.1.5. *C. glutamicum* Proteine sind sensitiv für schwankende Sauerstoffkonzentrationen in der Fermentation

Carbonylierungen sind neben den Modifizierungen von schwefelhaltigen Aminosäuren (AS) die am häufigsten auftretenden Proteinmodifikationen. Die Oxidation von Arginin, Histidin, Lysin, Prolin, Threonin, und Tryptophan, welche in erster Linie durch ¹O₂ und OH• erzeugt wird, generiert freie Carbonylgruppen, die mittels Dinitrophenolhydrazin (DNPH) detektiert werden können [Levine *et al.*, 1994; Davies, 2004, Xu und Chance, 2005].

In Oxyblot Analysen konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* Δ katA-Stamm-Zellextrakt mehr Carbonylierungen aufweist als der von *C. glutamicum* WT, da immer noch viel Katalase vorhanden ist (siehe Abbildung 15). In Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit und des H₂O₂-Stresses konnte für den Δ katA-Stamm gezeigt werden, dass die Proteine in Zellextrakten bei

gleichzeitiger Anwesenheit von Eisen und H_2O_2 sehr stark carbonyliert wurden. War jedoch nur Fe^{2+} oder H_2O_2 gegenwärtig, schien dies die Proteine kaum zu schädigen (siehe Abbildung 16). Es gibt die These, dass metallkatalysierte Oxidationen die einzigen Quellen für Carbonylierungen in Bakterien sind [Maisonneuve *et al.*, 2009]. Die Konzentration freier Metallionen wird in der Zelle jedoch bewusst niedrig gehalten. Sobald ein bakterieller Chelator ein zweifach positiv geladenes Metallion außerhalb der Zelle gebunden hat, wird es innerhalb der Zelle an ein Metallionen-bindendes Enzym assoziiert und bleibt so lange gebunden, bis das Metallion seinen Bestimmungsort in der Zelle erreicht hat [Lyons und Edie, 2007].

Als aminosäurebildendes Bakterium wird *C. glutamicum* großtechnisch in der Aminosäure-Produktion eingesetzt. In der Fermentation kann es zu Schwankungen in der Sauerstoffzufuhr kommen. In Abbildung 17a zeigte der WT zu Beginn des Versuchs leichte Carbonylierungen bei 20 % Sauerstoffzufuhr (Luft). Bei 0, 15 und 30 % O_2 in der Zuluft wurde die Carbonylierung deutlich schwächer, bis jedoch bei 45 % O_2 -Anteil in der Zuluft die Carbonylierung stark anstieg. Der *C. glutamicum* ΔkatA -Stamm hingegen zeigte zu Beginn leichte Carbonylierungen, die nach dem Ausschalten von O_2 immer stärker wurden (Abbildung 17b). Dies könnte an einer fehlerhaften Übertragung der Elektronen in der Atmungskette liegen, die im anaeroben Zustand verstärkt auftreten könnte. Es konnte gezeigt werden, dass eine schwankende Sauerstoffzufuhr zu ROS bedingten Carbonylierungen in *C. glutamicum* führen kann. Ähnliche Experimente wurden von Lu und Mitarbeitern (2003) mit *E. coli* durchgeführt. Die Gene *sodA*, *soxS*, *fumC*, *zwf*, *acnA* und *acrAB* wurden an GFP gekoppelt und die Expression beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass bei dem Einleiten von 100 % O_2 für 30 min in einer Fermentation die Gene *sodA*, *soxS*, *fumC*, und *zwf* stärker exprimiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass es in *E. coli* während der exponentiellen Phase bei einer normalen aeroben Fermentation zu einer erhöhten Expression von *sodA*, *acnA*, *zwf* und *acrAB* kommt. In der stationären Wachstumsphase wird die Expression dieser Gene unterdrückt [Lu *et al.*, 2003]. Da die Produktionsrate von O_2^- linear zu der Anzahl aktiver Atmungsketten ist, welche ihre maximale Zahl in der exponentiellen Phase erreicht, kann es auch in einer normalen Fermentation ohne O_2 -Schwankungen zur Bildung von ROS kommen [Gonzalez-Flecha und Demle, 1995]. Aus diesem Grund könnte eine SOD-Mutation in *C. glutamicum* letal sein, da es nicht mehr zu der Detoxifikation von Superoxid kommen könnte.

4.2. Massenspektrometrische Analysen

4.2.1. Die Schwierigkeit der qualitativen und quantitativen Proteomik und deren Nutzen

Der Oxyblot ist nur ein bedingtes Werkzeug zur Identifizierung von oxidativen Modifikationen. Da vornehmlich nur Carbonylierungen nachgewiesen werden, werden andere Produkte der AS-Oxidation wie Aspartat Semialdehyd, Kynurenin oder die Bildung von Disulfidbrücken nicht detektiert [Møller *et al.*, 2011]. Zudem kann nur das gesamte Zellextrakt bzw. gereinigtes Enzym betrachtet werden. Zudem ist die genaue Lokalisierung der Carbonylierungen in einzelnen Proteinen nicht möglich ist.

Eine weitere Technik zur Untersuchungen der posttranslationale Modifikation (PTM) ist die Proteomanalyse zur Identifizierung und Quantifizierung carbonylierter Proteine. Die derzeit gängige Methode ist die auf 2D-Gel-Elektrophorese (2DGE) basierende Proteomik. Der Vorteil ist, dass man in der 2DGE Carbonyl-spezifische Proben nicht nur isolieren und carbonylierte Proteine identifizieren, sondern auch das Ausmaß der Carbonylierung jedes Proteins in Beziehung zu seiner Gesamtmenge quantifizieren kann [Møller *et al.*, 2011]. Die Proben können neben DNPH auch mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. BODIPY (Boron-dipyrromethene) oder Hydroxylamin identifiziert werden [Schmitt *et al.*, 2009; Poon *et al.*, 2007]. Nachteilig könnte hier sein, dass die auf das Gel aufgetragenen Proben selbst oxidiert werden können, da Ammoniumperoxodisulfat (APS) im SDS-Gel als Radikalstarter fungiert. Insbesondere die 2DEG-abhängige Tryptophan-Oxidation kommt häufig vor [Perdivara *et al.*, 2010]. Um diese Artefaktbildung zu verhindern, werden Schutzgruppen eingesetzt, welche die Oxidationen an anderen, nicht modifizierten AS verhindern. Beispielsweise ist als Schutzgruppe für Cystein Iodoacetamid beschrieben worden [Smythe, 1936]. Es ist jedoch sehr aufwendig, für jede AS eine Schutzgruppe zu verwenden, um die Bildung von artifiziellen PTMs zu verhindern.

Inzwischen besteht auch die Möglichkeit, den Gel-basierenden Ansatz zu umgehen und die Proben direkt in der Massenspektrometrie zu analysieren. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit angewendet. Der Vorteil ist, dass das gesamte Proteom auf einmal analysiert werden kann und nicht nur einzelne Proben der 2D-Gele. Der typische MS-Daten-Suchalgorithmus von Analytikprogrammen kann anhand eines ausgewählten Sets an Modifikationen diese identifizieren. Die Suchzeit ist umso höher je mehr Modifikationen gleichzeitig gesucht werden sollen [Madian und Regnier, 2010]. Der Suchalgorithmus kann nur nach bekannten Modifikationen suchen, da die Massendifferenz zwischen nicht modifizierten und

modifizieren Resten dem Programm bekannt sein muss. Neue Modifikationen, d.h. dem Programm nicht bekannte Modifikationen, können nur über händige Auswertungen identifiziert werden [Møller *et al.*, 2011]. Ein Nachteil ist, dass oxidierte Arginin- und Lysin-Reste durch die tryptische Proteolyse für die MS-Messung nicht mehr zugänglich sind [Mirzaei und Regnier, 2006]. Es gibt dazu die Möglichkeit, semi-tryptisch verdaute und nicht-tryptisch verdaute Peptide zu identifizieren, was jedoch sehr zeitaufwendig ist, da dies einen neuen Suchalgorithmus erfordert. Auch benötigt die Identifizierung oxidativer Protein-Protein-Verknüpfungen einen weiteren, ebenfalls sehr zeitintensiven Algorithmus. Neben der Identifizierung von Modifikationen ermöglicht diese Methode anschließend auch eine direkte Quantifizierung der modifizierten Peptide [Møller *et al.*, 2011]. Die Quantifizierung über stabile Isotope wird als SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) bezeichnet. Das stabile Isotop wird der wachsenden Zellkultur zugeführt, die als Standard fungieren soll. Alle neugebildeten Proteine sind daraufhin mit dem Isotop markiert. In der MS werden die zu untersuchenden Proben mit den Standards versehen und im Massenspektrum analysiert [Ong und Mann, 2007]. Die Auswertung der Proben bedarf eines komplexen Analytikprogramms, welches nicht kommerziell erhältlich ist. Diese Analyse beansprucht sehr viel Zeit, sobald sie auf den gesamten Proteomansatz angewandt wird. Bisher wurde eine solche Analyse noch nicht durchgeführt. Die genannten Probleme kamen auch bei den Analysen in dieser Arbeit zum Tragen. Trotzdem gewähren die hier aufgeführten Proteomdaten bereits einen ausführlichen Einblick in das *C. glutamicum* PTM Muster und konnten durch die unterschiedlichen Ansätze in Abschnitt 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 und mittels unterschiedlicher Analytikprogramme validiert werden. Diese Analyseverfahren bedarf jedoch noch einiger Optimierung. Es wird angestrebt, dass die Daten der Proteomanalyse in einem KeGG Stoffwechselweg [[KeGG PATHWAY DATABASE <http://www.genome.jp/kegg/>].] abgebildet werden können und mittels einer Intensitätsdarstellung (*heatmap*) die Regulation eines jeden Proteins zu jedem gemessenen Zeitpunkt darzustellen.

