

**Systemische Analyse
des Citratzyklus in
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jan van Ooyen

aus Frankfurt am Main

März 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. April 2007 bis zum 31. März 2010 am Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH unter der Leitung von Herrn Universitäts-Professor Dr. Michael Bott durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. M. Bott
Institut für Biotechnologie I
Arbeitsgruppe Biochemie
Jülich Forschungszentrum GmbH
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Korreferent: Prof. Dr. H. Sahm
Institut für Biotechnologie I
Jülich Forschungszentrum GmbH

Teile dieser Arbeit erscheinen in folgenden Publikationen:

Citrate synthase in *C. glutamicum* is encoded by two gltA Transcripts which are controlled by RamA, RamB and GlxR

van Ooyen, J., Emer, D., Bussmann, M., Bott, M., Eikmanns, B. J., Eggeling, L.

j. Biotechnol **2010**

(akzeptiert)

Systems biology based exploration of citrate synthase activity and consequences for L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*

Jan van Ooyen, Stephan Noack, Brigitte Bathe, Ralf Kelle, Lothar Eggeling

Mol. Syst. Biol.

(in Vorbereitung)

Systemic analysis of the tricarboxylic acid cycle in *C. glutamicum*

A more holistic view on L-lysine formation is offered by systems biology approaches making use of genome-scale in silico analyses together with metabolic engineering. A genome-scale metabolic model for *C. glutamicum* has recently been generated (Kjeldsen 2009) and optimized. Its analyses, as well as literature data, pointed at citrate synthase (CS) as a promising target to further increase L-lysine yields. Aim of this work was to clarify if a correlation between flux over CS and L-lysine yield as seen in flux balance analyses could be proven experimentally.

This work shows that the CS gene *gltA* of *C. glutamicum* is encoded by two monocistronic transcripts with their transcript initiation sites located 121 bp and 357 bp upstream of the translational start site. Northern blot analyses revealed that the short transcript prevails during growth on acetate, whereas the long transcript is dominant during growth on glucose. Further Experiments revealed that the transcriptional regulators RamA, RamB and the global regulator GlxR are involved in the regulation of *gltA* expression in a complex scenario.

Based on this knowledge the entire upstream region of *gltA* was replaced with significantly reduced transcription activity of a *dapA*-promoter collection. As a result nine mutants were obtained, exhibiting a gradual decrease in the CS specific activity from 32 %, respectively 6 % of the original CS activity. These strains were assayed for their L-lysine formation. Already the reduction of the CS activity to 32 % yielded a significant increase in L-lysine yield from 0.16 to 0.20 g g⁻¹. With a further decrease in the CS activity the yield is further increasing up to 0.32 g g⁻¹ at the lowest CS activity of 6 %. At the same time the growth rate was gradually decreased, showing a correlation between CS activity and L-lysine yield accompanied by a decreased growth rate. Thus, CS can be used as a switch between lysine production on the one hand and biomass formation on the other hand. Using the L-lysine producer DM1933 and lowering its specific CS activity to 10 %, a L-lysine yield of 0.5 g g⁻¹ could be obtained, being the highest yield reported so far.

Global gene expression analyses revealed amongst others that with reduced CS activity genes controlled by RamA and RamB were altered in their expression. Furthermore, quantifications of intracellular metabolite concentrations revealed an increase of glycolytic intermediates, as well as aspartate and aspartate-derived amino acids, at reduced CS activity, whereas citrate, 2-oxoglutarate and proline concentrations decreased.

Extracellular rates of the strains during batch fermentation were determined in bioreactors, showing that the specific rates of glucose uptake and CO₂ production were not affected by reduced CS activity, whereas growth rate was reduced and the L-lysine formation rate nearly doubled. Space time yield obtained were thus up to 35% higher than in the parental strain. Taken together the data show that influencing CS is a very powerful instrument to increase L-lysine, and probably other aspartate derived aminoacids, although systemic consequences are not fully understood.

Systemische Analyse des Citratzyklus in *C. glutamicum*

Ansätze der Systembiologie bieten durch die Nutzung genomweiter *in silico* Analysen in Verbindung mit molekulargenetischen Stammverbesserungen einen vollständigeren Blick auf die L-Lysin Bildung. Ein kürzlich erstelltes genomweites metabolisches Modell von *C. glutamicum* (Kjeldsen 2009) wurde weiter optimiert und vervollständigt. Sowohl die Analyse dieses Modells, als auch Literaturstudien wiesen die Citratsynthase, CS, als vielversprechendstes Ziel der Verbesserung der L-Lysinausbeute von *C. glutamicum* aus. Ziel dieser Arbeit war es die Korrelation zwischen Stofffluss über die CS und L-Lysinausbeute experimentell zu untersuchen und globale Konsequenzen zu studieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Gen der CS, *gltA*, in Form zweier monocistronischer mRNAs transkribiert wird. Die Transkriptionstartpunkte liegen dabei 121 bp und 357 bp strangaufwärts des Startcodons. Durch Northernblotanalysen, Reporterstudien und EMSA konnte dabei ein komplexes Szenario der Regulation von *gltA* durch die Regulatoren RamA, RamB und GlxR aufgezeigt werden.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die beiden Promotoren mitsamt ihrer regulatorischen Regionen gegen Promotoren deutlich reduzierter Stärke aus einer *dapA* Promotorkollektion ersetzt. Als Ergebnis standen neun Stämme mit graduell reduzierter CS-Aktivität zur Verfügung mit einer Bandbreite von 32 – 6 % der CS-Aktivität des Ausgangsstammes. Die Charakterisierung dieser Stämme zeigte, dass bereits die Reduktion auf 32 % der CS-Aktivität in einer signifikanten Steigerung der Lysinausbeute resultiert. Die Stämme mit deutlich stärker reduzierter CS-Aktivität zeigten noch höhere Lysinausbeuten. Bei 6 % der ursprünglichen CS-Aktivität wurde eine Lysinausbeute von 0.32 g g^{-1} festgestellt was gegenüber dem Referenzstamm einer 88 %igen Steigerung entspricht. Gleichzeitig wurde eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate festgestellt. Diese Korrelation zeigt, dass die CS als ein Schalter zwischen Bildung von Biomasse auf der einen und Lysinbildung auf der anderen Seite genutzt werden kann. Die Reduktion der CS-Aktivität auf 10 % in einem besseren Lysinproduzenten führte zu einem Stamm mit einer Lysinausbeute von 0.5 g g^{-1} , was die höchste aller bislang publizierten Lysinausbeuten darstellt.

Die genomweiten Transkriptionsanalysen zeigten, dass unter anderem, vor allem die durch die Regulatoren RamA und RamB regulierten Gene auf die Reduktion der CS-Aktivität reagieren. Die Messung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen zeigte eine teilweise Erhöhung der Metabolite der Glycolyse sowie auch von Aminosäuren der Aspartatfamilie, während die Konzentrationen von Citrat, 2-Oxoglutarat und Prolin reduziert waren.

Die Bestimmung der extrazellulären Raten im Bioreaktor zeigte, dass die spezifische Glucoseaufnahme- und CO_2 -Produktionsrate durch die Verringerung der CS-Aktivität nicht signifikant verändert waren, wohingegen die spezifische Lysinbildungsrate nahezu verdoppelt war. Die Raumzeitausbeute konnte dadurch um 35 % gegenüber dem Ausgangsstamm gesteigert werden. Zusammengefasst ergeben die Daten, dass die Beeinflussung der CS ein außerordentlich effektives Instrument ist um die Synthese von L-Lysin, sowie vermutlich auch weiterer Aminosäuren, zu beeinflussen, und das dabei auch noch nicht ganz verstandene systemische Ursachen zum tragen kommen.

Inhaltsverzeichnis

Titel	Seitenzahl
ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)	6
ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)	7
ABKÜRZUNGEN	12
1. EINLEITUNG	14
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	14
1.2 Biotechnologische Produktion von Lysin	15
1.3 Citratsynthese von <i>C. glutamicum</i>	18
1.4 Systembiologie zum rationalen Stammdesign von <i>C. glutamicum</i>	20
1.5 Aufgabenstellung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Stämme und Plasmide	23
2.1.2 Chemikalien	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Kultivierungsbedingungen und Medien	28
2.2.1.1 Medien	28
2.2.1.2 Kultivierung	29
2.2.1.2 Kultivierung im Bioreaktor	29
2.2.1.2 Stammhaltung	30
2.2.1.2 Bestimmung des Bakterienwachstums	30
2.2.2 Molekulargenetische Methoden	31
2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.2.2.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentration	31
2.2.2.3 Ligationen, Modifikationen und Restriktionsspaltungen von DNA	31
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	32
2.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.2.2.7 DNA Sequenzierungen	34
2.2.2.8 Isolierung von RNA	34
2.2.2.9 Synthese von cDNA	35
2.2.2.10 RNA-ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE)	35

2.2.2.11 Northern Blot	36
2.2.2.12 Genomweite Expressionsanalysen (Microarray)	36
2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten	38
2.2.3.1 Herstellung zellfreier Extrakte	38
2.2.3.1 Proteinbestimmung	38
2.2.3.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten	38
2.2.3.3 Westernblot	39
2.2.4 Quantitative Bestimmung von Metaboliten	40
2.2.4.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand	40
2.2.4.2 Quantitative Bestimmung von Glucose im Kulturüberstand	40
2.2.4.3 Quantitative Bestimmung von organischen Säuren im Kulturüberstand	41
2.2.4.4 Quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolite	41
2.2.4.5 Quantitative Bestimmung extrazellulärer Raten durch ein Prozessmodell	41
3. ERGEBNIS	43
3.1 Charakterisierung der <i>gltA</i> Transkripte	43
3.1.1 Untersuchung der Promotorbereiche von <i>gltA</i>	43
3.1.2 Zwei monocistronische <i>gltA</i> -Transkripte	44
3.1.3 Promotoren und Terminator von <i>gltA</i>	46
3.2 Fkb (NCgl0796) Ein Chaperon der Citratsynthese	47
3.3 Regulation der <i>gltA</i> Transkription in <i>C. glutamicum</i>	48
3.3.1 <i>gltA</i> -Expression bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	49
3.3.2 RamA und RamB regulieren die <i>gltA</i> -Expression	51
3.4 Austausch der <i>gltA</i> -Promotoren	54
3.4.1 Auswahl der <i>dapA</i> -Promotoren	55
3.4.2 Auswirkungen der reduzierten der CS-Aktivität	56
3.4.3 Bildung der CS-Proteine durch die <i>dapA</i> -Promotoren	57
3.4.4 Verringerte CS wirkt sich auf Wachstum und Lysinausbeute aus	58
3.5 Globale Auswirkungen der CS Reduktion	62
3.5.1 Vergleichende genomweite Expressionsanalyse	63
3.5.2 Einfluss von <i>aceA</i> , <i>aceB</i> , <i>pck</i> und <i>odx</i> auf die Lysinausbeute	67
3.5.3 Bestimmung interner Metabolitkonzentrationen	68
3.6 Kohlenstoffbilanzen und Ratenbestimmung	72
3.6.1 Kultivierung der Stämme unter Batch-Bedingungen im Bioreaktor	72
3.7 Supplementation der DM1800-CS- <i>dapA</i> -Promotormutanten	75
3.7.1 Supplementation mit Glutamat, Arginin, Prolin und Citrat	76
3.7.2 Charakterisierung der Prolin-Supplementation von DM1800'C7	77

3.7.3 Vergleich von Prolin- und Betainzugabe bei reduzierter CS-Aktivität	79
3.7.4 Kohlenstoffbilanz und extrazelluläre Raten bei Prolinsupplementation	81
3.8 Bearbeitung weiterer Zielgene zur verbesserten Lysinproduktion	83
3.8.1 Pyruvatdehydrogenase	83
3.8.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	84
4. DISKUSSION	87
4.1 Charakterisierung der gltA (Citratsynthase) Transkription	87
4.2 Promotoraustausch der Citratsynthase	89
4.3 Globale Auswirkungen der Citratsynthasereduktion	90
4.4 Extrazelluläre Flüsse und Kohlenstoffbilanzen	94
4.5 Supplementation der CS-Mutanten	95
4.6 Expression der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	96
5. LITERATURVERZEICHNIS	98
ANHANG	110
DANKSAGUNG	116

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BTM	Biotrockenmasse
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CS	Citratsynthase
CSL	Extrakt aus Maismaische (corn steep liquor)
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
Da	Dalton
<i>dapA</i>	Dihydrodipicolinatsynthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMSA	<i>Electromobility shift assay</i>
F	Farad (Kapazität)
G	Guanin
g	Gramm
G6PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen (<i>kilo bases</i>)
<i>lac</i>	Lactose
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molarität [mol/L]

Min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nt	Nukleotid
OD _x	Optische Dichte gemessen bei x nm
OADHC	2-Oxosäuredehydrogenase
OGDH	2-Oxoglutaratdehydrogenase
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p.a.	Per Analysis (Reinheitsgrad der Chemikalien)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPCTI	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase
PPP	Pentosephosphatweg (<i>pentosephosphate pathway</i>)
RBS	Ribosomenbindestelle
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
SDS	Natriumdodecylphosphat (<i>sodium dodecylphosphate</i>)
T	Thymin
TCA	Citratzyklus (<i>tricarboxylic acid pathway</i>)
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin-Hydrochlorid
<i>tet</i>	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	spezifische Enzymaktivität (<i>units</i>) [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1 *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum, wurde 1957 von Udaka und Kinoshita bei der Suche nach einem Glutamat-Produzenten in Japan aus einer Bodenprobe isoliert (Kinoshita 1957). Es ist ein schnell wachsendes, grampositives, unbewegliches, nicht sporenbildendes Biotin-auxotrophes Eubacterium aus der Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten. *C. glutamicum* ist eng verwandt mit Bakterien der Gattungen *Gordonia*, *Nocardia* und *Mycobacterium* (Pascual 1995). Namensgebendes Merkmal von *C. glutamicum* ist die keulenförmige Gestalt einiger *Corynebacteriaceae* und die Fähigkeit zur Produktion von L-Glutaminsäure (Kinoshita 1957) in Minimalmedien.

Zusammen mit seinen Subspezies *C. flavum* und *C. lactofermentum* zählt *C. glutamicum* zu den für die industrielle Produktion von Aminosäuren bedeutendsten Mikroorganismen (Kircher 1998, Liebl 1991, Sahm 1999). Die relevantesten biotechnologischen Produkte, welche unter anderen mit *C. glutamicum* hergestellt werden, sind L-Glutaminsäure mit einer weltweiten Jahresproduktion von etwa 1.800.000 Tonnen und L-Lysin mit etwa 850.000 Tonnen bei einer steigenden Nachfrage von 5-7% jährlich (Leuchtenberger 2005, Nakamura 2007). Des Weiteren werden je etwa 70.000 t L-Threonin, sowie 500 t der Aminosäuren L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin jährlich produziert (Blombach 2007a, Leyval 2003). Verwendung finden diese Aminosäuren als Zusätze in Infusionslösungen, Nahrungsmitteln oder Tierfutter, und ebenso werden sie als Vorstufen in der chemischen Synthese von beispielsweise Herbiziden eingesetzt.

Neben den biotechnologischen Anwendungen dient *C. glutamicum* als Modellorganismus zur Erforschung von pathogenen Verwandten wie *C. diphtheriae* und auch *Mycobacterium (leprae* und *tuberculosis)* (Gande 2004, Gibson 2003). Diese Arten sind häufig nur unter deutlich größerem Aufwand kultivierbar, wachsen erheblich langsamer und können nur in Laboren der Sicherheitsstufen S2 bzw. S3 untersucht werden. Der einzigartige Zellwandaufbau ist eine Besonderheit der *Corynebacterineae*. Obwohl sie zu den grampositiven Bakterien zählen, wird die Zellwand aufgrund der gebildeten Mykolsäuren von einer Art zweiten Lipidschicht umgeben (Lechevalier 1971). Diese tragen zu der stark hydrophoben Hülle dieser Gattungen bei, was als möglicher Pathogenitätsfaktor der pathogenen Arten angesehen wird, da sie eine weitere Barriere gegen Antibiotika darstellt. Die Einzigartigkeit des Aufbaus dieser Zellhülle und dessen Verständnis bietet Möglichkeiten zur Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotika.

1.2 Biotechnologische Produktion von Lysin

Während L-Glutamat vorwiegend als Aromastoff in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird handelt es sich bei L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin um essentielle Aminosäuren, die von Säugetieren nicht synthetisiert werden können. Diese müssen sie in ausreichender Menge mit ihrer Nahrung zu sich nehmen. Die essentiellen Aminosäuren finden vorwiegend in Futtermitteln für die Tiermast Verwendung. So ist L-Lysin in der Schweine- und Hühnermast die zweite limitierende Aminosäure. Durch die Aminosäurezugabe im Futter wird zudem durch die Tiere weniger Stickstoff ausgeschieden da das Futter effektiver aufgenommen wird. Insgesamt werden weltweit etwa 800.000 Tonnen Lysin zu einem Marktpreis von 2 \$/Kg hergestellt, was einem Gesamtmarkt von 1,6 Mrd. \$ jährlich entspricht.

Während L-Glutamat und L-Lysin häufig mit modifizierten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden findet die Produktion von L-Threonin vorwiegend mit *Escherichia coli* statt. Beide Organismen haben verschiedene Vor- und Nachteile, welche zu einer Art Wettbewerb in der Verwendung der Organismen für die biotechnologischen Produktion von Aminosäuren vor allem bei L-Lysin geführt haben. So weist *E. coli* eine deutlich höhere thermische Toleranz auf, sodass der Energiebedarf während des Fermentationsprozesses zur Kühlung geringer ist. Aufgrund der von *E. coli* sekretierten Enterotoxine muss die jeweilige Aminosäure aber kostspielig in mehreren Schritten aufgereinigt werden (Rieping 2006). Im Gegensatz hierzu können *C. glutamicum* Zellen aufgrund der Einstufung als GRAS-Organismus (generally recognized as safe) lediglich inaktiviert werden, um sie zusammen mit der produzierten Aminosäure als Futtermittelzusatz zu verwenden (Rieping 2006). Dies stellt einen Vorteil bei der Produktion aufgrund wegfallender Aufreinigungsschritte dar. Die Wahl des Organismus zur Produktion einer Aminosäure ist häufig auch der Erforschung und damit den Patenten des Unternehmens für einen der beiden Organismen untergeordnet (Evonik, pers. Mitteilung).