4.2.2. Die Proteine der Glykolyse und des Citratzyklus werden bei der Anwesenheit von ROS mehr modifiziert als Proteine anderer Stoffwechselwege

In Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 wurden zum einen intakte Zellen und zum anderen Zellextrakte von *C. glutamicum* WT und Δ katA-Stamm mit ROS gestresst und massenspektrometrisch

untersucht. Bei *in vitro* Stress zeigten die Proteine der Membranfraktion mehr Modifikationen als die des Zytosols (Daten nicht gezeigt). Sind Membranproteine während des Stresses über Lipide miteinander assoziiert, können bei einer Radikalkettenreaktion so direkt mehrere Ziele gleichzeitig modifiziert werden. In den *in vivo* Messungen wurde Desferal verwendet. Dies sollte freies Eisen abfangen und die Proteine nach dem Zellaufschluss schützen. Jedoch zeigte sich, dass Desferal die Messungen von Membranproteinen in der MS stört. Somit konnte keine Schlussfolgerung zu dem Ausmaß des oxidativen Stresses in der Membran lebender Zellen gemacht werden. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit auf Proteinen des Zytosols.

Die Δ katA-Mutante zeigte mehr PTMs als der WT, was durch die fehlende Katalase zu begründen ist. In der quantitativen Proteomanalyse weist die Δ katA-Mutante im letzten Messpunkt einen drastischen Anstieg der detektierten modifizierten Peptide auf (siehe Abbildung 21). Das plötzliche Einleiten von O₂ schadet demnach dem *C. glutamicum* Δ katA-Stamm und es könnte zu diesem Zeitpunkt zu einer erhöhten Proteinexpression kommen, sodass schon vorhandene oxidierte Proteine noch nicht abgebaut und neusynthetisierte bereits oxidativ modifiziert wurden [Møller *et al.*, 2011].

Bei den Analysen konnten viele Peptide der Enzyme des Zentralstoffwechsels sowie des Transkriptions- und Translationsapparates gefunden werden. Diese Enzyme kommen häufig in der Zelle vor. Jedoch hängt die Häufigkeit, mit der ein Peptid gefunden wird, nicht nur am Vorkommen in der Zelle ab, sondern auch von seinen chemischen Eigenschaften und vom Verhalten im Massenspektrometer. Es konnten Proteine identifiziert werden die eine gute Peptidabdeckung besitzen und trotzdem wenige Modifikationen aufweisen, wie z.B. die PGK (siehe Abschnitt 3.2.3). Dies zeigt, dass viele gefundene Peptide nicht gleichzeitig viele modifizierte Peptide bedeuten.

Es fällt auf, dass die Enzyme der Glykolyse und des TCAs besonders viele Modifikationen tragen, wohingegen Enzyme des Pentosephosphatwegs (*pentose phosphate pathway* -PPP) nur sehr wenige aufweisen. Für die meisten Enzyme der Glykolyse ist noch unklar, wieso diese viele Modifikationen besitzen. TCA Enzyme sind dafür bekannt, oxidativ modifiziert zu werden, da ein Großteil von ihnen Metalloenzyme sind [Meany *et al.*, 2007; Irazusta *et al.*, 2008].

Neben den Metalloenzymen gibt es Proteine mit reaktiven Thiolgruppen die bei oxidativen Stress modifiziert werden. Die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wird durch

ihre reaktiven Thiolgruppen in vielen Organismen als ROS-sensitiv und als oxidativer Sensor beschrieben [Chuang *et al.*, 2005]. Zudem soll die oxidative Inhibierung der Glykolyse ein gelenkter metabolischer Kohlenstofffluss in den PPP sein, um NADPH zu generieren [Ralser *et al.*, 2007]. NADPH wird für die Reduzierung von Antioxidantien benötigt (siehe Gleichung 7). In *D. radiodurans* ist eine Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mutante (Δzwf) sensitiver gegen H_2O_2 als eine Aldolasemutante (Δfba), da kein NADPH über den PPP gebildet werden kann [Zhang *et al.*, 2003].

Der metabolische Fluss der Glukose in den PPP wird in *C. glutamicum* bei oxidativen Stress nicht verändert [Krömer *et al.*, 2008]. Stattdessen wird der metabolische Fluss der Glukose verstärkt über die NADP-abhängige ICDH im TCA gelenkt. Offenbar hängt die Umleitung des Fluxes bei oxidativen Stress vom zellulären Hintergrund und physiologischen Eigenschaften des Organismus ab. Die Fluxantwort hängt wiederum von der Cofaktor Spezifität der verfügbaren Enzyme ab [Krömer *et al.*, 2008]. Daher ist es von großem Interesse wichtige Enzyme aus Glykolyse und TCA genauer zu betrachten.

4.3. Einfluss von ROS auf ausgewählte Enzyme

Um den Einfluss von ROS auf die Proteine zu testen, sollten die ausgewählten Enzyme bestimmte Kriterien befolgen. Dazu gehörte neben einer guten Peptidabdeckung in der MS-Analyse auch die Verfügbarkeit bereits etablierter und einfach umzusetzender Enzymtests. Beispielsweise ist der Einfluss von ROS auf die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) in anderen Organismen bereits eingehend untersucht worden, wohingegen über die ROS-Sensitivität von Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) und Fructosebisphosphat-Aldolase (FBA) bisher nur wenig bekannt ist. Auch über die ROS-Sensitivität von Enzymen des hier untersuchten Organismus *C. glutamicum* wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt.

4.3.1. Die FBA ist ein sensibles Metalloenzym

Die FBA katalysiert die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GADP). In Enzymaktivitätsmessungen von Zellextrakten konnte gezeigt werden, dass die FBA gleichermaßen sensitiv für H_2O_2 und 1O_2 gebildet durch RB ist. Die Aktivität der FBA im ungestressten *C. glutamicum* WT-Zellextrakt

beträgt ca. 3,4 nkatal/mg Zellextrakt, was dem Literaturwert von 0,03 U/mg Zellextrakt nahe kommt [Engels *et al.*, 2008].

Eine Aufreinigung der FBA war trotz verschiedener Optimierungsansätze nicht möglich, z.B. konnte ein His-tag nicht verwendet werden, da die FBA Nickel-sensitiv ist [Macomber *et al.*, 2011]. In Oxyblot Analysen der Aufreinigung konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Enzym unmittelbar nach Zellaufschluss bereits starke Carbonylierungen aufwies (siehe Abbildung 31). Aber auch die Aufreinigung im anaeroben Zelt zeigte keine Verbesserung der Enzymaktivität.

Die FBA ist ein Tetramer, bei dem jede Untereinheit als Cofaktor ein Zink-Ion besitzt. Die *C. glutamicum* FBA zählt zu den Aldolasen der Klasse II A [von der Osten *et al.*, 1989]. Diese unterscheiden sich von Klasse II B durch längere Peptidabschnitte zwischen den aktiven Zentren, die Schleifen (Loops) bilden können. Die hier identifizierten modifizierten Peptide liegen in den Bereichen, in welchen sich die Zink-Bindedomänen im β -Fass und das Helix-Schleife-Helix-Motiv befinden, welches zur Koordination der Untereinheiten von Bedeutung ist (siehe Abbildung 22). Da die FBA ein Metalloenzym ist, kann H_2O_2 mit dem Zn^{2+} -Ion reagieren, wobei es zur Fenton-Reaktion kommt. Die dabei gebildeten Hydroxylradikale reagieren mit AS der unmittelbaren Umgebung, was die starke Ballung der Modifikationen im β -Fass erklären könnte.

Die quantitative Proteomanalyse zeigt, dass die FBA in der Katalasemutante hochreguliert wurde (siehe Abbildung 25a). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es in der ΔkatA -Mutante durch den fehlenden Schutz gegen oxidativen Stress zu einem erhöhten Umsatz (*turnover*) von beschädigten Proteinen kommt und dass die FBA ein ROS sensitives Enzym ist.

In quantitativen Proteomanalysen des Bakteriums *Fusobacterium nucleatum* konnte bei O_2 -Stress ebenfalls eine Abnahme der FBA Aktivität beobachtet werden, während gleichzeitig ein Anstieg der intrazellulären Konzentration von FBA gemessen werden konnte. Da die FBA aus *F. nucleatum* oxidierte Methionine aufwies ist es sehr wahrscheinlich, dass sie inaktiviert wurde und *F. nucleatum* dies durch neusynthetisiertes Enzym kompensierte [Steeves *et al.*, 2011].

4.3.2. Die GAPDH ist ein wichtiger Regulator bei der oxidativen Stressantwort

Die GAPDH katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Bei Aktivitätsmessungen der GAPDH war diese stets sensitiver für

H₂O₂ als für ¹O₂. Die hier gemessenen Aktivitäten liegen für *C. glutamicum* WT-Zellextrakte bei 1,6 nkatal/mg Zellextrakt und für gereinigtes Enzym bei 37,5 nkatal/mg Protein. Die Aktivitäten liegen im Bereich des Literaturwertes von 1,3 U/mg Protein [Eikmanns, 1992]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität bei steigendem H₂O₂-Stress sinkt und gleichzeitig der Grad der Carbonylierungen zunimmt (siehe Abbildung 34). Die GAPDH besitzt zwei reaktive Thiolgruppen, die wichtig für die Umsetzung des Substrates sind. Die Thiolgruppen der Cysteine können bei Anwesenheit von ROS oxidieren und Disulfidbrücken ausbilden, wodurch das Enzym reversibel inaktiviert wird und es zum Stillstand der Glykolyse kommt [Leichert *et al.*, 2008]. Da die oxidative Modifikation von Thiol zu Disulfid in den MS-Analysen nicht untersucht wurde, kann keine Aussage über mögliche Modifikationen des aktiven Zentrums getroffen werden. Insbesondere H₂O₂ reagiert mit Thiolen zu Disulfidbrücken. Dies erklärt die höhere Sensitivität der GAPDH für H₂O₂. Der Kohlenstofffluss muss bei Inaktivierung der GAPDH über den PPP umgeleitet werden, was zu einer erhöhten Produktion von NADPH führt. Dieses wiederum ist für den Redoxzyklus der Antioxidantien wie Mycothiol wichtig [Chi *et al.*, 2011]. Ob diese Regulation auch für *C. glutamicum* zutrifft ist bisher noch unklar.

Das Bakterium *E. coli* besitzt für die ROS-sensitiven Enzyme Aconitase und Fumarase Isoenzyme [Liochev 1992; Cunningham *et al.*, 1997]. Deren Produktion wird bei oxidativem Stress aktiviert [Imlay, 2008]. *C. glutamicum* besitzt für die GAPDH die beiden Isoenzyme GapA und GapB. GapA bevorzugt NADH, wohingegen GapB NADPH als Cofaktor bevorzugt. Die Rolle von GapB ist noch nicht ganz geklärt, jedoch spielt die Verfügbarkeit von ATP bei der Regulation der beiden GAPDHs eine entscheidende Rolle. Des Weiteren könnte GapB in der Glukoneogenese verwendet werden [Omumasaba *et al.*, 2004]. Ob dieser Effekt eine Rolle bei der oxidativen Stressantwort in *C. glutamicum* spielt, ist nicht bekannt.

In der quantitativen Proteomanalyse zeigte die Δ katA-Mutante neben der FBA-Regulation ebenfalls eine Hochregulierung der GAPDH (siehe Abbildung 25b). Dies würde für einen stärkeren Proteinumsatz von modifizierten Proteinen sprechen.

4.3.3. Die ICDH ist ein potentielles Ziel für die Xenobiotikatherapie

Die ICDH katalysiert die Reaktion der oxidativen Decarboxylierung von Isocitrat, wobei NADPH und α -Ketoglutarat entstehen. Die ICDH ist sensitiver für ¹O₂ als für H₂O₂. Die mitochondriale ICDH wurde ebenfalls beschrieben sensitiv für ¹O₂ gebildet durch Hypochlorit

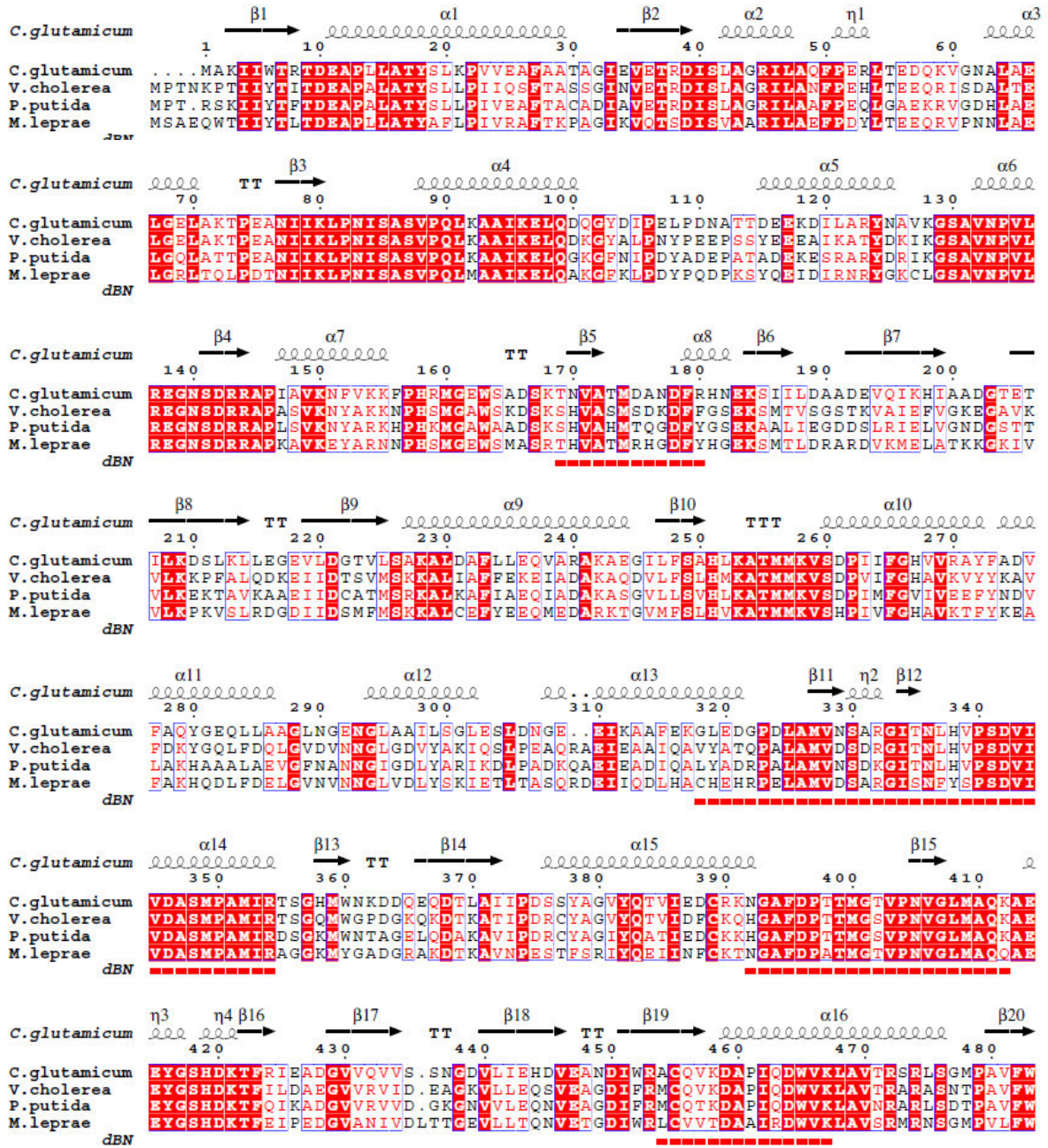
zu sein [Park *et al.*, 2008b]. Die hier gemessenen Aktivitäten betragen im *C. glutamicum* WT-Zellextrakt 5,7 nkatal/mg Zellextrakt und bis zu 510 nkatal/mg Protein im gereinigten Protein. Diese Werte liegen etwas unter dem Literaturwert von 124 U/mg Protein [Bai *et al.*, 1999]. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei zunehmendem H₂O₂-Stress die Enzymaktivität sinkt, während der Grad der Carbonylierungen steigt (siehe Abbildung 35). Da sich ein Mg²⁺-Ion im reaktiven Zentrum befindet, gehört die ICDH zu den Metalloenzymen. Die Kristallstruktur dieses Enzyms ist bereits bekannt [Imabayashi *et al.*, 2006]. Das Mg²⁺-Ion wird von Asp346, Asp548 und Asp544 koordiniert. Das Asp346 ist in einer Region lokalisiert, in der modifizierte Peptide gefunden wurden (siehe Abbildung 24). Möglicherweise wird dieses Aspartat oxidiert und kann dadurch keine Verbindung zum Mg²⁺-Ion aufbauen, was zur Instabilität des aktiven Zentrums führen könnte. Zudem kann das Mg²⁺-Ion durch ein stärker bindendes Ion wie Fe²⁺ ersetzt werden, welches die Fenton-Reaktion begünstigen würde [Irazusta *et al.*, 2008]. Nicht alle Metalloenzyme sind anfällig für die Fenton-Reaktion. Beispielsweise besitzen die Katalase und die Superoxiddismutase, welche direkt mit ROS interagieren, ein stark gebundenes Metallion mit einer sehr langsamen Dissoziationsrate, wodurch das O₂ Intermediat stabil bleibt und es nicht zur Bildung von OH• kommt [Valentine, 2007].

NADP wird in der ICDH von Ser581, Ala582, His585, Trp597, Arg645 und Arg696 koordiniert. Sowohl Ser581 als auch Ala582 liegen in einer Region, in der modifizierte Peptide detektiert wurden. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Bindung von NADP eine Schwachstelle in der ICDH bei oxidativem Stress sein kann.

Die ICDH Struktur von *C. glutamicum* ist in pathogenen Vertretern hoch konserviert. Die in den MS-Analysen identifizierten modifizierten Peptide wurden in einem Sequenzabgleich der ICDHs von *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas putida* und *Mycobacterium leprae* miteinander verglichen (siehe Abbildung 49). Die Bereiche, in denen sich die modifizierten Peptide befinden, sind unter den untersuchten Vertretern hoch konserviert. Bei oxidativem Stress durch Xenobiotika oder während Abwehrreaktionen durch Makrophagen des eukaryotischen Immunsystems, könnte die ICDH ein geeignetes Ziel für ROS sein. Eine ICDH-Deletion führt zur Akkumulation von Citrat und Isocitrat, welche toxisch für *C. glutamicum* sind [Baumgart *et al.*, 2011]. Der Verlust der ICDH oder der Aconitase in *C. glutamicum* begünstigt eine Mutation im *gltA* Gen (Citratsynthase), sodass kein Citrat gebildet und anschließend akkumuliert werden kann [Baumgart *et al.*, 2011].

Diskussion

Zudem könnte die ICDH ein wichtiges Enzym zur Bereitstellung von NADPH bei oxidativen Stress sein [Krömer *et al.*, 2008]. Die Inaktivierung dieses Enzymes hätte somit fatale Folgen für den Redoxzyklus von Antioxidantien.