Die Lysinbiosynthese in *C. glutamicum* verläuft analog zu anderen Bakterien vom Oxalacetat und Aspartat über den Diaminopimelatweg (Abbildung 1.1) und gehört damit zu den Aminosäuren der Aspartatfamilie wie Aspartat, Asparagin, Threonin, Methionin, Isoleucin. Nach der Transaminierung von Oxalacetat durch die Aspartataminotransferase (*aspC*) wird das erhaltene Aspartat durch die Aspartatkinase (*lysC*) zu Aspartylphosphat phosphoryliert und unter NADPH-Verbrauch zu Aspartatsemialdehyd umgewandelt. Aspartatsemialdehyd ist das Edukt für drei weitere Aminosäuren, Methionin, Threonin und Isoleucin. Die Dihydrodipicolinat-Synthase (*dapA*) katalysiert die Reaktion von Aspartatsemialdehyd zu L-2,3-Dihydrodipicolinat, welches in Abhängigkeit der verfügbaren Stickstoffquelle über verzweigte Biosynthesewege (Sonntag 1993) zu D,L-Diaminopimelat umgesetzt wird. In einem letzten Schritt entsteht mit Hilfe der Diaminopimelat-Decarboxylase

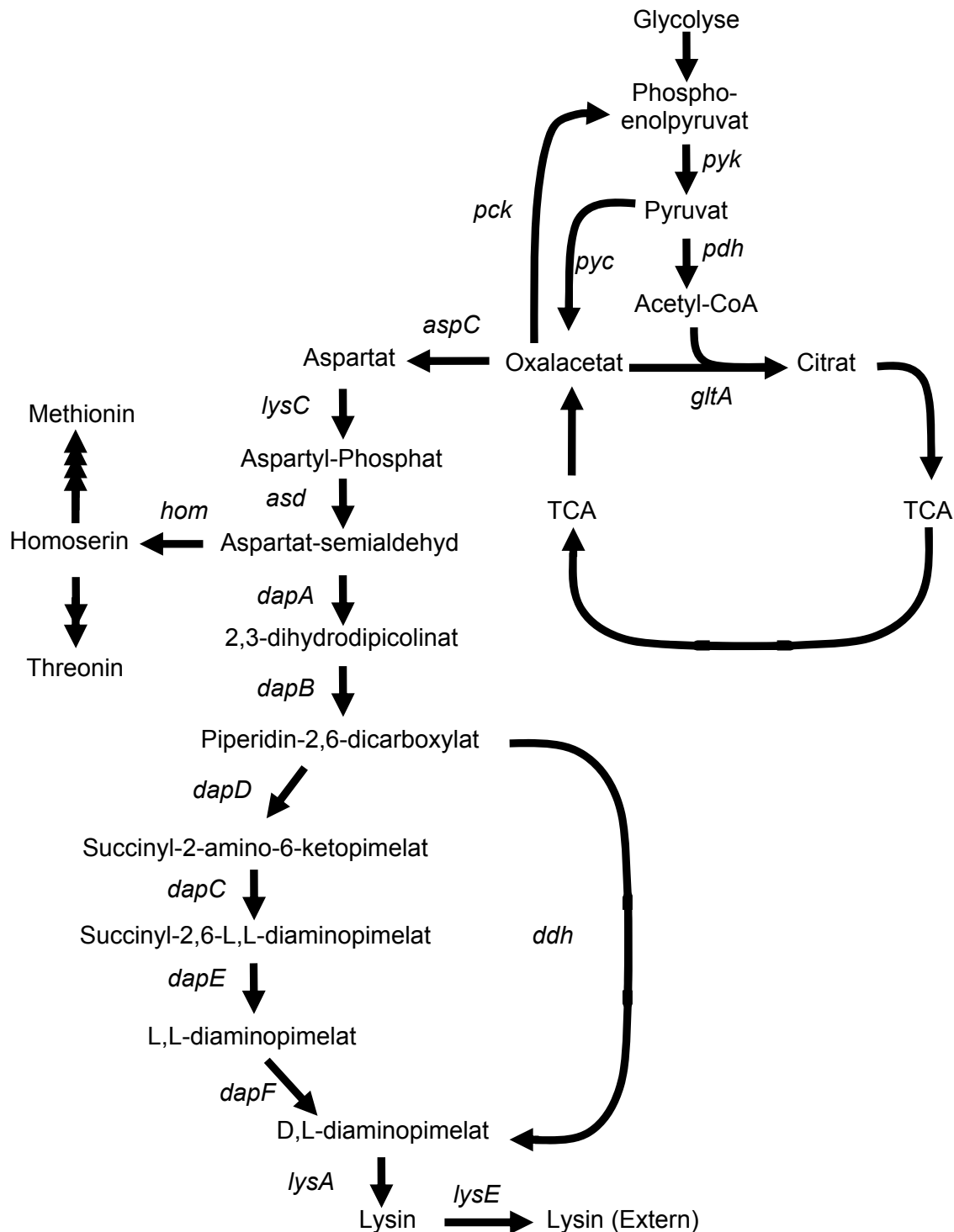


Abb. 1.1 Lysinbiosynthese in *C. glutamicum*

Angegeben sind die Genbezeichnungen für die Gene des Diaminopimelatwegs, sowie die Intermediate (Schrumpf 1991).

pyk Pyruvatkinase; *pck* Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; *pyc* Pyruvat-Carboxylase; *aspC* Aspartat-Aminotransferase; *lysC* Aspartatkinase; *asd* Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase; *dapA* Dihydrodipicolinat-Synthase; *dapB* Dihydrodipicolinat-Reduktase; *dapD* Tetra-hydrodipicolinat-Succinylase; *dapC* N-Succinyl-Aminoketopimelat-Transaminase; *dapE* N-Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase; *dapF* Diaminopimelat-Epimerase; *lysA* Diaminopimelat-Decarboxylase; *lysE* Lysinexporter; *ddh* Diaminopimelat-Dehydrogenase; *hom* Homoserin-Dehydrogenase

(*lysA*) L-Lysin. Hinzu kommt dass *C. glutamicum* über den hocheffizienten Exporter für L-Lysin LysE verfügt (Vrjic 1996). Dieser wird durch den divergent transkribierten Regulator LysG reguliert, der die *lysE*-Expression in Anwesenheit von Lysin verstärkt (Bellmann 2001). *C. glutamicum* ist nicht wie *E. coli* in der Lage L-Lysin weiter zu verstoffwechseln und ist in der Natur bei Wachstum mit Peptiden oder Proteinen darauf angewiesen Lysin aus der Zelle zu schleusen. Beides sind Vorteile für die biotechnologische Produktion von Lysin mit *C. glutamicum*.

Enzyme der Aminosäurebiosynthesewege sind häufig durch Feedback Mechanismen auf den Ebenen der Transkription, Translation oder durch Enzyminteraktion inhibiert. Die Lysinbiosynthese in *C. glutamicum* ist in verschiedenen Punkten kontrolliert: So wird das Enzym Aspartatkinase (*lysC*) konzentriert von L-Lysin und L-Threonin allosterisch gehemmt, jedoch nicht wie in *E. coli* auf Expressionsebene reprimiert (Kalinowski 1991, Richaud 1980). Klassische Lysinproduzenten wurden durch Selektion mit Aminosäureanaloga und Zufallsmutagenese erhalten. Auf diese Weise sind eine Vielzahl publizierter und patentierter Mutationen von *lysC* identifiziert worden (Kalinowski 1991, Ohnishi 2002, Thierbach 1990). Stämme, die auf diese Weise ihre Feedback-Kontrolle über die Biosynthese verlieren, produzieren die betreffende Aminosäure konstitutiv. In den genutzten Stämmen beispielsweise führt bereits der Aminosäureaustausch *lysCT311I*, durch eine Punktmutation im Genom von *C. glutamicum* zu einem Lysin ausscheidenden Stamm. Der Verzweigungspunkt beim Aspartatsemialdehyd ist ferner entscheidend für die Lysinproduktion in *C. glutamicum*. So führt die verstärkte Expression der in *C. glutamicum* nicht regulierten Dihydrodipicolinatsynthase zu einem deutlichen Anstieg der Lysinproduktion (Eggeling 1998). Ebenso konnte dies aber auch durch verringerte Aktivität der Homoserindehydrogenase (*hom*) erreicht werden (Cremer 1988, Ohnishi 2002). In durch klassische Selektion entstandenen Stämmen können auch Auxotrophien für verwandte Aminosäuren zur Produktivität beitragen (Nakayama 1978). Diese unterliegen für den industriellen Prozess einer Kosten-Nutzen-Abwägung.

Bereits in den 1980er Jahren wurde damit begonnen *C. glutamicum*-Stämme mit molekulargenetischen und biochemischen Methoden zu charakterisieren und zu optimieren, um die Produktionseffizienz für verschiedene Aminosäuren zu steigern (Katsumata 1984, Ozaki 1984, Santamaria 1985).

Durch Erkenntnisse aus dem Stoffwechsel und später der Genomsequenz von *E. coli* (Blattner 1997) sowie der seit 7 Jahren zur Verfügung stehenden Genomsequenz von *C. glutamicum* (Kalinowski 2003) ist mittlerweile eine rationalere Herangehensweise durch gerichtete Eingriffe in das Genom für die weitere Verbesserung der Lysinproduzenten verbreitet. Diese kann jedoch bislang noch nicht auf die durch die Zufallsmutagenese gewonnenen Erkenntnisse verzichten. Mutationen, die identifiziert wurden, werden so in definierte Lysinproduzenten eingebracht und auf ihre Auswirkung hin untersucht.

C. glutamicum ist im Gegensatz zu *E. coli* oder *B. subtilis* mit zwei Enzymen ausgestattet die Phosphoenolpyruvat (PEP) bzw. Pyruvat zu Oxalacetat durch Carboxylierung, umwandeln sowie mit zwei Enzymen, die durch Decarboxylierungs-Reaktionen Oxalacetat zu PEP bzw. Pyruvat umwandeln. Für einige dieser Gene konnten Einflüsse auf die Lysinbiosynthese nachgewiesen werden. So erhöht sich mit Verstärkung der Expression des Pyruvat-Carboxylase-Gens (*pyc*) die Lysinproduktion deutlich (Peters-Wendisch 2001). Gleiches gilt, wenn auch in geringerem Maße, für die Verstärkung der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*ppc*)-Expression (O'Regan 1989). Für die PEP-carboxykinase konnte hingegen gezeigt werden, dass die verstärkte Expression zu einer Verringerung der Lysinproduktion führt, während die Deletion zu einem deutlichen Anstieg der Produktion führt (Petersen 2001). Für das vierte Enzym in dieser Gruppe, die Oxalacetatdecarboxylase (*odx*) konnte trotz deutlicher Aktivität *in vitro* (Jetten 1995), bislang kein Effekt auf die Lysinausbeute festgestellt werden.

Neben dem erhöhten Kohlenstofffluss in Richtung der Lysinbiosynthese muss ebenso die Regeneration des erhöhten Bedarfs an Reduktionsäquivalenten für die Lysinbiosynthese beachtet werden. Für die Biosynthese von Lysin aus Oxalacetat werden insgesamt vier Moleküle NADPH benötigt. Dieses wird beispielsweise durch einen erhöhten Fluss im Pentosephosphatweg (PPP) regeneriert (Marx 1999).

Interessanterweise führt auch die Limitierung der Wachstumsrate in kontinuierlichen Kulturen (Chemostat) durch die Limitierung von essentiellen Substraten wie beispielsweise Phosphat oder Glucose zu einer Verbesserung der Lysinproduktion in *C. glutamicum* (Coello 1992).

Der Fokus der Stammoptimierung liegt vor allem bei den Biosynthesewegen der jeweiligen Aminosäure, während Eingriffe in den Zentralstoffwechsel seltener sind. Basierend auf einer Publikation der Kyowa Hakko Ltd. (Ohnishi 2002) wurden vom Kooperationspartner Evonik verschiedene Lysinproduktionsstämme erstellt und den Kooperationspartnern des Sysmap Konsortiums (BMBF Projekt 0313704) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurde dabei vorwiegend der Stamm DM1800 genutzt, der eine Lysinausbeute von etwa 16 % $\text{g}_{\text{Lysin}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ zeigt. In einigen Versuchen wurde zusätzlich der Stamm DM1933 mit einer Lysinausbeute von etwa 35 % $\text{g}_{\text{Lysin}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ genutzt.

1.3 Citratsynthase von *C. glutamicum*

Die Citratsynthase (CS) ist das Schlüsselenzym am Beginn des Citratzyklus und wird in *C. glutamicum* durch das Gen *gltA* codiert. Die CS katalysiert die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat unter Freisetzung von Coenzym-A. Sie ist in *C. glutamicum* sowohl genetisch als auch biochemisch bereits gut charakterisiert (Eikmanns 1994). Der offene Leserahmen von *gltA* beinhaltet 1314 bp, die für 437 Aminosäuren codieren was zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von 49 KDa führt. Anders als in gramnegativen

Bakterien wie *E. coli*, welche über CS vom Typ-II verfügen, die einzigartig für diese Organismengruppe ist (Weitzman 1968), handelt es sich bei *C. glutamicum* um eine CS des Typ-I, die in Eukaryoten, Archaea, und grampositiven Bakterien vorkommt. Durch Größenausschlusschromatographie konnte gezeigt werden, dass sich in *C. glutamicum* ein Homotetramer zu bilden scheint (Radmacher 2007), während für die subspezies *C. glutamicum* ssp. *flavum* die Bildung eines Homodimers publiziert wurde (Shiio 1977), welches der für CS des Typ-I üblicheren aktiven Form entspricht. Für die Typ-II CS konnte gezeigt werden, dass sie auf Enzymebene durch verschiedene Metabolite reguliert sind. So wird die CS in *E. coli* durch erhöhte Konzentrationen von NADH und 2-Oxoglutarat allosterisch gehemmt, was zu einer Feedback-Hemmung führt (Danson 1973). CS vom Typ-I wie in *C. glutamicum* sind hingegen insensitive gegenüber NADH und 2-Oxoglutarat (Higa 1976). Durch die strukturelle Ähnlichkeit zum Acetyl-CoA zeigen alle CS eine kompetitive bzw. semikompetitive Hemmung durch ATP. In *C. glutamicum* kann die Konzentration von 5 mM ATP, bei entsprechend geringerer Acetyl-CoA Konzentration, bereits eine deutliche Inhibierung (50%) der CS-Aktivität zur Folge haben. Dies entspricht einer durchaus üblichen internen ATP Konzentration in *C. glutamicum* Zellen bei exponentiellem Wachstum mit Glucose.

Für *C. glutamicum* wurde gezeigt, dass bei Wachstum mit Acetat die spezifische CS-Aktivität etwa 1,5-fach höher ist als bei Wachstum mit Glucose (Eikmanns 1994). Ebenso wurde gezeigt, dass der Stofffluss über die CS bei Wachstum mit Acetat höher ist als bei Wachstum mit Glucose (Wendisch 2000). Beides ist ein Hinweis darauf, dass der Stofffluss über CS über deren Menge in der Zelle kontrolliert wird. Trotz einiger Hinweise auf die Regulatoren RamA, RamB und GlxR (Cramer 2006, Gerstmeir 2004, Han 2008a) wurde bislang eine Regulation der *gltA* Expression nicht gezeigt. Anders als *Bacillus subtilis*, bei dem zwei CS-Gene vorliegen (Jin 1994a, Jin 1994b), existiert in *C. glutamicum* nur ein einziges Gen für die CS, *gltA*. Dieses wird als monocistronische mRNA transkribiert (Eikmanns 1994). Zusätzlich zur CS existieren in *C. glutamicum* zwei paraloge Gene *prpC1* und *prpC2*, die für Methylcitratsynthasen codieren. Eine davon wird für das Wachstum mit Propionat benötigt in dem Propionyl-CoA, mit Oxalacetat zu Methylcitrat kondensiert wird (Claes 2002), das dann weiter verstoffwechselt wird. Die Funktion der zweiten Methylcitratsynthase ist unbekannt. Beide Enzyme zeigen jedoch Seitenaktivität mit Acetyl-CoA (Radmacher 2007) und können damit unter Umständen die CS-Aktivität übernehmen. Beide Gene werden bei Wachstum mit Glucose reprimiert (Claes 2002). Für einige Stämme, die durch Zufallsmutagenese und klassische Selektion auf Lysinproduktion erhalten wurden konnte gezeigt werden, dass die spezifische CS-Aktivität gegenüber dem Wildtyp verringert war (Shiio 1982). Ein solcher Zusammenhang konnte ebenfalls durch Deletion von *gltA* und Selektion auf Suppressormutationen durch die Seitenaktivität der Methylcitratsynthase *prpC2* gezeigt werden (Radmacher 2007).

1.4 Systembiologie zum rationalen Stammdesign von *C. glutamicum*

Für das Verständnis des Stoffwechsels von *C. glutamicum* geht es darum Mechanismen und Reaktionen, die in Teilen sehr gut untersucht sind, wie die enzymatischen Reaktionen des Zentralstoffwechsels, nicht als einzelne Reaktion, sondern als Gesamtreaktion eines Netzwerks der Einzelreaktionen zu betrachten. Ein Ziel ist es prediktive Modelle vor allem zur Optimierung von biotechnologischen Anwendungen zu nutzen, wie sie für die Produktion von Threonin mit *E. coli* bereits gezeigt werden konnten (Lee 2007). Der erste Schritt ist hierbei die Erstellung eines genomweiten metabolischen Netzwerks durch die Kombination der Informationen aus dem annotierten Genom und den verfügbaren experimentellen Daten, sowie aus der Literatur. Diese Art von Modellen wurden für *Saccharomyces cerevisiae* (Forster 2003), *Escherichia coli* (Reed 2003), *Lactococcus lactis* (Oliveira 2005), *Staphylococcus aureus* (Heinemann 2005), *Streptomyces coelicolor* (Borodina 2005), *Helicobacter pylori* (Schilling 2002), *Haemophilus influenzae* (Schilling 2000), *Methanosarcina barkeri* (Feist 2006), *Lactobacillus plantarum* (Teusink 2006) und auch *C. glutamicum* (Kjeldsen 2009, Shinfuku 2009) erstellt. Zunächst wird hierbei ein grobes Modell mit den Massenbilanzen der katabolen Reaktionen zur Bildung der einzelnen Metabolite verwendet. Im Anschluss werden die Reaktionen definiert zur Bildung von Polymeren, Biomasse und Energiebedarf. Im dritten Schritt werden dann zusätzlich benötigte Reaktionen eingeführt, sowie eventuell die Richtung der einzelnen Reaktionen festgelegt (Reversibilität) (Kjeldsen 2009). Im Schwesterinstitut IBT-2 wurde durch Stefan Noack das Kjeldsen-Netzwerk erweitert, um als Werkzeug zum weiteren Verständnis des Systems *C. glutamicum* genutzt werden zu können. Abbildung 1.3 zeigt die Visualisierung der Stoffflüsse für das Modell bei unterschiedlichen Optimierungskriterien mit dem Omix-Tool des IBT-2. Für die Simulationen wurde eine für *C. glutamicum* übliche Glucoseaufnahme ($4\text{-}5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von $4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ angesetzt. Für das Optimierungskriterium Wachstum (Abb. 1.2 A) werden die Stoffflüsse so über das Netzwerk verteilt, dass der Bedarf der Biomassegleichung möglichst effektiv erfüllt ist. Das Modell zeigt hierbei eine Wachstumsrate von $0,36 \text{ h}^{-1}$, die somit entweder von *C. glutamicum* bei Wachstum mit Glucose von $0,4^{-1}$ entspricht. Der Fluss über die CS beträgt in diesem Fall etwa 92% der Glucoseaufnahmerate, während der Fluss über den Pentosephosphatweg (PPP) sehr gering ist. Für die Optimierung der Stoffflüsse in Richtung Lysinbiosynthese (Abb. 1.2 B) zeigt das Modell eine Ausbeute von $75\% \text{ mol}_{\text{Lysin}}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ welches der höchsten theoretischen Lysinausbeute in *C. glutamicum* entspricht (Kjeldsen 2009). Dabei wird jedoch keine Biomasse gebildet. Der Fluss über die CS beträgt in diesem Fall ebenfalls 0 der Fluss über den PPP beträgt jedoch etwa 250 % der Glucoseaufnahmerate. Der Fluss über den PPP deckt dabei den hohen Bedarf an NADPH für die Lysinbiosynthese.

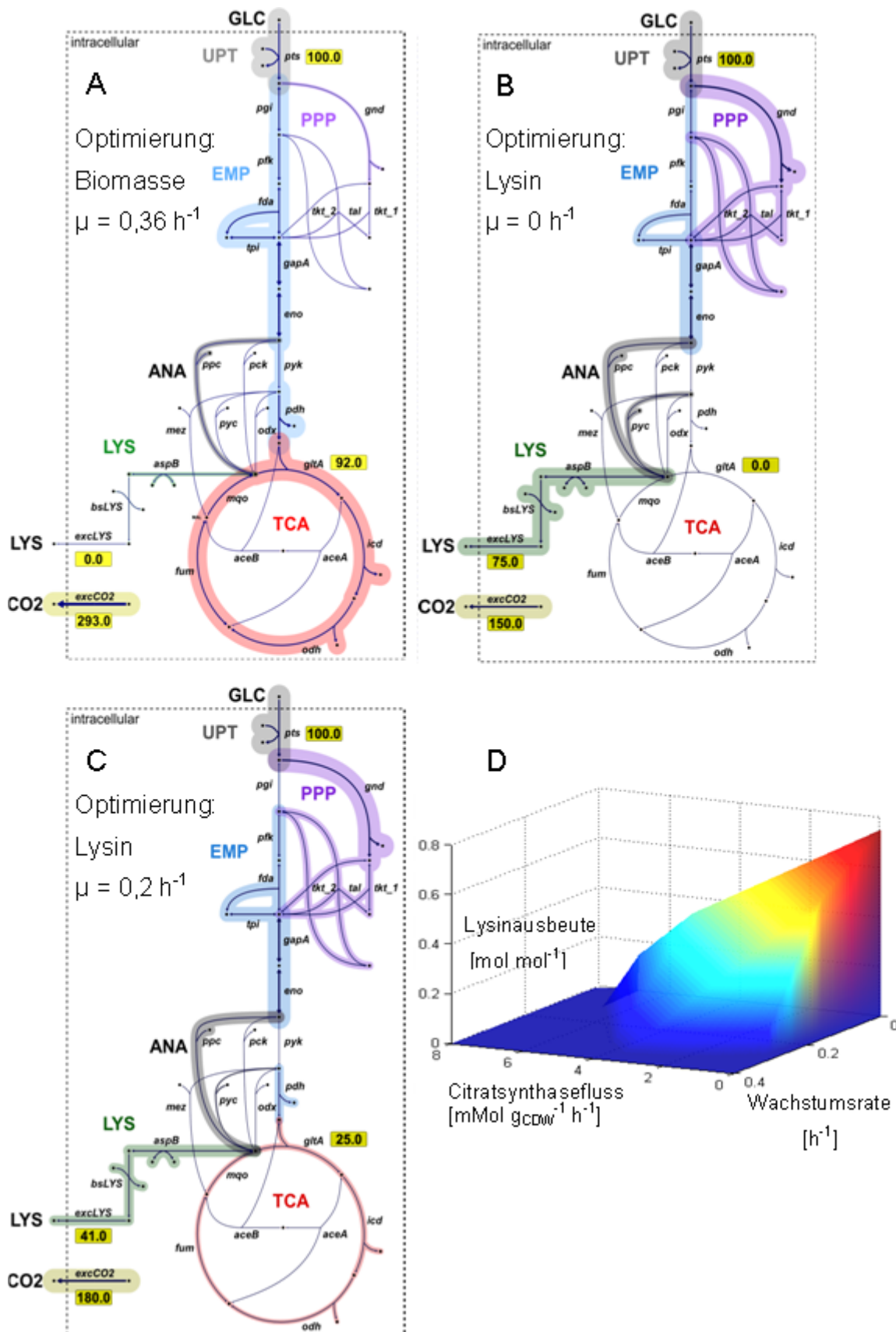


Abb. 1.2 Flussbilanzanalyse mit verschiedenen Optimierungskriterien

Bei einer fixierten Glucoseaufnahme von $4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde in **A** die Wachstumsrate optimiert, in **B** die Lysinausbeute optimiert und in **C** die Lysinausbeute bei einer Wachstumsrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$. **D** zeigt den Zusammenhang zwischen Lysinausbeute, Citratsynthesefluss und Wachstumsrate im Modell.

Bei einer Optimierung in Richtung der Lysinbiosynthese unter der Vorgabe, dass die Wachstumsrate $0,2\text{h}^{-1}$ betragen muss (Abb. 1.2 C), zeigt sich eine Ausbeute von $41\% \text{ mol}_{\text{Lysin}}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$. Unter diesen Bedingungen beträgt der Fluss über CS etwa 25% der Glucoseaufnahme während der Fluss über den PPP 180% beträgt. Weitere Untersuchungen zu möglichen Lösungsräumen für variierte Wachstumsraten und CS-Flüsse zeigten eine deutliche Korrelation zur Lysinausbeute (Abb. 1.2 D). Im Modell wird deutlich, dass die CS einen Schalter zwischen Lysinproduktion und Biomasseproduktion darstellt. Ebenso zeigt das Modell unter den gegebenen Flusslagen, dass der Verlust an Kohlenstoff durch die CO_2 Produktion durch den verringerten Fluss über den TCA geringer ist. Bei Optimierung für Wachstum (Abb. 1.2 A) beträgt die CO_2 Produktion $293\% \text{ mol}_{\text{CO}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$, was etwa 50% der aufgenommenen Glucose entspricht und damit ein typischer Wert für *C. glutamicum* ist. Bei der für Lysinbiosynthese optimierten Simulation unter der Vorgabe, dass die Wachstumsrate $0,2\text{h}^{-1}$ betragen muss (Abb. 1.2 C), werden nur noch $180\% \text{ mol}_{\text{CO}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ produziert dieser Kohlenstoff fließt hierbei in die Lysinbiosynthese. Insgesamt zeigt die Analyse dass zur Optimierung der Lysinbiosynthese die CS das vielversprechendste Ziel darstellt, da der Stofffluss über die CS die Abzweigung zwischen Biomassebildung und Lysinbildung ist (Abb. 1.2 D).

1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die eingehende Charakterisierung der Citratsynthase (CS) in *C. glutamicum* und ihres Einflusses auf die Lysinbildung, sowie die Auswirkungen der Verringerung der CS-Aktivität auf das System Zelle. Hierzu sollten regulatorische Mechanismen der Transkription des CS-Strukturgens *gltA*, aufgedeckt werden. Der Fokus lag dabei auf dem Promotorbereich von *gltA*. Mit Kenntnis der für die Transkription von *gltA* wichtigen Bereiche sollten diese durch Promotoren unterschiedlicher Stärke ersetzt werden. Für den entstandenen Stammsatz mit gradueller *gltA*-Expression sollte dann die spezifische CS-Aktivität ermittelt und ihr Einfluss auf Wachstum und Lysinproduktion untersucht werden. Hierzu sollten diese genetischen Veränderungen sowohl in den schwachen Lysinproduzenten DM1800 als auch in den besseren Lysinproduzenten DM1933 eingebracht werden. Durch Nutzung genomweiter Expressionsanalysen (Transcriptomics) sowie durch Bestimmung interner Metabolit-Konzentrationen (Metabolomics) sollten globale Auswirkungen auf die Zelle und mögliche weitere Ansatzpunkte zur Optimierung der Produktion von Aminosäuren der Aspartatfamilie in *C. glutamicum* identifiziert werden. Als zusätzliches Optimierungswerkzeug sollte hierzu das von Stefan Noack weiterentwickelte genomweite metabolische Netzwerk von K. Kjeldsen (Kjeldsen 2009) genutzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 und die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp	(Abe 1967)
ATCC13032 Δ <i>ramA</i>	Deletion von <i>ramA</i> (NCgl2472)	
ATCC13032 Δ <i>ramB</i>	Deletion von <i>ramA</i> (NCgl0358)	
ATCC13032 Δ P <i>gltA</i> 160	ATCC13032 mit Deletion von 160 bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795, 1. Promotor)	diese Arbeit
DM1800	ATCC13032 <i>pycP458S/lysCT311I</i>	(Georgi 2005)
DM1800 Δ <i>prpC1</i> Δ <i>prpC2</i> (DM1800')	DM1800 mit Deletion von NCgl0630 und NCgl0666	(Radmacher 2007)
DM1800' Δ P <i>gltA</i> 160	DM1800' mit Deletion von 160 bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795, 1. Promotor)	(Radmacher n. v)
DM1800' Δ P <i>gltA</i> 540 (DM1800'')	DM1800' mit Deletion von 540 bp vor <i>gltA</i> (2 Promotoren)	(Radmacher n. v)
DM1800'A8	DM1800' chromosomaler Austausch von 540bp des <i>gltA</i> -Promotors gegen 250bp des <i>dapA</i> -Promotors mit -10-Region A8 (siehe Tab. 3.4) (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'A14	siehe DM1800'A8 -10-Region A14 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'A16	siehe DM1800'A8 -10-Region A16 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'A23	siehe DM1800'A8 -10-Region A23 (Vasicova 1999)	diese Arbeit

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
DM1800'A25	siehe DM1800'A8 -10-Region A25 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'B6	siehe DM1800'A8 -10-Region B6 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'C5	siehe DM1800'A8 -10-Region C5 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'C7	siehe DM1800'A8 -10-Region C7 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800'L1	siehe DM1800'A8 -10-Region L1 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1800' Δpck	DM1800' mit Deletion von <i>pck</i> (NCgl2765)	diese Arbeit
DM1800' Δodx	DM1800' mit Deletion von <i>odx</i> (NCgl1241)	diese Arbeit
DM1800' $\Delta aceAB$	DM1800' mit Deletion von <i>aceA</i> und <i>aceB</i> (NCgl2248 und NCgl2247)	diese Arbeit
DM1800'C7 Δpck	DM1800''C7 mit Deletion von <i>pck</i> (NCgl2765)	diese Arbeit
DM1800'C7 Δodx	DM1800''C7 mit Deletion von <i>odx</i> (NCgl1241)	diese Arbeit
DM1800'C7' $\Delta aceAB$	DM1800''C7 mit Deletion von <i>aceA</i> und <i>aceB</i> (NCgl2248 und NCgl2247)	diese Arbeit
DM1800' Δfkb	DM1800' mit Deletion von <i>fkb</i> (NCgl0796)	diese Arbeit
DM1800'sucB Δ L1,2	DM1800' <i>aceFK43Q,K162Q</i> (NCgl2126)	diese Arbeit
DM1800'sucB Δ L2,3	DM1800' <i>aceFK162Q,K278Q</i> (NCgl2126)	diese Arbeit
DM1933	ATCC13032 <i>pycP458S2xlysCT311I</i> <i>homV59AΔpck2xlysE</i> <i>2xlysOP(dapA,dapB,asd,lysA,ddh)</i>	(Blombach 2009) Evonik
DM1933 $\Delta prpC1$	DM1933 mit Deletion von NCgl0630	diese Arbeit
DM1933 $\Delta prpC1\Delta prpC2$ (DM1933')	DM1933 mit Deletion von NCgl0630 und NCgl0666	diese Arbeit

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
DM1933'A8	DM1933' chromosomaler Austausch von 540bp des <i>gltA</i> -Promotors gegen 250bp des <i>dapA</i> -Promotors mit -10-Region A8 (siehe Tab. 3.4) (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''A14	siehe DM1933'A8 -10-Region A14 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''A16	siehe DM1933'A8 -10-Region A16 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''A23	siehe DM1933'A8 -10-Region A23 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''A25	siehe DM1933'A8 -10-Region A25 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''B6	siehe DM1933'A8 -10-Region B6 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''C5	siehe DM1933'A8 -10-Region C5 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''C7	siehe DM1933'A8 -10-Region C7 (Vasicova 1999)	diese Arbeit
DM1933''L1	siehe DM1933'A8 -10-Region L1 (Vasicova 1999)	diese Arbeit

Escherichia coli

XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene (LaJolla, USA)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DH5α	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA⁻argF) U169φ80dlacZΔM15</i>	Bethesda Research Laboratories

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Marker

Plasmid	Marker / Eigenschaften	Referenz
pUC18	Leervektor zur Genexpression in <i>E. Coli</i> (ori ^{pUC18} , amp ^R , P ^{tac})	(Yanisch-Perron 1985)
pET2	Promotor-Testvektor in <i>C. Glutamicum</i> (kan ^R , CAT-Reporter gen)	(Vasicova 1998)

Plasmid	Marker / Eigenschaften	Referenz
pET2-PdapA-A8	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region A8	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-A14	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region A14	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-A16	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region A16	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-A23	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region A23	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-A25	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region A25	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-B6	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region B6	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-C5	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region C5	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-C7	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region C7	(Vasicova 1999)
pET2-PdapA-L1	pEt2 mit dapA-Promotor -10Region L1	(Vasicova 1999)
pET2-PgltA	pEt2 mit gltA-Promotor	(Eva Radmacher, unv.)
pET2-PgltA1	pEt2 mit gltA-Promotorfragment 718bp	(van Ooyen 2010)
pET2-PgltA3	pEt2 mit gltA- Promotorfragment 236bp	(van Ooyen 2010)
pK19 <i>mobsacB</i>	Vektor zum Alleltausch in <i>C. glutamicum</i> (Km ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>sacB</i>)	(Schäfer 1994)
pK19Δ <i>prpC1</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 1092bp in <i>prpC1</i> (NCgl0630)	(Radmacher 2007)
pK19Δ <i>prpC2</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 1095bp in <i>prpC2</i> (NCgl0666)	(Claes 2002)
pK19Δ <i>gltA</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 1286bp in <i>gltA</i> (NCgl0795)	(Claes 2002)
pK19Δ <i>fkf</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 288bp in <i>fkf</i> (NCgl0796)	diese Arbeit
pK19Δ <i>PgltA160</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 160bp (1. Promotor) vor <i>gltA</i> (NCgl0795)	(Eva Radmacher, unv.)
pK19Δ <i>PgltA540</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 540bp (beide Promotoren) vor <i>gltA</i> (NCgl0795)	(Eva Radmacher, unv.)
pK19Δ <i>PgltA_B</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit 500bp flankierenden Bereichen von 540bp der Promotorregion von <i>gltA</i> (NCgl0795)	diese Arbeit
pK19Δ <i>PgltA_B-A8</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des dapA Promotors A8	diese Arbeit
pK19Δ <i>PgltA_B-A14</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des dapA Promotors A14	diese Arbeit
pK19Δ <i>PgltA_B-A16</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des dapA Promotors A16	diese Arbeit

Plasmid	Marker / Eigenschaften	Referenz
pK19ΔP <i>gltA</i> _B-A23	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des <i>dapA</i> Promotors A23	diese Arbeit
pK19ΔP <i>gltA</i> _B-A25	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des <i>dapA</i> Promotors A25	diese Arbeit
pK19ΔP <i>gltA</i> _B-B6	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des <i>dapA</i> Promotors B6	diese Arbeit
pK19ΔP <i>gltA</i> _B-C5	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des <i>dapA</i> Promotors B6	diese Arbeit
pK19ΔP <i>gltA</i> _B-C7	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des <i>dapA</i> Promotors B6	diese Arbeit
pK19ΔP <i>gltA</i> _B-L1	pk19 <i>mobsacB</i> zum Austausch von 540bp vor <i>gltA</i> (NCgl0795) gegen 250 bp des <i>dapA</i> Promotors B6	diese Arbeit
pK19Δ <i>pck</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 1071bp in <i>pck</i> (NCgl2765)	(Riedel 2001)
pK19Δ <i>odx</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion von 790bp in <i>odx</i> (NCgl1241)	???
pK19Δ <i>aceAB</i>	pk19 <i>mobsacB</i> zur Deletion des <i>aceAB</i> -locus (NCgl2248 und NCgl2247)	(Wendisch 2000)
pAN6-zwf	Expressionsplasmid für das Gen <i>zwf</i> (NCgl1514) (<i>kan</i> ^R , <i>P</i> _{tac}) (basierend auf pEKex2)	(A. Otten, unveröffentlicht)
pAN6	Expressionsplasmid für <i>C. glutamicum</i> (<i>kan</i> ^R , <i>P</i> _{tac}) (basierend auf pEKex2)	(Niebisch, unveröffentlicht)

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien entsprachen mindestens der Qualität p.a. Sofern nicht anders angegeben, wurden ausschließlich Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Fluka (Steinheim), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und GE Healthcare (München) verwendet. Bestandteile für komplexe Nährmedien wurden von den Difco-Laboratories (Detroit, USA) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierungsbedingungen und Medien

2.2.1.1 Medien

E. coli

Zur Kultivierung und Stammhaltung der *E. coli*-Stämme wurde ausschließlich das Vollmedium LB verwendet (Bertani 1951). Die Anzucht zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte auf SOB-Medium (Hanahan 1985).