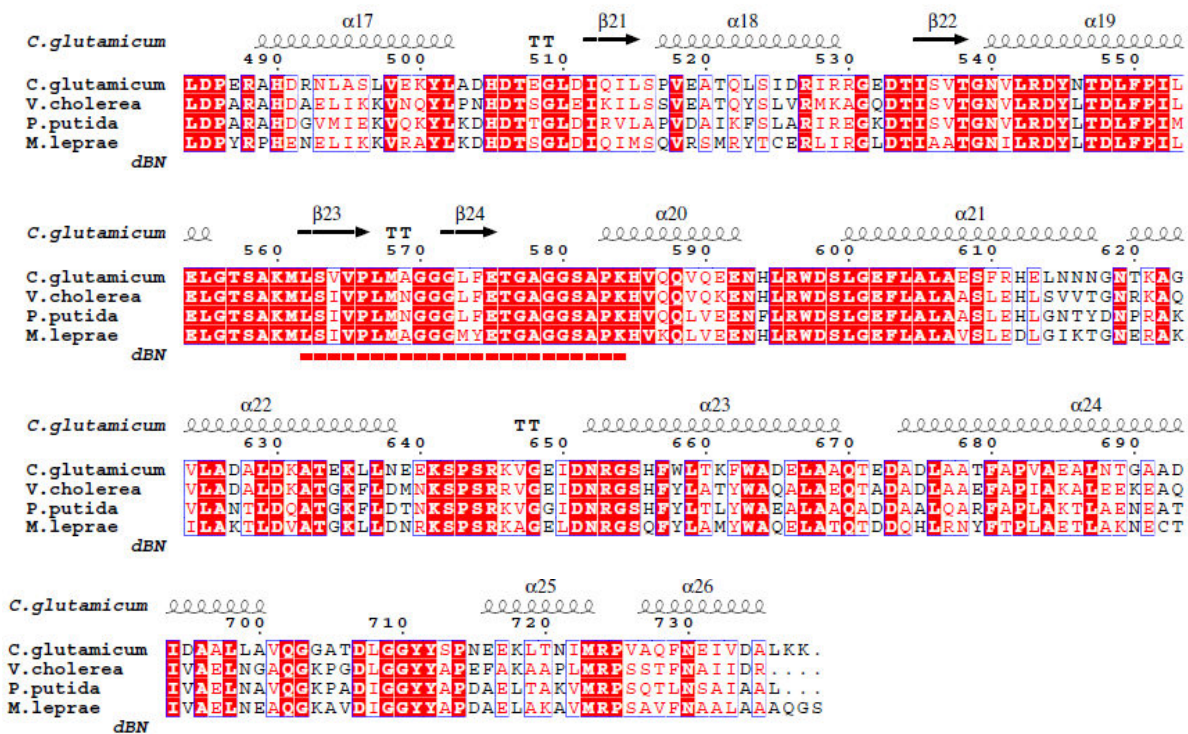


Abbildung 49: Alignment der ICDH aus *C. glutamicum*, *V. cholerae*, *P. putida* und *M. leprae*. Für das Alignment wurde das Programm ESPript 2.1 verwendet. Rot unterlegte Bereiche zeigen die gleiche AS an. AS in roten Buchstaben bedeuten, dass sie zu gleichen biochemischen AS Gruppe gehören. Über dem Alignment befindet sich die ICDH Tertiärstruktur der FBA aus *C. glutamicum*. Unter dem Sequenzabgleich befinden sich als rote Striche die Bereiche, welche in 3.2.3 als modifizierte Peptide analysiert wurden.

4.4. ROS-Schutzmechanismen von *C. glutamicum*

4.4.1. Die Expression heterologer FBAs führt zu keiner verbesserten ROS-Resistenz in *C. glutamicum*

Die FBAs aus *D. radiodurans*, *S. gordonii* und *P. acnes*, die zu den II B Aldolasen gehören, weisen kürzere Peptidschleifen in den Zwischenbereichen des aktiven Zentrum auf als die *C. glutamicum* FBA (siehe Abbildung 22). Durch die so veränderte Proteinstruktur und damit auch anders exponierte AS, könnte es zu Veränderungen in der ROS-Resistenz kommen. Die FBAs von *D. radiodurans* und *S. gordonii* könnten den Organismen zu einer besseren Resistenz verhelfen. Diese Bakterien können sehr gut mit oxidativem Stress umgehen und sind diesem ständig ausgesetzt. Bei heterologer Expression dieser FBAs in *C. glutamicum* könnte eine erhöhte Stresstoleranz festgestellt werden. *P. acnes* hingegen ist ein anaerobes Bakterium, welches sehr sensitiv für oxidativen Stress ist. Demnach könnte dessen Enzym *C. glutamicum* sensitiver für oxidativen Stress machen.

Werden heterologe FBAs in einer Δ fba-Mutante exprimiert, kann diese komplementiert werden (siehe Abbildung 39). Bei $^1\text{O}_2$ -Stress durch RB zeigten die

Komplementationsmutanten und der WT, keine Verbesserung im Wachstum (siehe Abbildung 40). Auch die Enzymaktivität der heterologen FBAs ebenso wie die *C. glutamicum* FBA wird bei zunehmendem $^1\text{O}_2$ -Stress geringer. Die FBA aus *P. acnes* zeigt sich wie erwartet empfindlicher als die anderen FBAs (siehe Abbildung 41). Demnach ist es nicht möglich mittels der gewählten Enzyme, die ROS-Resistenz durch die veränderte Struktur der heterologen Enzyme zu verbessern. Dies könnte daran liegen, dass die ausgewählten Enzyme nicht resistenter sind als die von *C. glutamicum*. Demnach könnte es durchaus resistenter Enzyme geben. Da die ROS-bedingten Schäden nicht nur ein Enzym betreffen, sondern im gesamten Proteom vorkommen, könnten neben der FBA auch andere der oxidierten Proteine einen stärkeren Effekt auf das Wachstum bei oxidativen Stress haben.

Die Tatsache, dass die unterschiedlichen FBAs in *C. glutamicum* alle gleichermaßen durch ROS geschädigt wurden, legt nahe, dass es neben den enzymatischen, andere Schutzmechanismen in der Zelle gegen oxidativen Stress geben muss. Es sind niedermolekulare Substanzen beschreiben, die ROS im Zytosol abfangen und so Proteine schützen können [Daly .et al., 2010]

4.4.2. Niedermolekulare Substanzen im Zytosol schützen die Zelle vor oxidativem Stress

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass heterologe Schutzenzyme wie die AhpCF oder heterologe Enzyme mit veränderten strukturellen Eigenschaften, die ROS-Resistenz von *C. glutamicum* nicht verbessern konnten. Daher wurden zusätzlich nicht-enzymatische Schutzmechanismen untersucht. Dazu wurden Zellextrakte von *C. glutamicum*, *D. radiodurans* und *E. coli* verwendet, den aufgereinigten Enzymen GAPDH und ICDH zugefügt und die Enzymaktivität von ungestressten und gestressten Ansätzen gemessen. Insbesondere die Zellextrakte von *C. glutamicum* und *D. radiodurans* besaßen eine schützende Funktion bei $^1\text{O}_2$ -Stress gebildet durch NaOCl bei der ICDH. Der Zellextrakt von *E. coli* schützt hingegen nicht (siehe Abbildung 44 und Abbildung 46). In Untersuchungen, in denen Zellextrakte von *E. coli* und *D. radiodurans* gemischt und radioaktiver Strahlung ausgesetzt wurden, zeigten sowohl die Proteine von *D. radiodurans* als auch die von *E. coli* kaum Carbonylierungen. Wurde nur *E. coli* Zellextrakt diesem Stress ausgesetzt, war die Anzahl der Carbonylierungen um den Faktor 3,5 erhöht [Krisko und Radmann, 2010]. Diese Schutzfunktion des *D. radiodurans* Zellextrakts vor Carbonylierungen konnte auch der hier durchgeführten Oxyblot sowohl bei der GAPDH als auch der ICDH bestätigen (siehe

Abbildung 45 und Abbildung 47). Der radioaktive und der damit einhergehende oxidative Schutz von *E. coli*-Proteinen soll durch das *D. radiodurans* Pigment Deinoxanthin und das zytosolische Pyrrolochinolinchinon (PQQ) vermittelt werden [Misra *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007]. Jedoch hat eine Inaktivierung der Deinoxanthin Synthese nur einen minimalen Effekt auf die ROS-Resistenz in *D. radiodurans* [Zhang *et al.*, 2007]. Demnach muss es eine Vielzahl von Komponenten in *D. radiodurans* Zellextrakten geben, die zu diesen ausgeprägten ROS-Resistenzen führen [Krisiko und Radmann, 2010]. Da *C. glutamicum* jedoch weder Deinoxanthin noch PQQ bildet, sind dies nicht die schützenden Komponenten, die dazu führen, dass der *C. glutamicum*-Extrakt einen genauso guten Schutz bietet wie der von *D. radiodurans*.

Eine weitere niedermolekulare Substanz, die einen schützenden Effekt haben soll, ist Mangan. In *D. radiodurans* kann radioaktive Strahlung Elektronen von H_2O abspalten, welche mit O_2 zu O_2^- reagieren [von Sonntag, 1987]. Mn^{2+} könnte hier mit O_2^- und H^- reagieren und Mn^{3+} sowie H_2O_2 bilden [Gutman *et al.*, 1994]. H_2O_2 ist weniger reaktiv als O_2^- und kann bei einem Überschuss in der Zelle durch die Zellwand ins Medium diffundieren. Der verbleibende H_2O_2 -Anteil in der Zelle könnte wiederum mit Mn^{3+} reagieren und damit Mangan reduzieren und O_2 generieren [Daly *et al.*, 2007]. Für *C. glutamicum* konnte jedoch gezeigt werden, dass die Akkumulation von Mn^{2+} einen negativen Wachstumseffekt hat (siehe Abbildung 9). Demnach ist Mn^{2+} nicht eine der schützenden niedermolekularen Substanzen in *C. glutamicum*.

Untersuchungen, in denen die Zellextrakt-Zusammensetzung von *D. radiodurans* analysiert wurde, zeigten dass die Kombination aus Orthophosphat (13 mM), Mn^{2+} (200 μM) und Peptiden (3 mM; H-Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH) zwar Proteine vor bis zu 17,5 kGy Strahlung schützten, nicht aber die DNA [Daly *et al.*, 2010]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Methionin, welches sich in dem getesteten Peptid befindet, mittels seiner Schwefelgruppe ROS abfängt. Es wurden Methionine beschrieben, die sich exponiert an Proteinoberflächen befinden, um ROS zum Schutz anderer AS abzufangen [Levine *et al.*, 1996]. Im Enzymtest konnten 10 mM Methionin die Inaktivierung der *C. glutamicum* ICDH durch H_2O_2 verhindern (siehe Abbildung 48). Als Aminosäureproduzent könnte *C. glutamicum* Methionin intern anreichern. Für *E. coli* O157:H7 und *B. cereus* ist bekannt, dass sowohl die Methionin-Produktion sowie die anderer schwefelhaltiger AS bei oxidativen Stress verstärkt wird [Wang *et al.*, 2009; Ceragioli *et al.*, 2010]. Jedoch gibt es für

C. glutamicum keine Anzeichen einer Methionin Akkumulation unter oxidativem Stress. Viel wahrscheinlicher ist eine Reduktion der einfach oxidierten, proteinassoziierten Methioninreste durch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase A und B (MsrA und MsrB). In Genomanalysen konnte eine verstärkte Expression von *msrA* bei H₂O₂-Stress in *C. glutamicum* nachgewiesen werden [Kalinowski, unveröffentlicht].