Zur Selektion von *E. coli*-Stämmen, die Plasmide enthalten, wurden dem jeweiligen Medium 50 µg/ml Kanamycin (Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, steril filtriert) oder 50 µg/ml Ampicillin (Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, steril filtriert) zugesetzt.

C. glutamicum

C. glutamicum wurde zur Stammhaltung und DNA-Isolierung in BHI-Medium (*Brain-Heart-Infusion*, Difco-Laboratories, Detroit, USA) kultiviert. Als Medium für Vorkulturen wurde BHI-Komplexmedium oder CGIII-Medium (Menkel 1989) eingesetzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *C. glutamicum* - Zellen und die Regeneration nach erfolgter Transformation wurde auf BHIS-Medium (BHI mit 9,1% m(w/v) Sorbitol) durchgeführt. Zur Lysinproduktion, Charakterisierung von Phänotypen und zur Gewinnung von Rohextrakten wurde das Minimalmedium CGXII (Keilhauer 1993) mit 4% Glucose oder 2% Acetat bzw einer Mischung aus beiden als Kohlenstoffquelle verwendet. Bei der Kultivierung im Bioreaktor wurde auf die Zugabe von MOPS zur Stabilisierung des pH-Wertes verzichtet. Zur Steigerung der Lysinausbeute durch Limitierung des Wachstums wurden die Mengen an Phosphat variiert.

C. glutamicum-Kulturen wurden nach Integration eines Vektors in das Genom durch Elektroporation 15 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Selektion auf Excision der von *pk19mobsacB*-abgeleiteten Vektoren aus dem Genom von *C. glutamicum* erfolgte auf LB-Medium-Platten mit 10 % (w/v) Saccharose (Schäfer 1994). Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme mit frei replizierbaren Vektoren wurde durch Zugabe von 25 µg/ml oder 50 µg/ml Kanamycin erreicht. Aminosäuren zur Supplementation wurden in Wasser gelöst, und steril filtriert und zu den autoklavierten Medien gegeben. Für Agarplatten wurden den Nährmedien 1,5 % (w/v) Agar (Difco-Laboratories Detroit, MI, USA) hinzugefügt.

2.2.1.2 Kultivierung

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* in 50 ml Nährmedium in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen bei 120 Upm auf einem Flachbettschüttler. Bei kleineren Volumina (5 ml-Kulturen) fanden Reagenzgläser Verwendung, die bei 170 Upm inkubiert wurden. Die Inkubationstemperatur betrug bei *E. coli* 37 °C, *C. glutamicum* wurde ausschließlich bei 30 °C kultiviert.

In Experimenten zur Aminosäurebildung in Schüttelkolben wurden *C. glutamicum*-Kulturen über Tag (8-10 h) auf Komplexmedium (CGIII) vorkultiviert, anschließend mit 30 ml steriler 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und zur Kultivierung über Nacht (16 h) zu einer $OD_{600nm}=0,1$ in 50 ml CGXII-Medium übertragen (2.Vorkultur). Wenn nicht anders beschrieben wurde am nächsten Morgen aus dieser 2. Vorkultur die Hauptkultur ebenfalls in CGXII-Minimalmedium zu einer $OD_{600nm}=1$ angeimpft.

2.2.1.2 Kultivierung im Bioreaktor

Versuche zur L-Lysinbildung mit *C. glutamicum* im Bioreaktor wurden mit einer MultiFORS-Anlage (Infors AG, Basel, Schweiz) durchgeführt. Diese bestand aus vier parallelen Rührkesseln mit einem jeweiligen Arbeitsvolumen von 0,5 – 1 L. Die Begasung erfolgte mit Luft und bis zu 15 % reinem Sauerstoff, deren Zufuhr über einen Massenstromregler gesteuert wurde. Der Zuluftvolumenstrom betrug 0,9 – 1 L/min und die Rührerdrehzahl lag im Bereich von 500-950 Upm durch eine stufenweise Anpassung der Zuluft, Rührerdrehzahl und Beimengung von Sauerstoff wurde eine Sauerstoffkonzentration im Medium von 30% des Maximalwertes nicht unterschritten. Die Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs wurde über eine amperometrische Sauerstoffelektrode erfasst. Die Kalibrierung erfolgte vor der Inokulation durch Einstellung von 100 % Sättigung bei einer Drehzahl von 800 Upm und Begasung mit 1 L/min. Die Durchführung der Fermentationen erfolgte bei Normaldruck. Zur Messung des pH-Wertes kamen Gelelektroden zum Einsatz. Vorab erfolgte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen pH 4,0 und pH 7,0. Der pH-Sollwert von 7,0 wurde mittels Peristaltikpumpen an der Basiseinheit zur Dosierung von 3 M NaOH-Lösung bzw. 3 M HCl angesteuert. Kohlendioxid und Sauerstoff wurden in einem Teilstrom der Abluft mittels einer Abgasanalytik erfasst. Die Konzentrationsbestimmung von Kohlendioxid und Sauerstoff erfolgte durch Nahinfrarotabsorption bzw. paramagnetische Messung. Der Nullabgleich der Abgasmessung erfolgte mit Stickstoff. Mit Prüfgas wurden 10 % Kohlendioxid, mit Luft 20,93 % Sauerstoff eingestellt. Antischaum wurde während des Prozesses bei Bedarf, gemessen durch eine Antischaumelektrode, automatisch zudosiert. Die Standardprozessparameter Rührerdrehzahl, Zuluftmenge, Temperatur, pH und pO_2 wurden durch die IRIS-Software (Infors AG, Basel, Schweiz) angezeigt, geregelt und

aufgezeichnet. Sterile Probenahmen erfolgten in geeigneten Abständen über eine Fermentationsdauer von 24 Stunden. Die Offline-Analytik beinhaltete die Bestimmung der Biomasse mittels optischer Dichte und Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM). Zur Ermittlung der Konzentrationen von L-Lysin und Glucose sowie organischen Säuren im Kulturüberstand dienten HPLC-Analysen.

Aus der Literatur waren verschiedene Faktoren zur Berechnung der Biotrockenmasse aus der OD_{600nm} für *C. glutamicum* bekannt, die zwischen $0,29-0,33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot OD_{600nm}^{-1}$ liegen. Aus diesem Grund wurde zunächst in je 2 Bioreaktoren das Wachstum der Stämme DM1800' und DM1800'C7 verfolgt und die OD_{600nm} stündlich festgehalten. Zum gleichen Zeitpunkt wurden je Bioreaktor 3-mal 2 ml entnommen, durch einen Spritzenvorsatzfilter gefiltert, mit 10 ml H_2O bidest. gewaschen und 7 Tage im Trockenschrank ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) getrocknet. Anschließend wurde das Gewicht der Filter bestimmt und davon das vor der Prozedur ermittelte Gewicht jedes Filters abgezogen. Daraus wurden Mittelwerte aus 5 Zeitpunkten (OD_{600nm} 20-45) für die beiden Stämme errechnet. Hieraus ergab sich für DM1800' der Faktor $0,3347 \pm 0,0027$ und für DM1800'C7 der Faktor $0,3340 \pm 0,0032$ zur Berechnung der Biotrockenmasse (BTM) in mg/l für eine OD_{600nm} von 1 (siehe Anhang). Deshalb wurde zur weiteren Berechnung der BTM der auch im IBT2 übliche Faktor von $0,33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot OD_{600nm}^{-1}$ genutzt. Zusätzlich wurde zu den Zeitpunkten für die Ermittlung der Kohlenstoffbilanzen ebenfalls die BTM direkt bestimmt.

2.2.1.2 Stammhaltung

Zur Stammhaltung auf entsprechenden Agarplatten wurden die verwendeten Stämme etwa alle zwei Wochen auf neue LB-Platten überimpft und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 2 ml einer BHI-Kultur sedimentiert (*Heraeus®-Biofuge®-Pico*, Kendro-Laboratory-Products, Langenselbold) und in $750 \text{ } \mu\text{l}$ LB mit $250 \text{ } \mu\text{l}$ sterilem Glycerin (87 %) resuspendiert (Sambrook 1989). Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet.

2.2.1.2 Bestimmung des Bakterienwachstums

Aufgrund der linearen Abhängigkeit zwischen optischer Dichte und Zellkonzentration bei einer Extinktion von 0,05 bis 0,5 (Lambert-Beersches-Gesetz) kann anhand der optischen Dichte das Wachstum von Bakterien bestimmt werden. Dazu wurde ein Pharmacia Ultrospec 3100 pro UV/Visible Spectrometer (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Als Referenz diente das jeweilige Medium. Lag die gemessene Extinktion außerhalb des linearen Bereichs, wurde die Probe entsprechend mit Medium verdünnt.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurde ein Spritzenvorsatzsterilfilter ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) zuvor eine Woche getrocknet (60°C) und dessen Gewicht an einer Feinwaage bestimmt und notiert. Ein Aliquot einer Bakterienkultur von exakt 2 ml wurde mit Hilfe einer Spritze durch den Filter gedrückt und dieser mit weiteren 10ml H_2O gespült bevor der Filter wiederum eine Woche bei 60°C getrocknet wurde. Die Gewichts Differenz des Filters (BTM) wurde anschließend durch eine Feinwaage bestimmt. Üblicherweise erfolgten diese Messungen in dreifacher Bestimmung.

2.2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse und Silikatadsorption unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Niedrigsalzpuffer (10mMTrisHCl, pH=7,5) eluiert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde das gleiche Prinzip mit zusätzlicher Vorbehandlung der Zellen mit Lysozym verwendet (Eikmanns 1994).

2.2.2.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von RNA oder DNA wurde das Spektrophotometer NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) benutzt. Es wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm analysiert. Der Quotient der Messung bei 260 nm und bei 280 nm diente als Maß für die Reinheit von RNA oder DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen; kleinere Werte sprächen für eine Verunreinigung durch Proteine.

Für die Konzentrationsbestimmung gilt:

$E_{260\text{nm}} = 1$ entspricht bei dsDNA 50 $\mu\text{g/ml}$

$E_{260\text{nm}} = 1$ entspricht bei ssDNA oder RNA 40 $\mu\text{g/ml}$

$E_{260\text{nm}} = 1$ entspricht bei Oligonukleotiden 20 $\mu\text{g/ml}$

2.2.2.3 Ligationen, Modifikationen und Restriktionsspaltungen von DNA

Techniken zur Restriktion, Ligation und Phosphatasebehandlung erfolgten nach Angaben der Hersteller der benötigten Enzyme.

Restriktionsspaltungen wurden unter Verwendung der Fast-Digest® Restriktionsenzyme (Fermentas, St.-Leon-Rot) in geeigneten Mengen und Volumina nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (5 U/ μl) des Rapid DNA-dephos and Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur

Vermeidung von Religationen wurde linearisierte Plasmid-DNA mit „Shrimp alkaline phosphatase“ dephosphoryliert.

PCR-Produkte wurden zur Aufreinigung mit einem auf Silikagel-Membran basierenden Verfahren (PCR-Purification Kit bzw Min-Elute-Gelextraction Kit, Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt wenn nötig wurde das Produkt vorher durch horizontale Gelelektrophorese der Länge nach identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA

Die DNA Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten verwendet. Üblicherweise wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele in TAE-Puffer nach Sambrook (Sambrook 1989) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden im UV-Licht detektiert. Und durch das Geldokumentationssystem Quantum (PeQ-Lab, Erlangen) dokumentiert.

RNA

Zur Auftrennung von Gesamt-RNA wurde die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Üblicherweise wurden 1,5% ige (w/v) Agarose-Gele in Mops-Puffer (50mM Mops, 1mM EDTA, 1,5 % (v/v) Formaldehyd) nach Sambrook (Sambrook 1989) verwendet. Gesamt-RNA Proben wurden vor dem Auftragen im Vierfachen des Probenvolumens, RNA-Probenpuffer (50 mM Mops, 50 % (v/v) Formamid, 7 % (v/v) Formaldehyd, 15 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) Ethidiumbromid) aufgenommen, 5 min bei 60 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt, bevor sie auf das Gel geladen wurde. RNA-Gele wurden durch das Geldokumentationssystem Quantum (PeQ-Lab, Erlangen) dokumentiert.

2.2.2.5 Transformation von *E. coli* und *C. glutamicum*

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *E. coli* XL1-blue Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) erfolgte nach Angaben des Herstellers durch Elektroporation. Dazu wurden auf Eis 70 µl Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischt und in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ *Gene Pulser Cuvette*, 0,1 cm, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die Elektroporation wurde mit einem Puls von 1,5 kV, bei einem Widerstand von 800 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER XCELL™ (Biorad, Hercules, USA) durchgeführt. Sofort nach dem Puls wurden die Zellen in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOB-Medium überführt und für eine Stunde bei 37 °C unter

Schütteln bei 170 Upm regeneriert, um eine Expression des auf den Vektor lokalisierten Selektionsgens zu ermöglichen. Geeignete Mengen wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum* Zellen erfolgte durch Elektroporation (Dunican 1989, Liebl 1989, Wolf 1989) und anschließendem Hitzeschock (Tauch 2002). Kompetente Zellen wurden in Aliquots von 150 µl bei – 70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden auf Eis 150 µl kompetenter Zellen mit 250 – 1000 ng/µl DNA gemischt und in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ *Gene Pulser Cuvette*, 0,1 cm, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Puls von 2,5 kV, bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER XCELL™ (Biorad, Hercules, USA). Die Zellen wurden in 5 ml BHIS-Medium überführt und 6 min bei 46 C inkubiert (Hitzeschock) und zur Regeneration mindestens 1 h bei 30 °C unter Schütteln bei 170 Upm inkubiert. Geeignete Mengen wurden anschließend auf BHI-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

Üblicherweise lag die Transformationseffizienz für *E. coli* XL1-blue zwischen 1×10^7 - 1×10^9 Transformanten pro µg DNA und für *C. glutamicum* zwischen 1×10^4 - 1×10^5 Transformanten pro µg DNA.

2.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR

Die PCR wurde nach Mullis (Mullis 1986) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, zur Klonierung ausgewählter Gene, sowie zur Überprüfung von Deletionsmutanten eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit dem Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen), Annealing-Temperatur und Elongationszeit richteten sich nach dem jeweiligen Fragment und den entsprechenden Oligonukleotiden (Sambrook 1989). Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen finden sich im Anhang. Bei Routineamplifikationen und der Überprüfung von Deletionsmutanten wurde Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) bzw. KOD-Polymerase (Novagen, Madison, USA) nach Angaben der Hersteller verwendet.

Crossover-PCR

Zur Herstellung von Deletions- bzw Integrationsmutanten von *C. glutamicum* wurde die von Schäfer (Schäfer 1994) etablierte Methode mit dem Plasmid pK19*mobsacB* verwendet. Dazu wurden mittels *cross-over*-PCR (Link 1997) Integrationskonstrukte aus je 500bp fusioniertem 5'- und 3'- Bereich des zu verändernden chromosomalen Bereichs hergestellt und in pK19*mobsacB* eingebracht.

Herstellung Digoxigenin-dUTP (DIG-dUTP) markierter Sonden

Zur spezifischen Detektion von mRNAs im Northernblot wurden mittels PCR DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim) markierte DNA-Sonden hergestellt. Um teilweise DIG-11-dUTP statt dTTP in einen DNA-Strang einzubauen, wurde die Konzentration von dTTP in einer PCR auf 0,125 mM verringert und 0,125 mM DIG-11-dUTP zur Reaktion gegeben. DIG-11-dUTP wird mit einer geringen Effizienz von der Polymerase erkannt, deshalb wurde die Elongationszeit im PCR-Programm verdoppelt.

2.2.2.7 DNA Sequenzierungen

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger 1977) mit den im Anhang aufgeführten Primern bei der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt.

2.2.2.8 Isolierung von RNA

Je nach benötigter Menge wurde die RNA aus unterschiedlich großen Aliquots (1 bzw 20ml) einer Kultur gereinigt.

Zur Reinigung geringer RNA Mengen (z.B. für Northernblots) wurde während der Kultivierung jeweils 1 ml Aliquot aus der Kultur entnommen und in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Dieses wurde zentrifugiert (1 min, 10.000 x g, 4°C) und der Kulturüberstand vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde bis zu dessen Aufschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Reinigung größerer RNA Mengen (z.B. DNA-Chip oder RLM-RACE) wurde ein Aliquot der Kultur (~20 ml) mit 25 g Eis zentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C) (Wendisch 2001). Die Pellets wurden entweder sofort zur Präparation von RNA verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation bei -70°C gelagert.

In beiden Fällen erfolgte der Zellaufschluss mechanisch (1 x 30 s, Silamat S5, Vivadent, Ellwangen) mit 0,5 g Zirkonium/Silica-Perlen (d=0,1mM, ROTH, Karlsruhe).

Die Isolation und Reinigung von RNA (>200bp, Herstellerangabe) erfolgte mit einem auf Silica-Gel-Membranen basierenden Verfahren (RNeasy, Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Die Isolation und Reinigung von Gesamt-RNA bzw. die Aufreinigung von RNA nach Modifikation (RLM-RACE) erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion modifiziert nach Molekular Cloning (Sambrook 1989).

Qualität und Konzentration der RNA wurden photometrisch durch das NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und mittels denaturierender Formamid-Gel-Elektrophorese bestimmt. Aus 1 ml Kultur wurden zwischen 3 µg und 15 µg RNA erhalten,

aus 20 ml Kultur wurden zwischen 100 µg und 150 µg RNA erhalten. Die Lagerung von gereinigter RNA erfolgte bei – 20 °C.

2.2.2.9 Synthese von cDNA

Die cDNA -Synthese erfolgte mit isolierter RNA als Matrize mittels Reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, Karlsruhe) und Zufalls-Hexamer-Primern für genomweite Expressionsanalysen oder genspezifischen Primern für die RLM-RACE nach den Angaben des Herstellers. Nach der Synthese (2 h, 42°C) wurde die RNA in 25 mM NaOH hydrolysiert (10 min, 70°C) und mit 25 mM HCl neutralisiert.

Synthese von fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden von gleichen Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (25 µg) synthetisiert. Im Unterschied zur Standard-cDNA-Synthese wurden hierbei neben verringerten dTTP-Mengen je eines der fluoreszierenden Nukleotidanaloga cy3-dUTP bzw. cy5-dUTP (GE-Healthcare, München) in der Synthese eingesetzt. Beide werden durch die Reverse Transkriptase anstelle des dTTP in die cDNA-Stränge eingebaut. Üblicherweise wurde zur Markierung der cDNA des Referenzstammes cy5-dUTP (rotfluoreszierend) und im veränderten Stamm cy3-dUTP (grünfluoreszierend) eingesetzt. Das Abtrennen der nicht eingebauten Nukleotiden erfolgte durch Größenausschluss über Membranen (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach). Der 50-µl-Ansatz wurde mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und durch Zentrifugation (10 min, 13000 g) auf etwa 20 µl eingeeengt, nochmals mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und zentrifugiert. Danach wurden die für eine Hybridisierung vorgesehenen Cy3- bzw. Cy5-markierten Sonden vereinigt und es erfolgte, wie oben beschrieben, eine weitere Ultrafiltrationszentrifugation (10 min, 13000 g). Die so erhaltenen cDNA-Sonden (~ 5 µl) der zu vergleichenden RNA-Proben wurden sofort in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt.

2.2.2.10 RNA-ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE)

Bei der RLM-RACE handelt es sich um eine Methode zur schnellen, gleichzeitigen Bestimmung von Transkriptionsstart und –stopp (Kuhn 2002, Szymkowiak 2003). Hierzu wurden 10µg isolierter RNA mit 40 U T4-RNA-Ligase und 10 U RNase Inhibitor (Promega, Madison, USA) in 1x RNA-Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 25 µl, 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz anschließend 10 min bei 65°C inkubiert. Proteine wurden im Anschluss durch Phenol-Chloroform-Extraktion abgetrennt. Die RNA wurde in 10 µl mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC) behandeltem Wasser aufgenommen und vollständig für die cDNA-Synthese mit genspezifischen Primern eingesetzt. Diese cDNA

wurde durch eine erste PCR mit spezifischen Primern für die 5'- bzw. 3'-Region amplifiziert. Die entstandenen Produkte dienten einer zweiten („nested“) PCR mit ebenfalls spezifischen Primern für die 5'- bzw. 3'-Region, die innerhalb des Produktes der ersten PCR binden, als Matrize. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden in *Sma*I-linearisierten pUC18-Vektor kloniert. Üblicherweise wurden die Vektoren aus 8 bis 15 Klonen isoliert und sequenziert.

2.2.2.11 Northern Blot

Analog zum Southern-Blot (Southern 1975) wird beim Northernblot, modifiziert nach Molecular Cloning (Sambrook 1989) RNA durch denaturierende Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und das Gel im Anschluss auf eine Membran „geblottet“. Die enthaltenen mRNAs wurden durch Schwer- und Kapillarkräfte aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (QIABRANE; QIAGEN, Hilden) gebracht und durch UV-Licht kovalent verknüpft. Mit einer spezifischen DIG-11-dUTP-markierten Sonde wurde eine Ziel-mRNA markiert, deren Größe anhand eines Standards (RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled, Roche, Mannheim) bestimmt werden konnte. Die Sonde wurde durch einen DIG-spezifischen, an alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper (Roche Mannheim), über eine Chemolumineszenz-Reaktion mit dem Substrat CDP-Star® (Roche, Mannheim) nachgewiesen. Die Reaktion wurde mit der CCD-Kamera LAS-3000-Mini (Fujifilm Düsseldorf) dokumentiert. Zur Auswertung der Bilder wurde die Software AIDA 4.15 (raytest Inc., Willmington, USA) genutzt.

2.2.2.12 Genomweite Expressionsanalysen (Microarray)

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*-Chips wurden von der Firma Operon Biotechnologies GmbH (Ebersberg) hergestellt. Auf einem Chip waren neben 3057 Proteinkodierenden Genen 1294 intergenische Regionen, 60 tRNA-Gene, 15 rRNA Gene und 140 Oligonukleotide für positive und negative Kontrollen, je zweimal gespottet. Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden (siehe 2.2.2.9) gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Zur Vorbereitung wurde der DNA-Chip nach den Angaben des Herstellers gewaschen und getrocknet.

Zu den vereinigten und aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden (~ 5 µl) wurden 50 µl OpArray Hyb Lösung (Operon, Ebersberg) gegeben. Dieser Ansatz wurde 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 5 - 10 min bei 42°C inkubiert. Vor der Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA ein Spezialdeckglas (MAUI Mixer AO, BioMicro, Salt Lake City, USA) aufgebracht. Die Sonden wurden auf den Chip gegeben und der DNA-Chip in einer MAUI-Hybridisierungskammer

(BioMicro, Salt Lake City, USA) über Nacht (16h) bei 42 °C inkubiert. Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte cDNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen in verschiedenen Waschlösungen OpArray Wash (Operon, Ebersberg) nach den Angaben des Herstellers. Durch Zentrifugation (5 min, 1600 Upm bei Raumtemperatur) wurde der DNA-Chip getrocknet.

Da das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots unter geeigneten Bedingungen direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben korreliert, ist es ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon 1996). Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenePix 4000A Laser Scanner (Axon Inc., Union City, USA) verwendet. Mit Hilfe der Software GenePix Pro 3.0 (Axon Inc., Union City, USA) wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert. Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die 'GenePix Array List' (erstellt von Dr. T. Polen) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen bzw. intergenischen Bereich und zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen

Die Berechnung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten der Signalintensitäten des Spots und dessen Hintergrunds. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis sowohl für die Cy3- als auch für die Cy5-Fluoreszenz kleiner als fünf war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky 2000). Um die durch die Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen 1998). Zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze, erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die Berechnung von p -Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, EXCEL 2000, Microsoft, Redmond, USA).

Zur Auswertung wurden nur Spots (bzw. Mittelwerte 2er Spots, wenn auf einem Chip beide auswertbar waren) einbezogen, deren Fluoreszenzen in mindestens einer Farbe 5-fach über dessen Hintergrund lag, in wenigstens 2 von 3 Experimenten mindestens einen Faktor 2 aufwiesen, und deren p -Wert unter 0,05 (5 %) lag. War eine der Fluoreszenzen nach Abzug des Hintergrundes kleiner oder gleich 0 wurde diese zur Verrechnung auf 0,5 gesetzt.

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.3.1 Herstellung zellfreier Extrakte

Für die Messung von spezifischen Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten wurden 50 ml exponentiell wachsender Kultur ($OD_{600nm} = 7 - 10$) von *C. glutamicum* nach einmaligem Waschen in geeignetem Aufschlusspuffer (4 °C), in 1 ml Aufschlusspuffer (4 °C) aufgenommen und mittels Ultraschall-desintegration (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA; Beschalldauer 10 min, Pulslänge 20 %, Beschallintensität 2) aufgeschlossen. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch zentrifugieren (4 °C, 10 min 14000 g) abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt zur Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt.

2.2.3.1 Proteinbestimmung

Nach Fällung der Proteine mit 0,02% Na-Desoxycholat und 6% Trichloressigsäure (Bensadoun 1976) und anschließender Resuspension in 1ml Lowryreagenz (Lowry 1951) wurden die Proteinkonzentrationen der Rohextrakte photometrisch (*Pharmacia Ultrospec 3000 pro UV/Visible Spectrometer* (Amersham Biosciences Uppsala, Schweden)) bestimmt. Als Standard für die Eichkurve wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.2.3.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität (CAT)

Die Chloramphenicol-Acetyltransferase acetyliert Chloramphenicol mit Acetyl-CoA unter Freisetzung von CoA und wurde nach Sambrook (Sambrook 1989) bestimmt. Ein Testansatz (1 ml) enthielt 1 mM DTNB, 0,1 M Tris 0,1 mM Acetyl-CoA, 0,25 mM Chloramphenicol und 50 µl Rohextrakt in geeigneter Verdünnung. Die sich mit Bildung von Thionitrobenzoat ändernde Extinktion bei 412 nm wurde photometrisch verfolgt. Mit dem Extinktionskoeffizienten von DTNB 14.150 M^{-1} konnte so nach Proteinbestimmung die spezifische Aktivität berechnet werden.

Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität (CS)

Die Citratsynthase katalysiert die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat unter Freisetzung von CoA, was analog zur CAT-Aktivitätsbestimmung durch DTNB Photometrisch bestimmt werden kann (Eikmanns 1994). Ein Testansatz (1 ml) enthielt 200 mM NaGlutamat 1 mM DTNB, 50 mM Tris 0,1 mM Acetyl-CoA, 0,25 mM Oxalacetat und 50 µl Rohextrakt in geeigneter Verdünnung. Die sich mit Bildung von Thionitrobenzoat ändernde Extinktion bei 412 nm wurde photometrisch verfolgt. Mit dem

Extinktionskoeffizienten von DTNB 14.150 M^{-1} konnte so nach Proteinbestimmung die spezifische Aktivität berechnet werden.

2.2.3.3 Westernblot

Zur Probenvorbereitung wurde ein sechsfach konzentrierter Ladepuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 6 % DTT (Dithiothreitol), 30 % (v/v) Glycerin, pH 6,8) verwendet, in dem die Proben für 30 min bei 42°C denaturiert wurden. Zur Bestimmung des Molekulargewichts löslicher und membrangebundener Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde die SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) mit dem *NuPAGE*[®] System (Invitrogen, Carlsbad, USA) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in 12 %igen Bis-Tris-Polyacrylamidgelen nach den Angaben des Herstellers.

Zur Detektion von Proteinen mittels spezifischen Antikörpern wurden diese aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen durch Elektroblotting für 30 min - 1 h bei 100 V in Trans-BlotTM Kammern (Biorad, Hercules, USA) transferiert. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei 4°C in Block-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9 % NaCl, 5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween 20) geschwenkt. Danach wurde die Membran zweimal 15 min in Blot-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9 % NaCl, 0,1 % Tween 20) gewaschen. Im Anschluss wurden die Membranen über Nacht in Blot-Puffer mit dem primären Antikörper (Qiagen, Hilden, Verdünnung 1:1.000) gegen den His-Tag des Zielproteins inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran zweimal 15 min in Blot-Puffer gewaschen. Für den Nachweis des primären Antikörper wurde die Membran für 3 h in Blot-Puffer mit sekundärem Antikörper, an den alkalische Phosphatase gekoppelt war (*Anti-Mouse* IgG, Verdünnung 1:15.000), inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 15 min in Blot-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran in Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) 10 min equilibriert und zum Starten der Farbreaktion mit 10 ml Entwicklungslösung (10 ml Entwicklungspuffer, 66 μl NBT [50 mg/ml in 70 % Formamid], 66 μl BCIP [25 mg/ml]) überschichtet. Sobald sichtbare Signale auswertbar waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 %iger TCA-Lösung gestoppt. Zur Dokumentation wurden die Blots gescannt (HP Scanjet 3760, HP, Palo Alto, USA) und elektronisch gespeichert.

2.2.4 Quantitative Bestimmung von Metaboliten

2.2.4.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand

Die Quantifizierung von Aminosäuren erfolgte mit Hilfe der *reversed phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) (Jones 1983). Vor der säulenchromatographischen Auftrennung der Proben erfolgte eine Derivatisierung der Aminosäuren mit dem Reagenz *o*-Phthaldialdehyd (OPA), das mit der Aminogruppe der Aminosäuren reagiert (Jones 1983, Lindroth 1979). Je 5 µl der Probe wurden durch das Gerät mit 20 µl *o*-Phthaldialdehyd/ Mercaptoethanol-Lösung (Pierce Europe BV, Niederlande) vermischt und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Auftrennung auf eine RP-HPLC Säule (LiChrospher 100 RP 18 EC 5 µm, 125 x 4 mM) mit vorgeschalteter Vorsäule (LiChrospher 100 RP 18 EC 5 µm, 40 x 4 mM, CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe) gegeben. Die bei der Derivatisierung entstandenen thiosubstituierten Isoindolverbindungen wurden mit einem Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration von der Säule eluiert. Als polarer Laufpuffer diente hierbei 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2). Die Detektion der fluoreszierenden Derivate erfolgte nach Anregung bei 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Zur säulenchromatographischen Auftrennung und Detektion wurde ein HPLC-Gerät vom Typ Agilent Technologies 1100 LC System (Agilent Technologies, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet. Die Systemsteuerung und Datenauswertung erfolgte mit dem Programm *HP-Chemstation* (Agilent Technologies, Waldbronn). Die Konzentration der jeweils analysierten Aminosäure wurde über den Vergleich mit einem externen Standard der betreffenden Aminosäure ermittelt. Üblicherweise wurden die Proben etwa 50 - 200fach vorverdünnt.

2.2.4.2 Quantitative Bestimmung von Glucose im Kulturüberstand

D-Glucose wurde mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Ionenausschlusschromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Organic Acid Resin, 250 x 8 mm; CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) bei 70 °C und isokratischer Elution mit H₂O bei einer Flussrate von 0,6 ml/min aufgetrennt und mittels Refraktionsindex (LaChrom RI Detektor L-7400, Merck, Darmstadt) detektiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Analyse der ermittelten Peakflächen der Proben und externer Standards.

2.2.4.3 Quantitative Bestimmung von organischen Säuren im Kulturüberstand

Die quantitative Bestimmung organischer Säuren in Kulturüberständen erfolgte durch Ionenausschlusschromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Organic Acid Resin, 250 x 8 mM; CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) durch isokratische Elution innerhalb von 20 min mit 10 mM H₂SO₄ bei einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹ und einer Temperatur von 65 °C mit Hilfe eines Agilent Technologies 1100 LC Systems. Die eluierten organischen Säuren wurden mit einem Diodenarray-Detektor (DAD G1315B) bei einer Wellenlänge von 215 nm detektiert. Die Quantifizierung der organischen Säuren erfolgte durch Analyse der ermittelten Peakflächen der Proben und externer Standards der entsprechenden Säure.

2.2.4.4 Quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolite

Hierzu wurden jeweils 5ml Kultur bei einer OD_{600nm} ca. 10 in 15 ml 60 %iges Methanol mit einer Temperatur von –20 °C gegeben um alle Reaktionen zu stoppen und 5 Minuten bei 10.000 g und -20°C zentrifugiert. Eine Probe des resultierenden Überstandes wurde zur Kontrolle (Cell Bleeding) abgenommen und der Rest verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml 1:1 TE Puffer und 100 % Methanol resuspendiert, und durch Zugabe von 2 ml Chloroform die Zellen 1 h unter schütteln bei –20 °C aufgeschlossen. Durch erneute Zentrifugation 5 min bei 10.000 g und –20 °C wurde eine Phasentrennung erreicht und 1 ml des Überstandes (wässrige Phase) zur Messung abgenommen bzw. bei –20 °C gelagert. Üblicherweise wurden 3 Biologische Replikate in 2facher Bestimmung durchgeführt. Metabolitkonzentrationen wurden anschließend durch Messung über LC-MS-MS (Luo 2007, Thiele 2008) quantifiziert.

2.2.4.5 Quantitative Bestimmung extrazellulärer Raten durch ein Prozessmodell

Zur Anpassung und Bestimmung aller extrazellulären Raten in der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein simples Model für Batchkultivierungen erstellt. Um die Prozessdaten dabei in einer guten und statistisch belastbaren Anpassung darzustellen, wurde ein unstrukturierter Modelansatz gewählt.

$$\dot{X} = r_X, \quad \dot{S} = -r_S, \quad \dot{P} = r_P$$

Mit

$$r_X = \mu_{\max} \cdot X, \quad r_S = \frac{r_X}{Y_{XS}} + \frac{r_P}{Y_{PS}} \quad \text{und} \quad r_P = \pi_{\max} \cdot X$$

Wobei X , S und P für die Konzentrationen der Biomasse, der Glucose und des Lysin stehen. Modellparameter stellen hierbei die spezifischen Raten für Wachstum (μ_{\max}) und

Lysinbildung (π_{\max}), sowie die Koeffizienten der Umwandlung des Substrates (S) in Biomasse ($Y_{X/S}$) oder Lysin ($Y_{P/S}$) dar.

Die Bildungsrate von CO_2 (r_{CO_2}) wurde durch die Massenbilanz der Gasphase bestimmt:

$$r_{\text{CO}_2} = \frac{\dot{V}_g}{V_f \cdot 24.47} \left(Y_{\text{CO}_2, \text{out}} - Y_{\text{CO}_2, \text{in}} \frac{1 - Y_{\text{O}_2, \text{in}} - Y_{\text{CO}_2, \text{in}}}{1 - Y_{\text{O}_2, \text{out}} - Y_{\text{CO}_2, \text{out}}} \right)$$

mit \dot{V}_g als definierter Begasungsrate. $Y_{\text{O}_2, \text{in}}$, $Y_{\text{CO}_2, \text{in}}$ und $Y_{\text{O}_2, \text{out}}$, $Y_{\text{CO}_2, \text{out}}$ stellen dabei die Anteile von O_2 and CO_2 im Zustrom und Ausstrom dar.