Die Aminosäure Cystein zeigt ebenfalls eine hohe Reaktivität mit ROS. Bei der Anwesenheit von ROS können Thiolseitengruppen oxidiert werden und Disulfidbrücken ausbilden. Dies kann sowohl zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors wie OxyR führen, aber auch zur Enzyminaktivierung wie im Fall der GAPDH. Bei Eukaryoten wird die Reaktivität der Thiolgruppen mit ROS dazu verwendet die niedermolekulare Substanz Glutathion (Glu-Cys-Gly, GSH) zu GSSG zu dimerisieren und so vor ROS schützen. Glutathion ist auch bei Prokaryoten weit verbreitet, wie z.B. in *E. coli* und Cyanobakterien [Fuchs und Warner, 1975; Fahey *et al.*, 1987]. In *Bacillus* und *D. radiodurans* wird statt Glutathion Bacillithiol (Cys-GlcN-mal, BSH) gebildet, Actinomyceten bilden dagegen Mycothiol (AcCys-GlcN-Ins, MSH) [Nicely *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2008]. *C. glutamicum* besitzt vier Enzyme für die Biosynthese von Mycothiol (*mshA*, *mshB*, *mshC* und *mshD*). Werden *mshC* und *mshD* deletiert, kann kein Mycothiol mehr gebildet werden [Feng *et al.*, 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass die *C. glutamicum* Δ *mshC*- und Δ *mshD*-Mutanten ihr Wachstum einstellen, wenn sie mit ¹O₂ gebildet durch 0,005 % NaOCl gestresst werden, wohingegen der WT nach kurzer Verzögerungsphase weiter wächst (siehe Abbildung 42). Werden die Stämme jedoch mit ¹O₂ gebildet durch 10 - 20 μ M RB gestresst, stellen sie das Wachstum dauerhaft ein. Während NaOCl flüchtig ist, generiert RB permanent neues ¹O₂. Dieser Dauerstress ist auch für den WT nicht tolerierbar. An menschlichen Makrophagen konnte gezeigt werden, dass der ¹O₂-Schutz durch Glutathion spezifisch ist [Yang *et al.*, 2012]. Werden die Bakterienstämme hingegen mit H₂O₂ gestresst, setzen sie ihr Wachstum fort. Dies zeigt, dass die Bakterien durch die Katalase vor H₂O₂ geschützt sind, der spezifische Schutz vor ¹O₂ jedoch durch Mycothiol vermittelt wird.

Es ist jedoch erstaunlich, dass der Zellextrakt der Δ *mshD*-Mutante die *C. glutamicum* ICDH Enzymaktivität genauso gut vor ¹O₂ gebildet durch NaOCl schützt wie der WT Zellextrakt (siehe Abbildung 46). Dies bedeutet, dass andere Komponenten des Zellextrakts das Fehlen von Mycothiol kompensieren können. Bei Inhibierung der Mycothiolbiosynthese wird verstärkt die niedermolekulare Substanz Ergothionein (ET) gebildet [Ta *et al.*, 2011]. Dieser

Effekt wurde bei einer Mycothiol-defizienten Mutante in *M. smegmatis* beschrieben [Ta *et al.*, 2011]. ET ist ein natürliches Antioxidans, das nur von Pilzen und einigen Mykobakterien synthetisiert werden kann [Fahey, 2001]. Eukaryoten können es nicht selber synthetisieren, besitzen jedoch ET Transportsysteme [Melville *et al.*, 1955]. ET ist ein Thioharnstoffderivat von Histidin mit einem Schwefelatom und einem Imidazolring. Die Biosynthese ist noch nicht vollständig bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass der Imidazolring vom Histidin bereitgestellt und methyliert wird, um Histidin-Betain herzustellen und das Schwefelatom über ein Cystein eingebaut wird [Melville *et al.*, 1959; Ey *et al.*, 2007]. Ob diese Substanz auch verstärkt in der Δ mshC- und Δ mshD-Mutante gebildet wird, bleibt zu untersuchen.

Es ist jedoch auffällig, dass die Mycothiol-defizienten Mutanten in Wachstumsversuchen gegenüber NaOCl sensitiv sind, der Zellextrakt aber weiterhin ausgewählte Enzyme schützt. Die Begründung könnte darin liegen, dass bestimmte Cysteinreste von Proteinen mit Mycothiol modifiziert werden können, d.h. mycothioliert werden [Chi *et al.*, 2011]. Die Glutathiolierung sowie die Bacillithiolierung sind bereits sehr gut untersucht, wohingegen für *C. glutamicum* über diesen Effekt kaum etwas bekannt ist. Bei der Thiolierung kommt es zur Inaktivierung der betroffenen Enzyme. Ist der oxidative Stress vorüber, können die thiolierten Proteine wieder reduziert werden und sind wieder aktiv. Diese Reversibilität bedeutet für die Zelle einen geringeren Energieaufwand als eine Neusynthese beschädigter Proteinen. Bei der Bacillithiolierung werden in *B. subtilis* unter anderem OhrR (Redox-aktivierter Repressor für die Hydroperoxid-Resistenz), MetE (Methionin-Synthase), YphP (Thioldisulfid-Isomerase) mit BSH modifiziert. Die Bacillithiolierung des MetE führt zur Methionin-Auxotrophie, die einen Translationsstop während der Zeit des NaOCl-Stresses zur Folge hat. Dies würde wiederum eine Akkumulation von Cystein auslösen [Chi *et al.*, 2011]. Möglicherweise fungiert YphP als Bacilliredoxin durch die Reduktion von bacillithiolierten Proteinen [Chi *et al.*, 2011].

Für die FBA im Muskelgewebe von Hasen wurde gezeigt, dass oxidiertes Glutathion das Enzym inaktiviert [Offermann *et al.*, 1984]. In Pflanzen wurden ebenfalls die Modifikationen der FBA an regulatorische Cysteinen durch Glutathiolierung mittels Proteomanalysen festgestellt [Ito *et al.*, 2003]. Obwohl es sich bei eukaryotischen FBAs um Enzyme der Klasse I handelt, sollte untersucht werden, ob die *C. glutamicum* FBA ebenfalls durch Mycothiolierung inaktiviert wird.

Welchen Nutzen die Mycothiolierung für *C. glutamicum* hätte, ist bisher nicht bekannt. Da die Mycothiolmutanten in Wachstumsversuchen jedoch sensitiv gegenüber $^1\text{O}_2$ gebildet durch NaOCl sind, deren Zellextrakte die ICDH und GAPDH aber schützen können, muss ein weiterer effektiver Mechanismus in *C. glutamicum* existieren, der sensible Proteine schützt. Daher ist es von großem Interesse, diesen Effekt weiter zu studieren und die betroffenen Proteine zu identifizieren, um ein besseres Verständnis für die oxidative Stressantwort in *C. glutamicum* zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Der Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* wird sowohl in seiner natürlichen Umgebung als auch in der biotechnologischen Anwendung mit Sauerstoff konfrontiert. Dabei kommt es unweigerlich zu oxidativem Stress, welcher zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Zu diesen zählen unter anderem das reaktive Superoxid (O_2^-), das stabile Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff (1O_2). ROS greift sowohl die Zellmembran als auch Proteine und DNA an. Dies kann zu erheblichen Zellschäden bis hin zum Zelltod führen. Im Laufe der Evolution haben die Organismen Schutzmechanismen etabliert, die sie effektiv vor ROS-Schäden schützen. Beispiele hierfür sind sowohl schützende Enzyme, wie die Superoxiddismutase und Katalase, als auch nicht-enzymatische Mechanismen wie die Akkumulation von Mangan oder niedermolekularer Substanzen. Über das Ausmaß der oxidativen Schädigung und die ROS-Schutzmechanismen in *C. glutamicum* ist bisher noch sehr wenig bekannt.

In physiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Bodenbakterium *C. glutamicum* sensitiver für 1O_2 ist, welches durch Hypochlorit (NaOCl) oder dem Farbstoff Rose Bengal gebildet werden kann, als für H_2O_2 . *C. glutamicum* besitzt eine große Menge hoch wirksame Katalase, welche in kürzester Zeit mit H_2O_2 reagiert und es unschädlich macht. Somit kann H_2O_2 nicht mehr mit freien zweiwertigen Metallen über die Fenton-Reaktion zu aggressivem OH^\bullet reagieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Fettsäurezusammensetzung der Lipide in der Membran in *C. glutamicum* ebenfalls bei 1O_2 -Stress gebildet durch Rose Bengal beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wird die DNA von H_2O_2 und 1O_2 in *C. glutamicum* sehr gut geschützt.

Es war möglich Bedingungen zu definieren, in denen die Katalase reprimiert wird. Sobald es zu starken pH-Schwankungen kommt oder die Eisenverfügbarkeit sinkt, ist die Katalase nicht mehr aktiv. Eine Katalase-defiziente Mutante (Δkat) ist sensitiv gegenüber H_2O_2 . Mittels Oxyblot konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 -Stress im $\Delta katA$ -Mutante-Zellextrakt viele carbonylierte Proteine zur Folge hat. Aber auch in Fermentationen mit schrittweise steigender O_2 -Zufuhr konnten in *C. glutamicum* Wildtyp carbonylierte Proteine identifiziert werden.

Proteomanalysen der Fermentation sowie H_2O_2 gestresste Zellextrakte, und mit H_2O_2 gestresste Zellen zeigten, dass viele Proteine der Glykolyse und des Citratzyklus oxidativ

modifiziert werden. Insbesondere Metalloenzyme und Enzyme mit reaktiven Thiolgruppen sind betroffen, wohingegen Enzyme des Pentosephosphatwegs vergleichsweise wenig oxidativ bedingte Modifikationen aufwiesen. Zur genaueren biochemischen Analysen wurden die Fructosebisphosphat-Aldolase (FBA), die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), welche sich in den Proteomanalysen als interessante Ziele für ROS herausgestellt hatten, herangezogen.