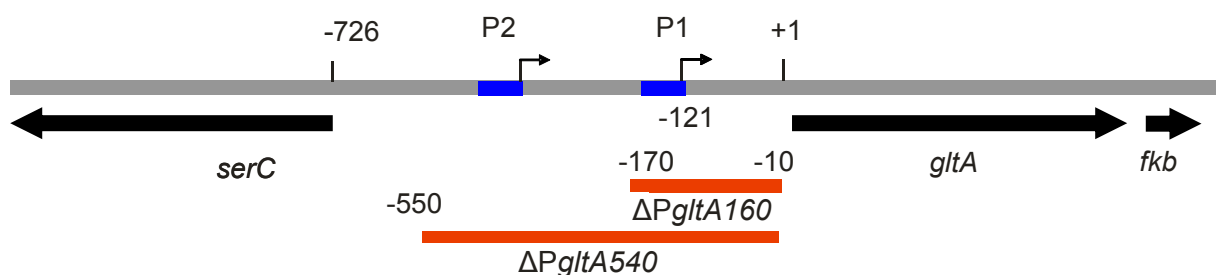
3. Ergebnis

3.1 Charakterisierung der *gltA* Transkripte

Um Mutanten der *C. glutamicum* Stämme DM1800 und DM1933, mit abgestufter Citratsynthase-Aktivität zu erstellen, sollte der *gltA*-Promotor (Eikmanns 1994) durch Promotoren unterschiedlicher Stärke ersetzt werden. Hierfür mussten zunächst der Promotor und dessen regulatorische Elemente untersucht werden. Um zu vermeiden, dass durch die Veränderungen der CS-Aktivität mögliche Suppressormutationen selektiert werden (Radmacher 2007), wurden zunächst die beiden für Methylcitratsynthasen kodierenden Gene *prpC1* und *prpC2* deletiert. Die resultierenden Stämme wurden mit DM1800' bzw. DM1933' bezeichnet

3.1.1 Untersuchung der Promotorbereiche von *gltA*

Um die Transkription und Regulation von *gltA* zu untersuchen, wurde zunächst der Genort näher betrachtet. Der intergenische Bereich der divergent liegenden Gene *serC* (Transaminase) und *gltA* (Abb. 3.1) weist mit 724 bp eine für Prokaryoten unübliche Länge auf. Der durchschnittliche Abstand zweier Gene in *C. glutamicum* beträgt 141 bp (Kalinowski 2003). Der bereits identifizierte Transkriptionsstart P1 liegt 121 bp vor dem offenen Leserahmen (ORF) von *gltA* (Eikmanns 1994). Mit Hilfe des Vektors pK19 Δ P*gltA*160 wurden 160 bp vor *gltA* (Abb. 3.1) deletiert und der Stamm DM1800' Δ P*gltA*160 erhalten.



spezifische CS-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}$] (U)

gltA wt: $0,993 \pm 0,026$ 100%

Δ P*gltA*160 $0,154 \pm 0,013$ 15%

Δ P*gltA*540 $0,006 \pm 0,001$ 0% = Δ *gltA*

Abb. 3.1 Übersicht des Genorts von *gltA*

Übersicht zur Lage von *gltA* und seiner Promotoren. Deletierte Bereiche sind in roten Balken dargestellt, die relative Lage in Relation zum Translationsstart in bp ist in Zahlenwerten wiedergegeben. Die spezifischen CS-Aktivitäten der Stämme sind im unteren Teil der Abbildung aufgelistet.

Überraschenderweise war dieser Deletionsstamm noch in der Lage, mit Glucose zu wachsen, während die Deletion des *gltA*-Strukturgens (Eikmanns 1994, Radmacher 2007) zum Verlust dieser Fähigkeit führt. Die Bestimmung der spezifischen CS-Aktivität in DM1800' Δ P*gltA*160 zeigte, dass der Stamm bei Wachstum mit Glucose und einer OD_{600nm} von 10⁻⁶ (0,154 U) der spezifischen Aktivität des Referenzstammes DM1800' (0,993 U) bzw. des Wildtyps ATCC13032 (0,992 U) aufwies. Die weitergreifende Deletion von 540 bp der 5'-Region von *gltA* mit Hilfe des Vektors pK19*\Delta*P*gltA*540 zeigte, dass der resultierende Stamm DM1800' Δ P*gltA*540 nun nicht mehr in der Lage war, in Minimalmedium mit Glucose zu wachsen. Wie für den *gltA* Deletionsstamm wurde die spezifische CS-Aktivität nach Wachstum im Komplexmedium CGIII gemessen. In beiden Stämmen konnte nur eine sehr geringe Aktivität ($\leq 0,006$ U) festgestellt werden. Diese Ergebnisse ließen auf mindestens einen weiteren Promotor (P2) im Bereich 170-450 bp vor *gltA* schließen.

3.1.2 Zwei monocistronische *gltA*-Transkripte

Aufgrund der Beobachtung, dass die Deletion des bekannten Promotors von *gltA* nicht zu einem völligen Verlust der spezifischen CS-Aktivität führte, wurden Northernblotanalysen durchgeführt; dadurch sollten mögliche weitere Transkripte von *gltA* identifiziert werden. Hierzu wurde aus Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose RNA präpariert. In einem Northernblot wurden mit Hilfe einer *gltA*-spezifischen, DIG-dUTP-markieren DNA-Sonde (500 bp beginnend mit Startcodon) diejenigen mRNAs nachgewiesen, welche diese Sequenz enthielten (Abb. 3.2 A). Die Länge von *gltA* beträgt 1314 bp und der bekannte Promotor (P1) befindet sich 121 bp vor dessen ORF, was einer Gesamtlänge des Transkripts von 1435 bp entspräche, zuzüglich der Basen bis zum Transkriptionsterminator. Zu erwarten war also ein Transkript von etwa 1500 bp. In Abbildung 3.2. sind für den Referenzstamm (DM1800') zwei Banden mit einer apparenten Größe von 1450 bp bzw. 1750 bp zu sehen, während für den Stamm DM1800' Δ P*gltA*160 nur eine schwache Bande bei etwa 1600 bp zu beobachten ist. Dieser Befund war ein weiterer Hinweis, dass zwei Transkriptionsstarts vor *gltA* existieren mussten. Der erste bereits bekannte (Eikmanns 1994), und ein weiterer, der stromaufwärts liegen musste, da die Deletion von 160 bp (P1) in DM1800' Δ P*gltA*160 zu einem einzigen, verkürzten Transkript führt. Die Publikation einer koreanischen Arbeitsgruppe (Han 2008b) zu diesem Zeitpunkt zeigte nur ein einziges Transkript von 1900 bp für *gltA*. Die Autoren zeigten weiter, dass eine polycistronische mRNA mit den Genen *gltA* und *fkf* (NCgl0796) gebildet wird. Das *fkf*-Gen kodiert eine peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase (PPCTI), welche die korrekte Faltung von Proteinen, vor allem bei Hitzestress in Zellen, katalysiert. Häufig wurde die Funktion der PPCTI mit CS-Protein gezeigt, indem dieses nach thermischer Inaktivierung *in vitro* durch

Zugabe der PPCTI seine korrekte Faltung und damit seine Aktivität wiedererlangte (Arie 2001, Ideno 2001, Kurek 2002, Pirkl 2001).

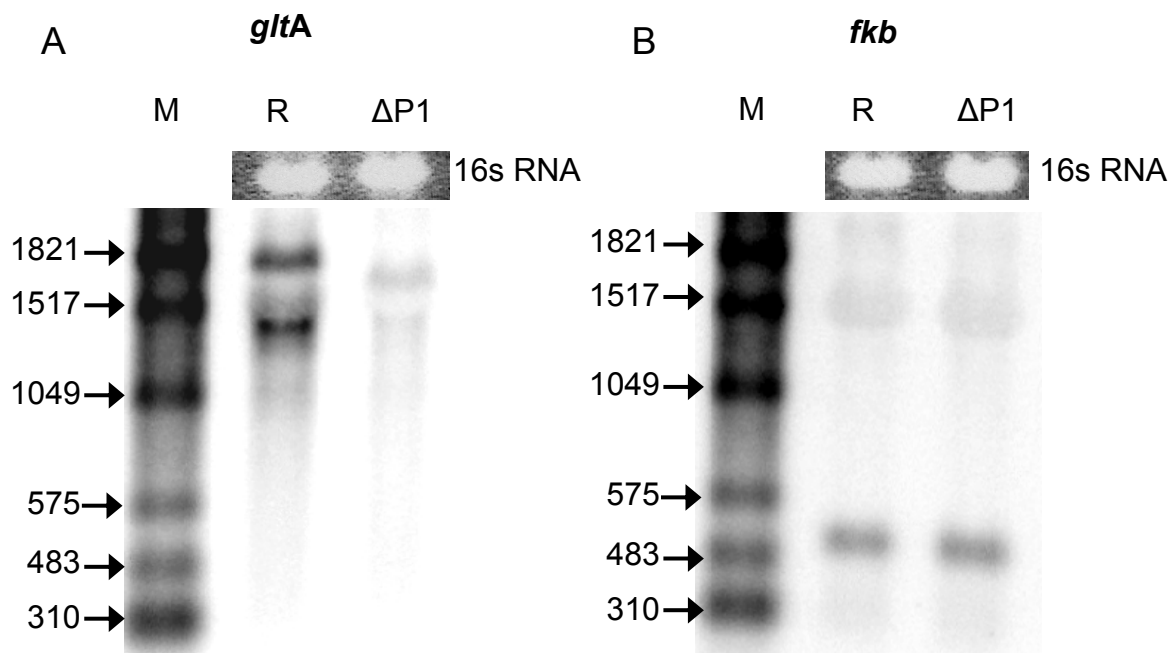


Abb. 3.2 Northernblotanalyse zum Nachweis der *gltA*- und *fkb*-Transkripte

Northernblot zum Nachweis der Transkriptgrößen von **A** *gltA* und **B** *fkb*. Als Ladekontrolle dient die jeweilige 16sRNA der beiden Stämme DM1800' (R) und DM1800'ΔPgltA160 (ΔP1). Als Größenmarker (M) wurde der RNA-Molekular-Weight-Marker-I-Dig-labeled (Roche-Diagnostics, Mannheim) verwendet.

Interessanterweise ist der Genlocus von *gltA* in *C. glutamicum* und dessen Verwandten synthenisch. Es zeigte sich, dass sich im 3'-Bereich von *gltA* der *Corynebacterium* Arten *C. glutamicum* (ATCC13032), *C. glutamicum* R, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. jeikeium* sowie *Mycobacterium smegmatis*, *Rhodococcus sp.* und *Nocardia farcinia* in gleicher Orientierung ein PPCTI-kodierendes Gen befindet.

Da der Befund der japanischen Arbeitsgruppe in Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen stand, wurden weitere Northernblots mit einer spezifischen Sonde (384 bp) gegen das *fkb*-Transkript angefertigt (Abb. 3.2 B). Hierbei zeigte sich in beiden Stämmen nur ein Signal bei etwa 500 bp. Daraus folgt, dass für beide Gene eine bzw. zwei monocistronische mRNAs gebildet werden. Des Weiteren verstärkte dieser Befund die Hypothese, dass es einen zweiten Transkriptionsstart im 5'-Bereich des ersten geben musste.

3.1.3 Promotoren und Terminator von *gltA*

Um die Lage des zweiten Promotors (P2) und des Transkriptionsterminators zu bestimmen, wurde die RLM-Race-Methode genutzt (Kuhn 2002). Aus je 15 der durch Selektion auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin erhaltenen Klone wurde der Vektor isoliert und sequenziert. Abbildung. 3.3 zeigt die Lage des Transkriptionsstarts P1, 121 bp vor *gltA*, die in 8 von 15 Klonen bestimmt werden konnte und mit der bislang veröffentlichten (Eikmanns 1994) übereinstimmt, sowie die Lage von P2, die in 9 der 15 sequenzierten Klone ermittelt wurde. Außerdem konnte der Terminator in 21 der insgesamt 30 sequenzierten Klone ermittelt werden. Die -10-Regionen der ermittelten Promotoren zeigen Übereinstimmungen vor allem zu den hoch konservierten Bereichen der Consensus-Sequenz der -10-Region von insgesamt 33 ermittelten Promotoren (Patek 1996). Der Terminator zeigt eine für die proteinunabhängige Termination der Transkription übliche, sehr energiearme ($\Delta G^0 = -35$ kJ/M; RNAfold, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), GC-Nukleotid-reiche Haarnadelstruktur, gefolgt von 5 Thymidinen. Aus den Ergebnissen folgt, dass für *gltA* zwei Transkripte von 1519 bp und 1755 bp von unterschiedlichen Startpunkten aus gebildet und am gleichen Punkt beendet werden.

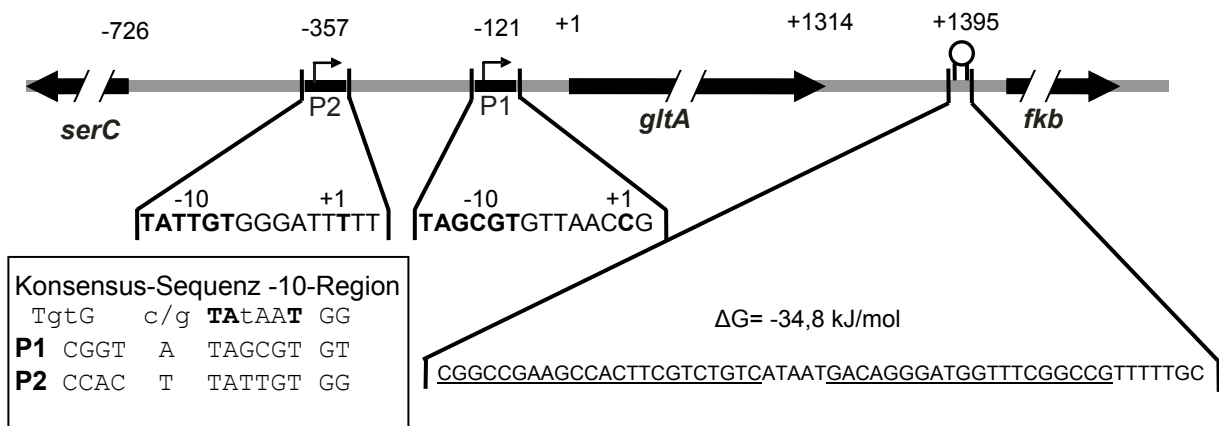


Abb. 3.3 Übersicht der Promotoren und des Terminators von *gltA*

Die Lage der Transkriptionsstartpunkte sowie des Terminators sind mit ihrem relativen Abstand zum Translationsstart angegeben. Die Sequenzen der -10-Regionen sowie des Transkriptionsstartpunktes sind fett gekennzeichnet. Für den Terminator sind die komplementären Bereiche (Haarnadelstruktur) unterstrichen sowie dessen Energie angegeben. Die Box am linken unteren Bildrand zeigt den Vergleich der ermittelten Promotoren mit der Consensus-Sequenz der in *C. glutamicum* bekannten -10-Regionen. Hoch konservierte Nukleotide (>70 %) sind fett gekennzeichnet, gut konservierte Nukleotide (>50 %) sind als Großbuchstaben angegeben.

3.2 Fkb (NCgl0796) ein Chaperon der Citratsynthase?

Die Lokalisation von *fkb* im 3'-Bereich von *gltA* in *C. glutamicum* sowie verwandten Arten und dessen Funktion als Chaperon ließen auf einen funktionalen Zusammenhang der beiden Genprodukte schließen. Zur näheren Charakterisierung von Fkb (FK506-bindendes Protein) wurde mit dem Vektor pK19 Δ *fkb* der Stamm DM1800' Δ *fkb* durch Deletion von *fkb* (NCgl0796) im Stamm DM1800' erstellt. Zunächst wurde das Wachstum zweier unabhängiger Mutanten dieses Stammes mit dem Parentalstamm verglichen. Abbildung 3.4 zeigt, dass sich bei Wachstum in CGXII-Medium mit 4% Glucose beide Klone des Stammes DM1800' Δ *fkb* im Wachstum deutlich vom Ausgangsstamm unterscheiden. Für den Referenzstamm DM1800' wurde eine Wachstumsrate von 0,36 h⁻¹ für den exponentiellen Bereich des Wachstums ermittelt, während die Stämme mit der Deletion von *fkb* für diesen Bereich eine signifikant geringere Wachstumsrate von 0,30 h⁻¹ zeigten und auch in der maximalen OD_{600nm} 10-15 % unter dem Wert des Referenzstammes lagen. Da die Deletion von Genen auch zu morphologischen Veränderungen führen kann, wurde die Größe und Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop verglichen; es konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Um zu ermitteln, ob der Wachstumsunterschied aus einer unterschiedlichen Citratsynthaseaktivität (CS) resultierte, wurden Kulturen bei einer OD_{600nm} von 10 auf ihre spezifische CS-Aktivität untersucht. Wie in Tabelle 3.1 gezeigt, betrug die spezifische CS-Aktivität des Stammes DM1800' Δ *fkb* nur etwa zwei Drittel der Aktivität des Referenzstammes DM1800'. Die katalytische Funktion der *fkb*-Genprodukte wird sowohl als stabilisierend bei Hitzeschock als auch reaktivierend nach einem Hitzeschock beschrieben. In der hausinternen Datenbank (JMD *C. glutamicum*), in der die Ergebnisse der genomweiten Genexpressionsanalysen hinterlegt werden, konnte kein Hinweis auf eine verstärkte Expression von *fkb* nach einem Hitze- oder Kälteschock bzw. in verschiedenen weiteren Stresssituationen (oxidativer Stress; Schwermetall Stress) für *C. glutamicum* gefunden werden.

Untersucht wurde auch, ob sich die Stämme in Bezug auf ihre Bildung von Lysin unterscheiden. Dabei zeigte sich, dass für alle Stämme nach 23 Stunden vergleichbare Konzentrationen von Lysin im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnten.