FBA zeigte sich in biochemischen Analysen der Zellextrakte sensitiv gegenüber H_2O_2 und $^1\text{O}_2$, wohingegen GAPDH sensitiver gegenüber H_2O_2 war und sich die ICDH als sensitiver gegenüber $^1\text{O}_2$ herausstellte. In quantitativen Proteomanalysen zeigten FBA und GAPDH im ΔkatA -Stamm eine Hochregulation bei oxidativem Stress, während ICDH sowohl im Wildtyp als auch in der ΔkatA -Mutante keiner Regulation bei oxidativen Stress unterworfen war.

In Oxyblotanalysen mit gereinigten GAPDH und ICDH konnte gezeigt werden, dass die Stärke der carbonylierten Banden mit der Abnahme der Enzymaktivität und der applizierten H_2O_2 -Konzentration korrelieren.

Mittels Überexpression von heterologen FBAs in einen FBA-defizienten Stamm von *C. glutamicum*, konnte gezeigt werden, dass es nicht möglich ist mittels veränderten strukturellen Eigenschaften der ausgewählten Enzyme die ROS-Resistenz zu verbessern. Ebenfalls konnte keine Verbesserung der ROS-Resistenz durch die Überexpression einer Alkylhydroperoxide-Reduktase erzielt werden.

Es konnte ein schützender Effekt des proteinfreien Zellextraktes aus *C. glutamicum* festgestellt werden, der ähnlich dem von *D. radiodurans* zu sein scheint. Die Akkumulation von Mangan zeigte im Gegensatz zu Untersuchungen an *D. radiodurans* in *C. glutamicum* keine schützende Wirkung. Die ICDH-Aktivität konnte durch freies Methionin in Enzymtestansätzen geschützt werden. Mycothiol-defiziente Mutanten waren sensitiv gegenüber $^1\text{O}_2$ gebildet durch Hypochlorit. Demnach scheinen insbesondere niedermolekulare Substanzen im Zytosol einen schützenden Effekt in *C. glutamicum* zu haben, wenn der enzymatische Schutz nicht mehr ausreicht. Welche Rolle die Mycothiolierung dabei in *C. glutamicum* spielt, wird zurzeit untersucht.

6. Literaturverzeichnis

- Abe S., Takayama K. und Kinoshita S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 279-301
- Aho EL, Kelly LP.(1995)** Identification of a glutathione peroxidase homolog in *Neisseria meningitidis*. *DNA Seq.* 1995;6(1):55-60.
- Al-Maghrebi M., Fridovich I., Benov L. (2002)** Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 402:104-9.
- Anderson A. W., Nordan H.C., Cain R.F., Parrish G., Duggan D. (1956).** Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* 10 (1): 575–577.
- Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G.L., Thornton J.M. (2008)** Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem.*;13(8):1205-18. Epub 2008 Jul 5.
- Antelmann H., Engelmann S., Schmid R., Hecker M. (1996)** General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J Bacteriol.*:178(22):6571-8.
- Archibald F.S., Fridovich I. (1981)** Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 146: 928-36
- Archibald F. (1986)** Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 13(1):63-109. Review.
- Arenas F.A., Díaz W.A., Leal C.A., Pérez-Donoso J.M., Imlay J.A., Vásquez C.C.(2010)** The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem Biophys Res Commun.*;398(4):690-4.
- Bae J.B., Park J.H., Hahn M.Y., Kim M.S., Roe J.H. (2004)** Redox-dependent changes in RsrA, an anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor*: zinc release and disulfide bond formation. *J Mol Biol.*;335(2):425-35.
- Bai C., Fernandez E., Yang H., Chen R. (1999)** Purification and stabilization of a monomeric isocitrate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *Protein Expr Purif.*;15(3):344-8.
- Baumgart M., Mustafi N., Krug A., Bott M. (2011)** Deletion of the aconitase gene in *Corynebacterium glutamicum* causes strong selection pressure for secondary mutations inactivating citrate synthase. *J Bacteriol.*;193(24):6864-73.
- Berghoff B.A., Glaeser J., Nuss A.M., Zobawa M., Lottspeich F., Klug G. (2011)** Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for *Roseobacter*. *Environ Microbiol.*;13(3):775-91.
- Bergmeyer H.U. (1974)** Methods of enzymatic analysis. Chemie Verlag. Weinheim und New York
- Berlett BS, Chock PB, Yim MB, Stadtman ER. (1990)** Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;87(1):389-93.
- Berlett B.S., Stadtman E.R.(1997)** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20313-6.
- Bradford M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-25.

- Brennan P.J. and Lehane D.P. (1971)** The phospholipids of corynebacteria. *Lipids* 6:401.
- Bzymek, K. P., G. L. Newton, P. Ta, and R. C. Fahey. (2007)**. Mycothiol import by *Mycobacterium smegmatis* and function as a resource for metabolic precursors and energy production. *J. Bacteriol.* 189:6796–6805.
- Carlioz A., Touati D. (1986)** Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* 5: 623-30
- Ceragioli M., Mols M., Moezelaar R., Ghelardi E., Senesi S., Abee T. (2010)** Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Appl Environ Microbiol.* 76(10):3352-60.
- Chi BK, Gronau K, Mäder U, Hessling B, Becher D, Antelmann H. (2011)** S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol Cell Proteomics.*;10(11):M111.009506.
- Christman M.F., Morgan R.W. Jacobson F.S., Ames B.N. (1985)** Positiv control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41:753-762
- Chuang D.M., Hough C., Senatorov V. (2005)** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:269-290.
- Citron, D. M., M. I. Ostavari, A. Karlsson, and E. J. Goldstein. (1991)**. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J. Clin.Microbiol.* 29:2197–2203.
- Collins M.D., Goodfellow M., and Minnikin D.E. (1982)** A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 128:129.
- Craig, N. L., and J. W. Roberts. (1981)** Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* recA protein-directed cleavage of phage lambda repressor. *J. Biol. Chem.* 256:8039–8044
- Cunningham L., Gruer M.J., Guest J.R. (1997)** Transcriptional regulation of the aconitase genes (acnA and acnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology.*;143 (Pt 12):3795-805.
- Daly M.J., Minton K.W. (1997)** Recombination between a resident plasmid and the chromosome following irradiation of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*.. *Gene.* 187(2): 225-229
- Daly M.J., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Vasilenko A., Zhai M., Venkateswaran A., Hess M., Omelchenko M.V., Kostandarithes H.M., Makarova K.S., Wackett L.P., Fredrickson J.K., Ghosal D. (2004)** Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*;306(5698):1025-8.
- Daly M.J., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Vasilenko A., Zhai M., Leapman R.D., Lai B., Ravel B., Li S.M., Kemner K.M., Fredrickson J.K. (2007)** Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol.*;5(4):e92.
- Daly M.J., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Kiang J.G., Fukumoto R., Lee D.J., Wehr N.B. , Viteri G.A., Berlett B.S., Levine R.L. (2010)** Small-Molecule Antioxidant Proteome-Shields in *Deinococcus radiodurans* *PLoS ONE* 5(9): e12570. doi:10.1371/journal.pone.0012570
- Davies M.J. (2004)** Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:17–25
- Dhandayuthapani S., Zhang Y., Mudd M.H., Deretic V. (1996)** Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of ahpC by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. *J Bacteriol.* 1996 Jun;178(12):3641-9.

- Ding H., Hidalgo E., Demple B. (1996)** The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J Biol Chem.*; 271: 33173–33175
- Eikmanns B. J., Kleinertz E., Liebl W. und Sahm H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102: 93-8
- Eikmanns BJ. (1992)** Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J Bacteriol.* 174(19):6076-86.
- Engels V., Lindner S.N., Wendisch V.F. (2008)** The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 190(24):8033-44.
- Escherich T. (1885)** Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglinge. *Fortschr. Med.* 3: 515–522.
- Fahey R.C., Buschbacher R.M., Newton G.L. (1987)** The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J Mol Evol.* 1987;25:81-8.
- Ey J., Schömig E., Taubert D. (2007)** Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *J. Agric. Food Chem.* 55 (16): 6466–74.
- Fahey R.C. (2001).** Novel thiols of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 333–56.
- Feng J., Che Y., Milse J, Yin Y.J., Liu L., Rückert C., Shen X..H, Qi S.W., Kalinowski J., Liu S.J. (2006)** The gene ncgl2918 encodes a novel maleylpyruvate isomerase that needs mycothiol as cofactor and links mycothiol biosynthesis and gentisate assimilation in *Corynebacterium glutamicum* *J. Biol. Chem.* 281(16): 10778-10785
- Ferrante A.A., Augliera J., Lewis K., Klibanov A.M. (1995)** Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: the unexpected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;92(17):7617-21.
- Flint D.H., Tuminello J.F., Emptage M.H. (1993)** The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268: 22369-76
- Follmann M., Ochrombel I., Krämer R., Trötschel C., Poetsch A., Rückert C., Hüser A., Persicke M., Seiferling D., Kalinowski J., Marin K. (2009)** Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* 10:621
- Frankel E.N. (1980)** Lipid Oxidation. *Prog. Lipid Res.* Vol. 19. pp. 1-22
- Fuchs J. A., Warner H. R. (1975)** Isolation of an *Escherichia coli* mutant deficient in glutathione synthesis. *J Bacteriol.*; 124(1): 140–148.
- Gailly C., Sandra P., Verzele M., and Cocito C. (1982)** Analysis of mycolic acids from a group of corynebacteria by capillary gas chromatography and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 125:83.
- Garrison, W. M. (1987)** Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.* 87, 381-398.
- Ghezzi P., Bonetto V. (2003)** Redox proteomics: Identification of oxidatively, modified proteins. *Proteomics* 3:1145–53
- Gonzalez-Flecha B., Demple B. (1995)** Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol Chem* 270(23):13681–13687.
- Grant S., Jessee J., Bloom F. und Hanahan D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. USA.* 87: 4645-4649