Wie sich in weiteren Experimenten zeigte, kann das verringerte Wachstum des Stammes DM1800' Δ *fkb* nicht ausschließlich durch die verringerte CS-Aktivität des Stammes erklärt werden. Da der Fokus nicht auf der Charakterisierung von Chaperonen wie Fkb in *C. glutamicum* lag, wurden keine weiteren Untersuchungen zur Funktion von *fkb* vorgenommen. Es bleibt festzuhalten, dass *fkb* einen Einfluss auf Wachstum und die spezifische Aktivität der CS in *C. glutamicum* zeigt.

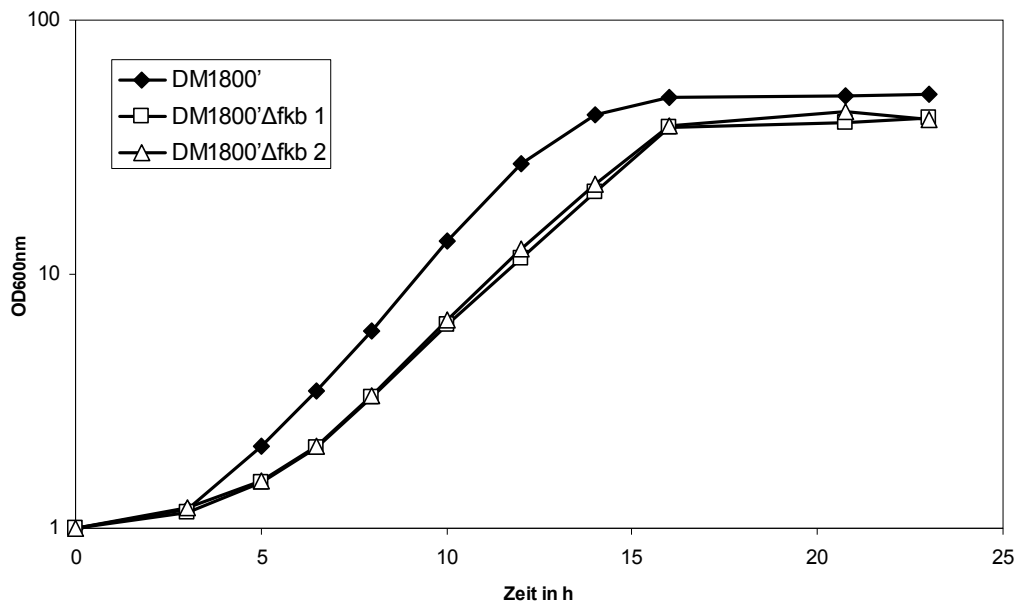


Abb. 3.4 Wachstumsvergleich von DM1800' und DM1800'Δfkb in CGXII-Medium mit 4 %Glucose

Tab. 3.1 Vergleich der Stämme DM1800' und DM1800'Δfkb

Stamm	Wachstumsrate	CS-Aktivität	Lys*HCl	
	[h ⁻¹]	[μmol/ mg ⁻¹ min ⁻¹]	mM	g L ⁻¹
DM1800	0,39	0,996	37,2	6,9
DM1800Δfkb 1	0,29	0,652	37,9	7,0
DM1800Δfkb 2	0,29	0,613	37,6	7,0

3.3 Regulation der *gltA* Transkription in *C. glutamicum*

Bislang konnte nachgewiesen werden, dass *gltA* in *C. glutamicum* zwei Promotoren besitzt deren Lage bestimmt wurde. Daraus ergab sich die Fragestellung: Was ist die Funktion der zwei *gltA* Promotoren? Und wie werden sie reguliert? Im Gegensatz zu einigen anderen Genen des Citratzyklus (TCA) (Bott 2007) wie beispielsweise *acn* (Aconitase) (Emer 2009) oder *sdhCAB* Succinatdehydrogenase (Bussmann 2009) gab es nur geringe Informationen zur Regulation von *gltA*. Bekannt war, dass bei Wachstum auf Acetat die Transkription von *gltA* 1,5- bis 2-fach höher ist als bei Wachstum auf Glucose (Gerstmeir 2003, Hayashi 2002, Muffler 2002). Dies stimmt auch mit der Beobachtung eines deutlich erhöhten Flusses über die CS bei Wachstum auf Acetat überein (Wendisch 2000). Ebenso konnte vor *gltA* ein mögliches Bindemotiv für den Regulator RamB identifiziert werden (Gerstmeir 2004). In Experimenten, bei denen mit Promotorbereichen verschiedener Gene des Zentralstoffwechsels Proteine aus zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* angereichtert

wurden, konnte der cAMP-abhängige Regulator GlxR von Sonya Hasenbein (pers. Mitteilung) identifiziert werden, später wurde durch Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) bestätigt, dass GlxR vor *gltA* bindet (Han 2008b).

3.3.1 *gltA*-Expression bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Aufgrund der verschiedenen Hinweise auf eine verstärkte Transkription von *gltA* bei Wachstum auf Acetat ergab sich die Frage, ob diese für einen oder beide Promotoren gilt, bzw. wie und ob die beiden Transkripte bei Wachstum auf Acetat und Glucose gebildet werden. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde zunächst das Wachstum des Wildtyps (ATCC13032,Wt) sowie des Stammes mit der Deletion des ersten Promotors (ATCC13032 Δ P*gltA*160), verglichen. Dabei wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA des Wt isoliert und in einem Northernblot analysiert (Abbildung 3.5).

Bereits in den vorangegangenen Versuchen war aufgefallen, dass die Deletion des ersten Promotors das Wachstum auf Glucose nicht deutlich verringerte. Zur Erinnerung: für Δ P*gltA*160 konnte bei einer OD_{600nm} von 10 bei Wachstum mit Glucose nur 16 % der spezifischen CS-Aktivität des Referenzstammes gemessen werden. Wie in Abbildung 3.5 bzw. in Tabelle 3.2 gezeigt, wurde für den Wildtyp bei Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose eine Wachstumsrate von $0,42 \text{ h}^{-1}$ ermittelt, was der typischen Wachstumsrate von *C. glutamicum* in diesem Medium entspricht. Der Stamm Δ P*gltA*160 zeigte mit einer Wachstumsrate von $0,36 \text{ h}^{-1}$ nur einen moderat ausgeprägten Phänotyp. Beim Vergleich des Wachstums mit einer Mischung aus 1 % Acetat und 2 % Glucose ist dieser Phänotyp deutlich ausgeprägter. Mit $0,18 \text{ h}^{-1}$ zeigte der Stamm Δ P*gltA*160 eine in etwa halbierte Wachstumsrate gegenüber dem Referenzstamm mit $0,34 \text{ h}^{-1}$. Der Wachstumsvergleich mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zeigte den deutlichsten Effekt. Die Deletion des ersten Promotors (P1) der CS in Δ P*gltA*160 ergab mit $0,08 \text{ h}^{-1}$ eine deutlich geringere Wachstumsrate gegenüber dem Referenzstamm, der mit $0,24 \text{ h}^{-1}$ dreimal so schnell wuchs. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Deletion des ersten Promotors nur geringe Auswirkungen auf das Wachstum mit Glucose, aber deutliche Auswirkungen auf das Wachstum mit Acetat hat. Dies führte zu der Hypothese, dass bei der Verstoffwechslung von Acetat die Expression des kürzeren Transkripts vom ersten Promotor (P1) eine wichtige Rolle spielt, während die Expression des längeren Transkripts vom zweiten Promotor (P2) für das Wachstum mit Glucose einen ausreichenden TCA-Zyklus-Fluss zulässt. Die Expression der beiden *gltA*-Transkripte sollten Northernblotanalysen der verschiedenen Zeitpunkte zeigen. In Abbildung 3.5 D ist zu sehen, dass bei Wachstum mit Glucose zu den frühen Zeitpunkten (2 h und 4 h) vor allem das längere Transkript von P2 ausgebildet wurde. Zu den späteren Zeitpunkten (8 h und 14 h) war zusätzlich das kürzere Transkript stark exprimiert und dominierte.

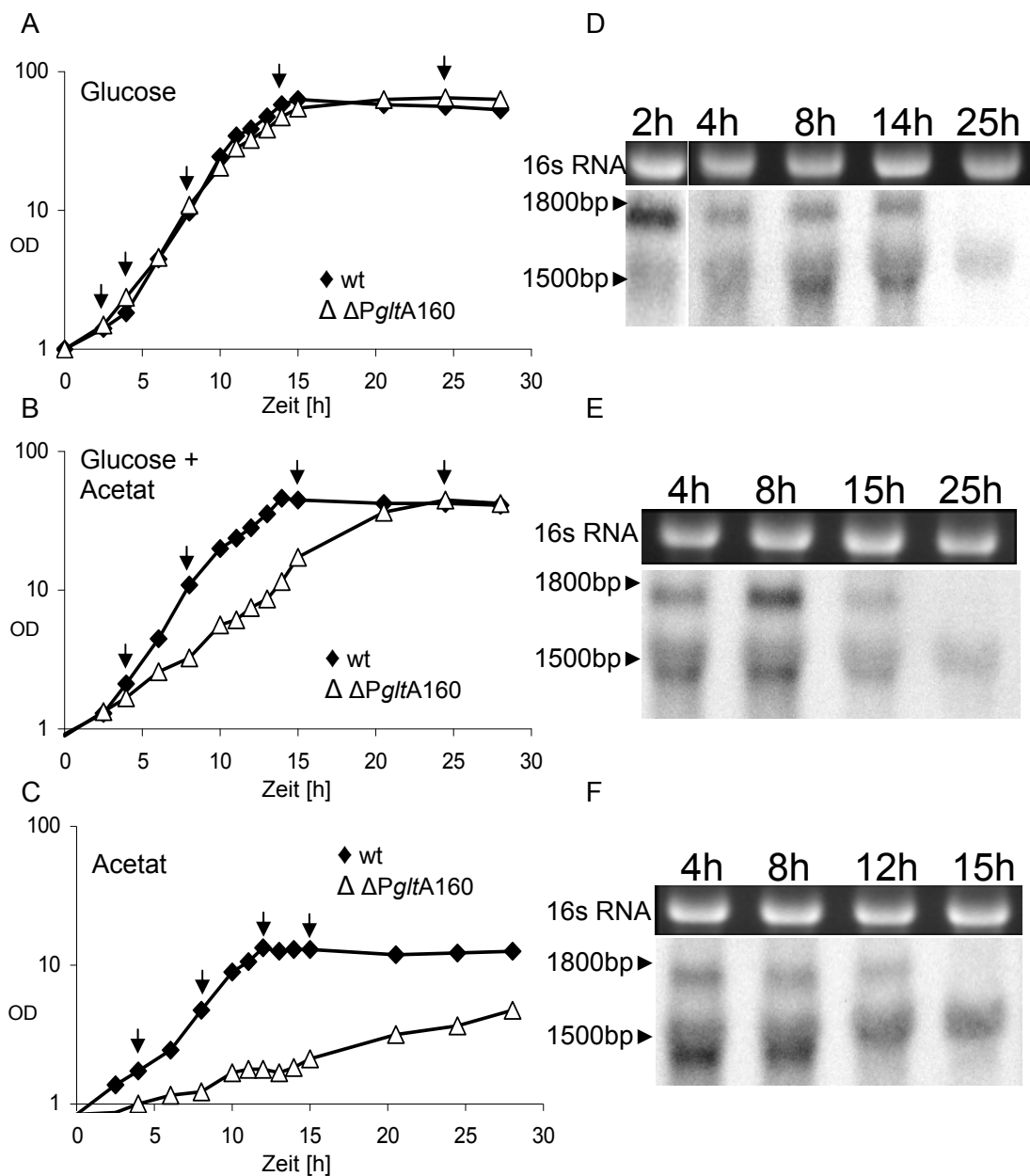


Abb. 3.5 Wachstumsvergleich von Wt und $\Delta PglA160$ mit unterschiedlichen Substraten

A-C Wachstum von Wildtyp und der $\Delta PglA160$ -Deletionsmutante in CGXII-Minimalmedium mit den Kohlenstoffquellen: **A** 4 % Glucose, **B** 1 % Acetat und 2 % Glucose, **C** 2 % Acetat. **D-F** Northernblotanalysen zu gegebenen Zeitpunkten des Wachstums mit **D** 4 % Glucose, **E** 1 % Acetat und 2 % Glucose, **F** 2 % Acetat. Pfeile in A-C geben die Zeitpunkte der Probenahme für die Northernblots D-F an.

Nach Erreichen der stationären Phase wird keines der beiden Transkripte mehr gebildet. Bei Wachstum mit Mischsubstrat aus Glucose und Acetat (Abb. 3.5 E) wurden zu den Zeitpunkten in der exponentiellen Phase (4 h und 8 h) beide Transkripte in etwa gleicher Menge gebildet. Nach Erreichen der stationären Phase (15 h) war die Expression der

Transkripte deutlich verringert bzw. nicht mehr nachweisbar (25 h). Der Northernblot mit den Proben der mit Acetat gewachsenen Zellen in Abbildung 3.5 F zeigte ebenfalls, dass beide Transkripte gebildet wurden, jedoch dominiert hier bereits zu den frühen Zeitpunkten das kleinere Transkript. Auch hier waren mit Erreichen der stationären Phase die Transkripte kaum bzw. nicht nachweisbar. Die Northernblots zeigten, dass bei der Verstoffwechslung von Glucose vor allem P2 für die Bildung der CS genutzt wurde, zur Verstoffwechslung von Acetat wurde zusätzlich das kurze Transkript exprimiert. Wächst *C. glutamicum* ausschließlich auf Acetat, war die Expression von P1 stärker als von P2. Dies steht in Einklang mit dem zuvor beobachteten Wachstumsverhalten des Wt und des Stammes mit der Deletion von P1 ($\Delta P_{gltA160}$) auf den unterschiedlichen Substraten.

Tab. 3.2 Wachstumsraten von wt und $\Delta P_{gltA160}$ für verschiedene Substrate

Stamm	Glucose (4%)	Glucose/Acetat (2%/1%)	Acetat (2%)
	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]
ATCC13032	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,25 ± 0,03
$\Delta P_{gltA160}$	0,36 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,08 ± 0,03

Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Experimenten

3.3.2 RamA und RamB regulieren die *gltA*-Expression

Die unter 3.1.3 gemachten Beobachtungen zeigten, dass die Expression von *gltA* für das Wachstum mit den Substraten Acetat und Glucose reguliert ist. Bei Wachstum mit Acetat wird das kurze Transkript von P1 verstärkt gebildet. Es war bekannt, dass für die Verstoffwechslung von Acetat vor allem das Zusammenspiel der beiden Regulatoren RamA (Cramer 2006) und RamB (Cramer 2007) wichtig ist. Aus diesem Grund wurde deren Einfluss auf die Expression der *gltA*-Transkripte und die spezifische CS-Aktivität untersucht. Die Deletionsstämme ATCC13032 $\Delta ramA$ ($\Delta ramA$) und ATCC13032 $\Delta ramB$ ($\Delta ramB$) der beiden Regulatoren lagen vor, und es wurde zunächst die Expression von *gltA* in diesen beiden Stämmen bei Wachstum mit Glucose charakterisiert. Hierzu wurde RNA von Zellen bei einer OD_{600nm} von 8 isoliert. Es fiel auf, dass in mehreren biologischen Replikaten der Stamm 13032 $\Delta ramA$ mit 0,22 h⁻¹ nur etwa die Hälfte der Wachstumsrate des Wildtyps und auch von 13032 $\Delta ramB$ zeigte.

Der Northernblot in Abbildung 3.6 zeigte, dass die beiden *gltA*-Transkripte im Stamm 13032 $\Delta ramA$ kaum nachweisbar waren. Die densitometrische Auswertung mehrerer Blots zeigte, dass das lange Transkript kaum und das kurze Transkript nur etwa halb so stark exprimiert wurde. Insgesamt war nur etwa ein Viertel der Transkriptmenge des Referenzstammes nachweisbar. Die Messung der spezifischen CS-Aktivität,

zusammengestellt in Tabelle 3.3, zeigte, dass die CS-Aktivität im Stamm 13032 $\Delta ramA$ ebenso deutlich verringert ist. Der Stamm 13032 $\Delta ramA$ vermag nicht mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, so konnte der Einfluss von RamA unter diesen Bedingungen nicht getestet werden. Feststand, dass der Regulator RamA bei Wachstum mit Glucose eine aktivierende Funktion für beide *gltA*-Transkripte hat, wie es auch für die meisten anderen bislang beschriebenen Zielgene von RamA der Fall ist. Dieser aktivierende Effekt war für das lange Transkript größer.

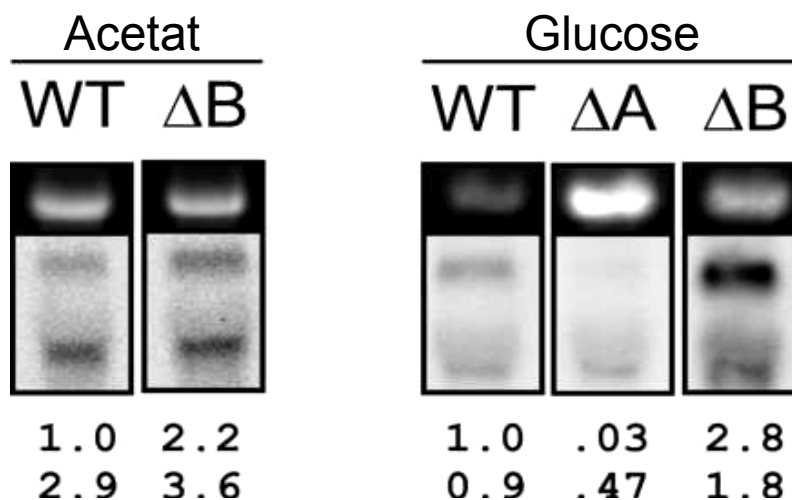


Abb. 3.6 Northernblot und densitometrische Auswertung von wt ATCC13032 und 13032 $\Delta ramA$ und 13032 $\Delta ramB$ mit den Kohlenstoffquellen Acetat und Glucose. Zahlenwerte geben die relativen Intensitäten der Banden wieder.