- Grant RA, Filman DJ, Finkel SE, Kolter R, Hogle JM. (1998)** The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol.*;5(4):294-303.
- Greenberg J.T., Monach P., Chou J.H., Josephy P.D., Demple B. (1990)** Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(16):6181-5.
- Gutman P.D., Fuchs P., Minton K.W. (1994)** Restoration of the DNA damage resistance of *Deinococcus radiodurans* DNA polymerase mutants by *Escherichia coli* DNA polymerase I and Klenow fragment. *Mutat Res.*;314(1):87-97.
- Guyer M.S., Reed R.R., Steitz J.A., Low K.B.(1981)** Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 45 (1):135-40.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999)** Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford: Oxford Univ. Press. 3rd ed.*
- Halliwell B. (2006)** Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141:312–22
- Halliwell B. und Gutteridge J.M.C. (2008)** Chemistry of free radicals and related 'Reactive species'. *In Free Radicals in Biology and Medicine (4th edn)* pp. 30-78 Oxford University Press, NY.
- Hara H., Hiramatsu H., Adachi, T. (2007).** Pyrroloquinoline quinone is a potent neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurochemical Research* 32 (3): 489–95.
- Hasegawa K. (2008)** Direct measurements of absolute concentration and lifetime of singlet oxygen in the gas phase by electron paramagnetic resonance. In: *Chemical Physics Letters*, 457 (4–6), S. 312–314
- Henle E.S., Han Z., Tang N., Rai P., Luo Y., Linn S. (1999)** Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reaction has possible biological implications. *J Biol. Chem.* 274: 962-71
- Imabayashi F., Aich S., Prasad L., Delbaere L.T. (2006)** Substrate-free structure of a monomeric NADP isocitrate dehydrogenase: an open conformation phylogenetic relationship of isocitrate dehydrogenase. *Proteins* 1;63(1):100-120.
- Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988)** Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science.* 240: 640-2
- Imlay J.A., Fridovich I. (1991)** Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266: 755-76
- Imlay J.A. (2008)** Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 755-76
- Inaoka T., Matsumura Y., Tsuchido T. (1999)** SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 181:1939-43.
- Irazusta V., Moreno-Cermeño A., Cabisco E., Ros J., Tamarit J. (2008)** Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radic Biol Med.*;44(9):1712-23.
- Ito H., Iwabuchi M., Ogawa K. (2003)** The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione. *Plant Cell Physiol.*44(7):655-60.
- Jang S., Imlay J.A. (2007)** Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J. Biol. Chem.* 282: 929-37

- Jeong Y.C., Nakamura J., Upton P.B., Swenberg J.A. (2005)** Pyrimido[1,2- α]-purin-10(3H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. *Nucleic Acids Res.* 33:6426–34
- Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Möckel B., Pfefferle W., Pühler A., Rey D.A., Rückert C., Rupp O., Sahm H., Wendisch V.F., 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(1-3):5-25.
- Kallifidas D., Thomas D., Doughty P., Paget M.S. (2010)** The sigmaR regulon of *Streptomyces coelicolor* A32 reveals a key role in protein quality control during disulphide stress. *Microbiology*.;156(Pt 6):1661-72.
- Kang J.G., Paget M.S., Seok Y.J., Hahn M.Y., Bae J.B., Hahn J.S., Kleanthous C., Buttner M.J., Roe J.H. (1999)** RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J*.;18(15):4292-8.
- Kasahara T., Kato T. (2003)** Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*. 2003 Apr 24;422(6934):832.
- Kase H. und Nakayama K. (1975)** L-methionine production by methionine analog resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* 39: 153-160
- Kehres D.G., Zaharik M.L., Finlay B.B., Maguire M.E. (2000)** The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol.* 36:1085-100.
- Kim J.S., Holmes R.K. (2012)** Characterization of OxyR as a negative transcriptional regulator that represses catalase production in *Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS One*. 2012;7(3):e31709.
- Kim T.H., Park J.S., Kim H.J., Kim Y., Kim P., Lee H.S. (2005)** The whcE gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 25;337(3):757-64.
- Kinoshita S., Udaka S., Shimono M., (1957)**, Studies on the amino acid fermentation. 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
- Korshunov S., Imlay J.A. (2006)** Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188: 6326-34
- Kreth J., Zhang Y., Herzberg M.C. (2008)** Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 190(13):4632-40
- Krisko A., Radman M. (2010)** Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;107(32):14373-7.
- Krömer J.O., Bolten C.J., Heinzle E., Schröder H., Wittmann C. (2008)** Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiology*.;154(Pt 12):3917-30.
- Korycka-Dahl MB, Richardson T.(1978)** Activated oxygen species and oxidation of food constituents. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*;10(3):209-41.
- Laemmli U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 5259: 680-685
- Lechtken P. (1974)** Singulett-Sauerstoff. In: *Chemie in unserer Zeit.* 8, Nr. 1
- Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. (1999)** Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.*; 274: 16040–16046

- Lee J.W., Helmann J.D. (2006)** Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J. Biol. Chem.* 281(33):23567-78
- Leichert L.I., Gehrke F., Gudiseva H.V. (2008)** Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8197–8202
- Leuchtenberger W., Huthmacher K. und Drauz K. (2005)** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 1-8
- Levine R.L., Willams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994)** Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346–57
- Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S., Stadtman E.R. (1996)** Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;93(26):15036-40.
- Li W., Bottrill A.R., Bibb M.J., Buttner M.J., Paget M.S., Kleanthous C. (2003)** The Role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol.* 333(2):461-72.
- Li Y., He Z.G. (2012)** The mycobacterial LysR-type regulator OxyS responds to oxidative stress and negatively regulates expression of the catalase-peroxidase gene. *PLoS One.*;7(1):e30186.
- Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U. und Schleifer K. H. (1989)** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 65: 299-330
- Ligeza A., Tikhonov A.N., Hyde J.S. und Subczynski W.K. (1998)** Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1365: 453-6
- Liochev S.I., Fridovich I. (1992)** Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;89(13):5892-6.
- Little, J. W., et al. (1994).** Cleavage of LexA repressor. *Methods Enzymol.*244:266–284.
- Liu H., Colavitti R., Rovira I.I., Finkel T. (2005)** Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res.*;97(10):967-74.
- Lu C., Bentley W.E., Rao G. (2003)** Comparisons of oxidative stress response genes in aerobic *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 30;83(7):864-70.
- Lyons T.J., Edie D.J. (2007)** Transport and storage of metal ions in biologie. In: Bertin I., Gray H.B., Stiefel E.I. Valentine J.S., editores *Biological Inorganic chemistry structure and Reaktivty* Sausalito: University Science Books; p. 31-41.
- Macomber L, Eelsey SP, Hausinger RP.(2011)** Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (class II) is the primary site of nickel toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2011 Dec;82(5):1291-300.
- Madian A.G., Regnier F.E. (2010)** Profiling carbonylated proteins in human plasma. *J Proteome Res.*;9(3):1330-43.
- Maisonneuve E., Ducret A., Khoueiry P., Lignon S., Longhi S., Talla E., Dukan S. (2009)** Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS One.*;4(10):e7269.
- Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V., Daly M.J. (2001)** Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65: 44-79
- Massey V., Strickland S., Mayhew S.G., Howell L.G., Engel P.C., Matthews R.G., Schuman M., Sullivan P.A. (1969)** The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36: 891-7

- Meany D.L., Xie H., Thompson L.V., Arriaga E.A., Griffin T.J. (2007)** Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry. *Proteomics*;7(7):1150-63.
- Melville D.B., Otken C.C., Kovalenko V. (1955)** On the origin of animal ergothioneine. *J. Biol. Chem.* 216 (1): 325–31.
- Melville D.B., Ludwig M.L., Inamine E., Rachele J.R. (1959)** Transmethylation in the biosynthesis of ergothioneine. *J. Biol. Chem.* 234 (5): 1195–8.
- Minnikin D. (1982)** The biology of the mycobacteria. *Academic. Pr.* 1: 95-184
- Mirzaei H., Regnier F. (2006)** Creation of allotypic active sites during oxidative stress. *J Proteome Res.*;5(9):2159-68.
- Misra H.S., Khairnar N.P., Barik A., Indira Priyadarsini K., Mohan H., Apte S.K. (2004)** Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS Lett.*;578(1-2):26-30.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007)** Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:459–81
- Møller I.M., Rogowska-Wrzesinska A., Rao R.S. (2011)** Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics*;74(11):2228-42.
- Nakunst D., Larisch C., Hüser A.T., Tauch A., Pühler A., Kalinowski J.(2007)** The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J Bacteriol.*;189(13):4696-707.
- Newton G.L., Fahey R.C. (2002)** Mycothiol biochemistry. *Arch Microbiol.* 2002 Dec;178(6):388-94.
- Newton G.L., Buchmeier N., Fahey R.C. (2008)** Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*;72(3):471-94.
- Newton G.L., Rawat M., La Clair J.J., Jothivasan V.K., Budiarto T., Hamilton C.J., Claiborne A., Helmann J.D., Fahey R.C. (2009)** Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol.* 2009 Sep;5(9):625-7.
- Nicely N.I., Parsonage D., Paige C., Newton G.L., Fahey R.C., Leonardi R., Jackowski S., Mallett T.C., Claiborne A. (2007)** Structure of the type III pantothenate kinase from *Bacillus anthracis* at 2.0 Å resolution: implications for coenzyme A-dependent redox biology. *Biochemistry*;46(11):3234-45. Epub 2007 Feb 27.
- Ochrombel I. (2011)** Untersuchungen zu Mechanismen der Stressantwort und des Kaliumtransportes in *Corynebacterium glutamicum*. Doktorarbeit. Universität zu Köln
- Offermann M.K., McKay M.J., Marsh M.W., Bond J.S.(1984)** Glutathione disulfide inactivates, destabilizes, and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem.*;259(14):8886-91.
- Omumasaba C.A., Okai N., Inui M., Yukawa H. (2004)** *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 8(2):91-103.
- Ong S.E., Mann M. (2007).** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology* 359: 37–52
- von der Osten C.H., Barbas C.F. 3rd, Wong C.H., Sinskey A.J. (1989)** Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* fda gene: structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-bisphosphate aldolase to class I and class II aldolases. *Mol Microbiol.* 3(11):1625-37.
- Park S., You X., Imlay J.A. (2005)** Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx-mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;102(26):9317-22.

- Park J.H., Roe J.H. (2008a)** Mycothiol regulates and is regulated by a thiol-specific antisigma factor RsrA and sigma(R) in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.*;68(4):861-70.
- Park S.Y., Lee S.M., Shin S.W., Park J.W. (2008b)** Inactivation of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by hypochlorous acid. *Free Radic Res.*;42(5):467-73.
- Passos J.F., Saretzki G., von Zglinicki T. (2007)** DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.*;35(22):7505-13.
- Perdivara I., Deterding L.J., Przybylski M., Tomer K.B. (2010)** Mass spectrometric identification of oxidative modifications of tryptophan residues in proteins: chemical artifact or post-translational modification? *J Am Soc Mass Spectrom.*;21(7):1114-7.
- Pomposiello P.J., Demple B. (2001)** Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.*; 19: 109–114.
- Poon H.F., Abdullah L., Reed J., Doore S.M., Laird C., Mathura V., Mullan M., Crawford F. (2007)** Improving image analysis in 2DGE-based redox proteomics by labeling protein carbonyl with fluorescent hydroxylamine. *Biol Proced Online.* 19;9:65-72.
- Pryor W.A. (1982)** Free radical biology: Xenobiotics, cancer, and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 393:1-22.
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. (1999)** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.*;284(5415):805-8.
- Ralsler M., Walmelink M.M., Kowald A., Gerisch B., Heeren G., Struys E.A., Klipp E., Jakobs C., Breitenbach M., Lehrach H., Krobitsch S. (2007)** Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol* 2007, 6:10.
- Rawat M., Av-Gay Y. (2007).** Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (3): 278–92.
- Rosch J.W., Gao G., Ridout G., Wang Y.D., Tuomanen E.I. (2009)** Role of the manganese efflux system mntE for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 72:12-25
- Rowland G. C., Giffard P. M. und Booth I. R. (1984)** Genetic studies of the *phs* locus of *Escherichia coli*, a mutation causing pleiotropic lesions in metabolism and pH homeostasis. *FEBS Letters* 173: 295-300
- Saever L.C., Imlay J.A. (2001)** Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 7173-81
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., ColdSpring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez R.J., Srinivasan C., Munroe W.H., Wallace M.A., Martins J., Kao T.Y., Le K., Gralla E.B., Valentine J.S. (2005)** Exogenous manganous ion at millimolar levels rescues all known dioxygen-sensitive phenotypes of yeast lacking CuZnSOD. *J Biol Inorg Chem.*10:913-23.
- Schell M.A. (1993)** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.*;47:597-626.
- Schlidt K. (2011)** Auswirkungen von oxidativem Stress auf die FBA-Enzymaktivität. Bachelorarbeit Institut für Biochemie Köln AG Krämer
- Schmitt A., Hinkeldey B., Wild M., Jung G. (2009).** Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diaz-a-s-indacene. *J. Fluoresc.* 19 (4): 755–759.

- Seib K.L., Tseng H.J., McEwan A.G., Apicella M.A., Jennings M.P. (2004)** Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. *J Infect Dis.* 190:136-47.
- Seiferling D. (2009)** Physiologische und biochemische Charakterisierung der oxidativen Stressantwort von *Corynebakterium glutamicum*. Bachelorarbeit Institut für Biochemie Köln AG Krämer
- Shacter E. (2000)**. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32:307–26
- Shinkarenko N.V., Aleskovskiji V.B. (1981)** Singlet Oxygen: Methods of Preparation and Detection. *Russian Chemical Reviews*, 50, S. 320–231
- Smythe C.V. (1936)**. The reactions of Iodoacetate and of Iodoacetamide with various Sulfhydryl groups, with Urease, and with Yeast preparations. *J. Biol. Chem.* 114 (3): 601–12.
- von Sonntag C. (1987)** The chemical basis of radiation biology. London: Taylor & Francis 515 p.
- Stackebrandt E., Rainey F. und Ward-Rainey N. (1997)** Proposal of a new hierarchic classification system. *Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491
- Stadtman E.R., Moskovitz J., Levine R.L. (2003)** Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal.*;5(5):577-82. Review.
- Steeves C.H., Potrykus J., Barnett D.A., Bearne S.L. (2011)** Oxidative stress response in the opportunistic oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Proteomics.*;11(10):2027-37.
- Storz G., Imlay J.A. (1999)** Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.*;2(2):188-94.
- Studier F. W. und Moffatt B. A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective highlevel expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130
- Ta P., Buchmeier N., Newton G.L., Rawat M., Fahey R.C. (2011)** Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in *Mycobacterium smegmatis* mutants. *J Bacteriol.*;193(8):1981-90.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 4350-4354
- Tseng H.J., McEwan A.G., Paton J.C., Jennings M.P. (2002)** Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun.* 70:1635-9.
- Valentine J.S. (2007)** Dioxygen reactivity and toxicity. In: Bertini I., Gray H.B., Stiefel E.I., Valentine J.S., editores. *Biological Inorganic Chemistry Structure and Reactivity*. Sausalito: University Science Books; p.31-41
- Velterop J.S., Sellink E., Meulenberg J.J., David S., Bulder I., Postma P.W. (1995)** Synthesis of pyrroloquinoline quinone *in vivo* and *in vitro* and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway. *J Bacteriol.* ;177(17):5088-98.
- Wang S., Deng K., Zaremba S., Deng X., Lin C., Wang Q., Tortorello M.L., Zhang W. (2009)** Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl Environ Microbiol.*;75(19):6110-23.
- Wennerhold J., Bott M.. (2006)** The DtxR regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.*;188(8):2907-18.
- Wiseman H., Halliwell B. (1996)** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313:17–29

- Xu G.Z., Chance M.R. (2005)** Radiolytic modification and reactivity of amino acid residues serving as structural probes for protein footprinting. *Anal. Chem.* 77:4549–55
- Yang YT, Whiteman M, Gieseg SP. (2012)** Intracellular glutathione protects human monocyte-derived macrophages from hypochlorite damage. *Life Sci.*;90(17-18):682-8.
- Yellaboina S., Ranjan S., Chakhaiyar P., Hasnain S.E., Ranjan A. (2004)** Prediction of DtxR regulon: identification of binding sites and operons controlled by Diphtheria toxin repressor in *Corynebacterium diphtheriae*. *BMC Microbiol.* 2004 Sep 24;4:38.
- Zhang YM, Liu JK, Wong TY. (2003)** The DNA excision repair system of the highly radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* is facilitated by the pentose phosphate pathway. *Mol Microbiol.*;48(5):1317-23.
- Zhang L., Yang Q., Luo X., Fang C., Zhang Q., Tang Y. (2007)** Knockout of crtB or crtI gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability. *Arch Microbiol.* 188(4):411-9.
- Zhang T., Ding Y., Li T., Wan Y., Li W., Chen H., Zhou R. A. (2012)** fur-like protein PerR regulates two oxidative stress response related operons dpr and metQIN in *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol.*;12(1):85.
- Zheng M., Aslund F., Storz G. (1998)** Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science.*;279(5357):1718-21.
- Zheng M., Wang X., Templeton L.J., Smulski D.R., LaRossa R.A., Storz G. (2001)** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol.*;183(15):4562-

Danksagung

Herrn Prof. Krämer möchte ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Neben den interessanten und anregenden Diskussionen möchte ich mich auch für sein Engagement bezüglich der Unternehmungen der AG jenseits der Wissenschaft bedanken.

Herr Prof. Flügge danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Gerd Seibold und Kay Marin danke ich für die Betreuung und die konstruktiven Diskussionen.

Meinem Kooperationspartner der AG Poetsch insbesondere Christian Trötschel danke ich für die gute Zusammenarbeit. Der AG Kalinowski und AG Wendisch danke ich für die Bereitstellung verschiedener Mutanten.

Meinen Laborkollegen danke ich für den schönen gemeinsamen Alltag und das entspannte Arbeitsklima. Ich danke Katja dafür, dass sie zu mir in mein kleines Labor gezogen ist und sie inzwischen nicht nur auf der Arbeit sondern auch in meinem Privatleben eine Bereicherung ist. Natalie danke ich dafür, dass sie ein kleiner Sonnenschein ist und einen immer zum mit Lachen anstachelt. Benni danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr hat und für die unerschöpflichen Blotpuffer. Andreas danke ich für seinen trockenen Humor. Anna danke ich dafür, dass nichts sie aus der Ruhe bringt und für die einen oder anderen Häckeltipps. Den Osmo-Jungs Michael, Stan und Markus danke ich für die gute Laune, die sie verbreitet haben. Dem Alex danke ich für seinen reichlichen Vorrat an Süßigkeiten.

Auch allen anderen Kollegen, sowie unseren TAs und Sekretärinnen möchte ich herzlich für den freundlichen und harmonischen Arbeitsalltag, den wir miteinander teilten danken.

Katja Kirsch, Sabine Gläser und Mareike Boos danke ich nicht nur für das Korrekturlesen sondern ganz besonders dafür, dass sie immer für einen da sind und somit die besten Freunde, die man sich wünsche kann.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie: Meiner Mutter Elke und meinem Vater Jürgen, dass sie mich stets bei meinen Entscheidungen unterstützt haben. Meinem Opa Arno, meiner Oma Elisabeth und meinem Onkel Stefan, dass sie mir das alles ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt den beiden Männern in meinem Leben Philipp und Merlin, die mir bei allen Hochs und Tiefs in der Zeit der Doktorarbeit zur Seite standen mich aufgebaut und auf den Boden der Tatsachen zurück geholt haben. Ich liebe euch alle sehr und bin froh, dass ihr Teil meines Lebens seid.

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 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.

Teilpublikationen: kein

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

Datum:

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Carolin Marianne Lange
Geburtsdatum und Ort: 07.09.1983 in Dormagen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Wahlenstr. 32, 50823 Köln

Universitäre Laufbahn:

Juli 2009 – Dezember 2012

Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer.

Thema: „Physiologische und biochemische Untersuchungen zu oxidativem Stress in *Corynebacterium glutamicum*.“

Mai 2008 - April 2009

Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Bonn in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E.A. Galinski.

Thema: „Heterologe Expression des kompatiblen Solute Mannosylglycerat in *Halomonas elongata*.“

Oktober 2003 – Mai 2008

Diplomstudiengang Biologie an der Universität Bonn mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Genetik und Biochemie

Schulische Laufbahn:

August 1994 – Juni 2003

Besuch des Leibniz Gymnasiums in Dormagen, Abschluss: Abitur

Juli 1990 – Juli 1994

Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Köln-Worringen