Für den Stamm 13032 $\Delta ramB$ konnte im Northernblot (Abb. 3.6) gezeigt werden, dass die Expression beider *gltA*-Transkripte im Vergleich zum Wt deutlich verstärkt war. Das kurze Transkript wurde etwa 2-mal so stark exprimiert wie im Referenzstamm, das lange sogar 3-mal so stark. Daraus ergibt sich in der Verrechnung für beide Transkripte eine 2,4-fach verstärkte Expression. Die Messung der spezifischen CS-Aktivität im zellfreien Extrakt (Tab. 3.3) zeigte ebenfalls eine etwa doppelt so starke Aktivität bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zum Wt. Für den Regulator RamB ist also eine Repressorfunktion bei Wachstum mit Glucose wahrscheinlich. Auch dies steht in Einklang mit den meisten bislang beschriebenen Beobachtungen zu Zielgenen dieses Regulators.

Bei Wachstum mit Acetat sind die Unterschiede in der Expression der *gltA*-Transkripte zwischen Referenzstamm und 13032 $\Delta ramB$ deutlich geringer. Wie die Auswertung des Northernblots in Abbildung 3.6 zeigt, ist für das kurze Transkript kein signifikanter

Unterschied festzustellen. Die Expression des langen Transkripts ist in 13032 $\Delta ramB$ etwa verdoppelt. In der Verrechnung beider Transkripte konnte also eine um den Faktor 1,5 verstärkte Expression im Stamm 13032 $\Delta ramB$ gegenüber dem Referenzstamm beobachtet werden. Im Vergleich der spezifischen CS-Aktivität der beiden Stämme bei Wachstum mit Acetat zeigte sich ebenfalls ein geringerer Unterschied als bei Wachstum mit Glucose. Gegenüber dem Wachstum auf Glucose zeigt der Wildtyp bei Wachstum mit Acetat eine etwa 25 % höhere spezifische CS-Aktivität. Im Stamm 13032 $\Delta ramB$ ist die CS-Aktivität noch etwa 25 % geringer bei Wachstum auf Acetat gegenüber dem Wachstum auf Glucose. Bei Wachstum mit Acetat konnte also für RamB ein deutlich geringerer Einfluss auf die *gltA*-Transkription festgestellt werden als bei Wachstum mit Glucose.

Tab. 3.3 Vergleich der spezifischen CS-Aktivität für verschiedene Substrate

Stamm	spezifische CS-Aktivität [$\mu\text{Mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	
	Glucose	Acetat
ATCC13032	0,99 \pm 0,02	1,26 \pm 0,03
$\Delta ramA$	0,12 \pm 0,02	k.A.
$\Delta ramB$	1,88 \pm 0,06	1,58 \pm 0,02

Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Regulatoren RamA und RamB einen deutlichen Einfluss auf die Regulation der *gltA*-Transkripte zeigen. Bei Wachstum mit Glucose ist RamA vermutlich ein Aktivator für die Expression beider *gltA*-Transkripte. RamB ist ein Repressor der Expression der beiden *gltA*-Transkripte.

In Zusammenarbeit mit Denise Emer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Eikmanns der Universität Ulm wurden durch Promotoranalysen mittels Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) als Reporter gen *cat* Studien mit verschiedenen Abschnitten des *gltA*-Promotors die Ergebnisse aus den densitometrischen Analysen der Northernblots bestätigt werden (van Ooyen 2010). Ebenso konnten die Bindestellen der beiden Regulatoren, wie in Abbildung 3.7 gezeigt, identifiziert werden. In Zusammenarbeit mit Michael Bußmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Bott konnte ebenso gezeigt werden, dass der cAMP abhängige Regulator GlxR ebenso wie RamB vor dem Promotor P2 bindet und bei Wachstum mit Glucose als Repressor der *gltA*-Expression wirkt (Dissertation, M. Bussmann).

Für RamA zeigten sich je zwei Bindestellen pro Promotor, dies stimmt also mit den Ergebnissen überein, dass RamA Einfluss auf die Expression beider Transkripte zeigt und zumindest bei Wachstum auf den untersuchten Medien eine dominante Rolle in der Regulation von *gltA* spielt. Für RamB zeigte sich, dass nur eine einzige Bindestelle vor P2

existiert. RamB zeigte auf die Expression des langen Transkripts einen deutlich stärkeren Effekt, dennoch zeigte die Deletion von RamB auch einen schwachen Effekt auf das kürzere Transkript. In Abwesenheit von RamB war die Expression beider Transkripte deutlich erhöht, doch der Einfluss von RamB auf die *gltA* Transkription ist insgesamt geringer als die von RamA.

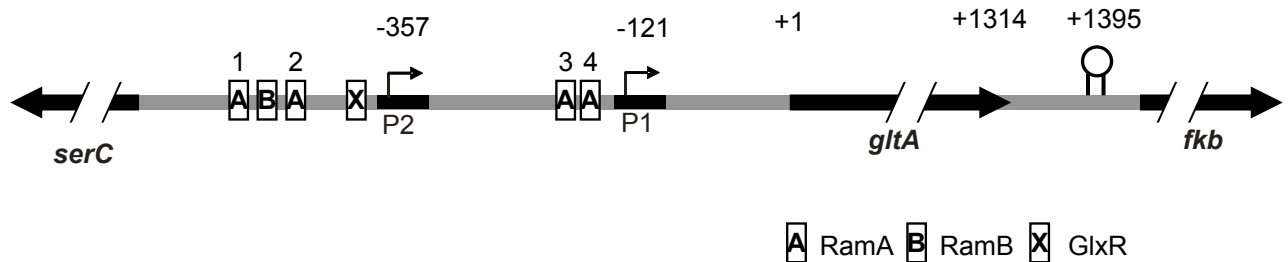


Abb. 3.7 Überblick der *gltA*-Promotorregion mit den Promotoren für *gltA*, sowie Bindestellen der Regulatoren RamA RamB und GlxR

Bindestellen für: RamA 1, -528 bis -522; RamB, -511 bis -499; RamA 2, -443 bis -438; GlxR, -417 bis -403; RamA3, -218 bis -211; RamA4 -184 bis -178.

3.4 Austausch der *gltA*-Promotoren

In den vorangegangenen Versuchen wurden die Bereiche vor *gltA* identifiziert, die für dessen Transkription und Regulation wichtig sind. Mit dieser Information konnten nun Promotoren ausgewählt werden, durch die dieser Bereich vollständig ersetzt werden sollte, um einen Satz von Stämmen mit verschiedenen CS-Aktivitäten zu generieren. Als erstes mussten hierfür geeignete Promotoren ausgewählt werden. Als ideal erwiesen sich hierbei Promotorvarianten des Dihydrodipicolinatsynthase-Gens *dapA* (Vasicova 1999). Die Reporteranalysen der unterschiedlichen artifiziellen *dapA*-Promotoren zeigten Promotoraktivitäten, die vom 500% bis zu 5 % der Aktivität des Wildtyp-*dapA*-Promotors reichten. Aus genomweiten Expressionsanalysen, die innerhalb des SysMAP-Konsortiums von Eonik Degussa zur Verfügung gestellt wurden, zeigte sich, dass die Expression von *dapA* etwa ein Fünftel der Expression von *gltA* beträgt. Aus dieser Betrachtung heraus sollte es durch Einsetzen der verschiedenen *dapA*-Promotorvarianten möglich sein, einen Satz von Stämmen mit abgestufter CS-Aktivität zu erstellen. Außerdem ist keine Regulation des sehr gut untersuchten *dapA*-Promotors bekannt, so dass es sehr wahrscheinlich war, dass er konstitutiv aktiv ist. Um den Einfluss der verminderten CS-Aktivität auf die Produktion von L-Lysin zu untersuchen, wurden die weiteren Untersuchungen im Stamm DM1800 durchgeführt. Es war bekannt, dass es in Stämmen, die eine verringerte oder keine CS-Aktivität aufwiesen, zu spontanen Mutationen kommen kann, welche zur Expression einer oder beider Methylcitratsynthasen (*prpC1* und *prpC2*) führen (Radmacher 2007). Beide

zeigen ebenfalls CS-Aktivität. Um dies auszuschließen, wurden zur Untersuchung der *gltA*-Expression und CS-Aktivität die Gene *prpC1* und *prpC2* im Stamm DM1800 deletiert und der Stamm mit DM1800' bezeichnet.

3.4.1 Auswahl der *dapA*-Promotoren

Die entsprechenden pET2-Vektoren mit den verschiedenen *dapA*-Promotoren (Vasicova 1999) wurden mir von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Miroslav Patek des Instituts für Mikrobiologie an der Akademie der Wissenschaften der tschechischen Republik in Prag zur Verfügung gestellt. Um geeignete Promotoren auszuwählen, musste untersucht werden, wie die Aktivität des Reportergens *cat* (Chloramphenicol Acetyltransferase) der Plasmide mit der Aktivität der Citratsynthase (CS) im Genom bei Expression durch den gleichen Promotor korreliert. Hierzu wurden die Promotoren A16, A8 und C5 ausgewählt (Tab. 3.4). A8 ist der Wildtyp-*dapA*-Promotor, A16 zeigte die stärkste CAT-Aktivität aller untersuchten Varianten und C5 zeigte eine der niedrigsten. Die Promotoren wurden aus den entsprechenden pET2-Vektoren durch PCR amplifiziert, in den Vektor pK19ΔPgltA_B über die Restriktionsspaltstellen XhoI und NsiI ligiert und durch zwei Rekombinationen in das Genom von DM1800' vor *gltA* eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden als DM1800'A8, DM1800'A16 und DM1800'C5 bezeichnet. Parallel wurde DM1800' mit den entsprechenden pET2-Vektoren A8, A16 und C5 transformiert. Neben diesen Stämmen wurden zur Kontrolle DM1800', DM1800'pET2 (Leervektor) und der *C. glutamicum* Wildtyp als Referenzen kultiviert.

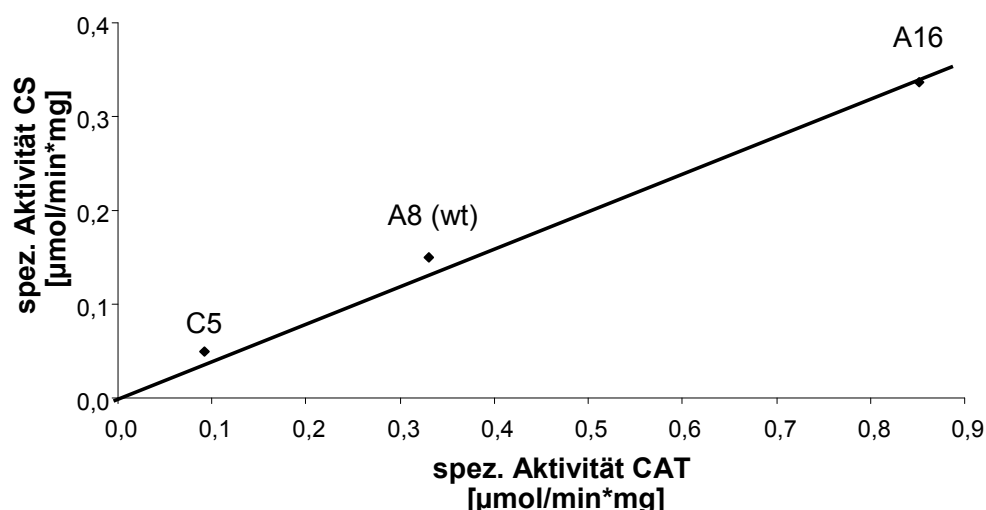


Abb. 3.8 Korrelation der spez. CAT-Aktivität (Vektor) mit der spez. CS-Aktivität (Genom) für die *dapA*-Promotorvarianten C5, A8 und A16

Zur Bestimmung der CAT- bzw. CS-Aktivitäten wurden die Stämme nach Vorkultivierung in CGIII- und CGXII-Medium zu einer OD_{600nm} von 1 in CGXII-Medium inokuliert und bei einer OD_{600nm} von 10 die CS bzw. CAT-Aktivität bestimmt. Hierbei fiel auf, dass die Stämme DM1800'A8 und vor allem DM1800'C5 deutlich langsamer wuchsen als die anderen Stämme. DM1800'A16 zeigte jedoch keinen deutlichen Wachstumsunterschied zu den Referenzstämmen (siehe auch 3.4.3). In der Auftragung der spezifischen CAT-Aktivität gegen die spezifische CS-Aktivität der Stämme mit den gleichen Promotoren in Abbildung 3.8 zeigt sich eine lineare Korrelation der Promotorstärken. Der Promotor A16 zeigt im Vektor vor dem *cat*-Gen eine etwa 3-mal höhere Aktivität als der Promotor A8, während er im Genom vor *gltA* integriert eine nur etwa doppelt so hohe Aktivität zeigt. Gegenüber dem Referenzstamm DM1800' zeigen die Stämme DM1800'A8, DM1800'A16 und DM1800'C5 eine deutlich verringerte spezifische CS-Aktivität. Für den Promotor A16 konnten 32 % der spezifischen CS-Aktivität des Referenzstammes gemessen werden, in A8 16 % und in C5 6 %. Mit Blick auf diese Ergebnisse konnten nun gezielt Promotoren aus dem vorliegenden Satz (Vasicova 1999) ausgewählt werden, die eine möglichst vollständige Bandbreite zwischen dem Promotor A16 und C5 aufwiesen.

3.4.2 Auswirkungen der reduzierten CS-Aktivität

Tab. 3.4 Vergleich der spezifischen CS-Aktivität der CS-Promotormutanten

Stamm	Sequenz -10 Region	spez. CS-Aktivität [$\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	spez. CS-Aktivität %
ATCC13032 wt	Wt <i>gltA</i> (s.o.)	1,075 ± 0,063	100
DM1800'	Wt <i>gltA</i> (s.o.)	0,993 ± 0,035	100
DM1800'A16	AGGTAACCT	0,319 ± 0,005	32
DM1800'A25	AGGTATCCT	0,259 ± 0,002	26
DM1800'A14	AGGTATAAT	0,239 ± 0,003	24
DM1800'A23	AGGTAACAT	0,225 ± 0,015	23
DM1800'A8	AGGTATCAT	0,156 ± 0,022	16
DM1800'L1	AGGCAACCA	0,158 ± 0,017	16
DM1800'B6	TTGTAACCT	0,127 ± 0,001	13
DM1800'C7	TAGTAACCT	0,101 ± 0,005	10
DM1800'C5	AGGTAGAAT	0,055 ± 0,001	6
DM1800' Δ PgltA160	<i>gltA</i> P2 (s.o.)	0,155 ± 0,017	16

Mittelwerte und Standardabweichungen 3er unabhängiger Experimente

Es sollte festgestellt werden, welchen Einfluss eine reduzierte CS-Aktivität sowohl auf das Wachstum als auch die Lysinausbeute von *C. glutamicum* hat. Aufgrund der festgestellten

Korrelation der Promotoraktivitäten zwischen vektorcodierter CAT und chromosomal codierter CS konnten nun die neun *dapA*-Promotoren A8, A14, A16, A23, A25, B6, C7, C5 und L1 (Tabelle 3.4) ausgewählt werden. Diese stellten die vielversprechendsten Kandidaten dar, um ein Aktivitätsspektrum zwischen 32 % und 6 % der spezifischen CS-Aktivität des Referenzstammes abzudecken. Die spezifischen Aktivitäten der resultierenden Stämme wurden wie unter 3.4.1 geschildert bestimmt und sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Als Ergebnis standen 9 Stämme mit abgestufter CS-Aktivität zur Verfügung, die näher charakterisiert werden sollten.

3.4.3 Bildung der CS-Proteine durch die *dapA*-Promotoren

Neben den spezifischen CS-Aktivitäten als Maß für die gebildete Menge an CS in den einzelnen Stämmen wurde zusätzlich für die Stämme DM1800', DM1800'A16, DM1800'A14, DM1800'L1 und DM1800'C7 mit einem spezifischen Antikörper (J. Schweitzer unv.) gegen die CS, die relative Menge des Proteins in der Zelle durch einen Westernblot ermittelt. Das Gen *dapA* zählt zu den Genen, deren Transkriptions- und Translationsstartpunkt auf das gleiche Nukleotid fallen; es entstehen also Transkripte ohne Leadersequenz. Bei der Konstruktion der Promotormutanten sollte jedoch nicht auf eine Ribosomenbindestelle (RBS) verzichtet werden. Aus diesem Grund wurden nach dem Transkriptionsstart 40 Nukleotide der *dapA*-Sequenz und weitere 14 Nukleotide vor dem Startcodon von *gltA* einschliesslich der RBS belassen, insgesamt also Nukleotide die für die folgenden 180 N-terminalen Aminosäuren kodieren: MSTGLTAKTGAARVGRN. Dieses Vorgehen für das CAT-Protein zu keiner Beeinträchtigung der Aktivität geführt. Ob es jedoch zur Translation einer um 18 Aminosäuren verlängerten CAT bzw. CS führt, wurde zuvor nicht geprüft. Es wurden je 10 µg Protein der unter 3.4.2 gewonnenen zellfreien Extrakte der Stämme auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Abbildung 3.9 zeigt den resultierenden Westernblot. Es zeigte sich, dass in DM1800' nur ein Protein für die CS von etwa 48 KDa (CS-Molekulargewicht = 49) gebildet wird, während für alle Stämme mit *dapA*-Promotor 2 Proteine für die CS gebildet werden, eines mit der identischen Größe der CS des Referenzstammes und ein weiteres, um 1,5-2 KDa größeres. Dies würde mit den 18 Zusätzlichen Aminosäuren (1,9 kDa) übereinstimmen. Ebenso wurde deutlich, dass die Intensität der CS-Banden, wie zuvor vermutet, um so stärker abnimmt, je geringer die spez. CS- Aktivität des jeweiligen Stammes ist. Ob das zweite entstehende Protein ebenso CS-Aktivität zeigt, wurde nicht geprüft, da das Ziel, die spezifische CS-Aktivität der Stämme graduell zu verringern, davon unabhängig ist.

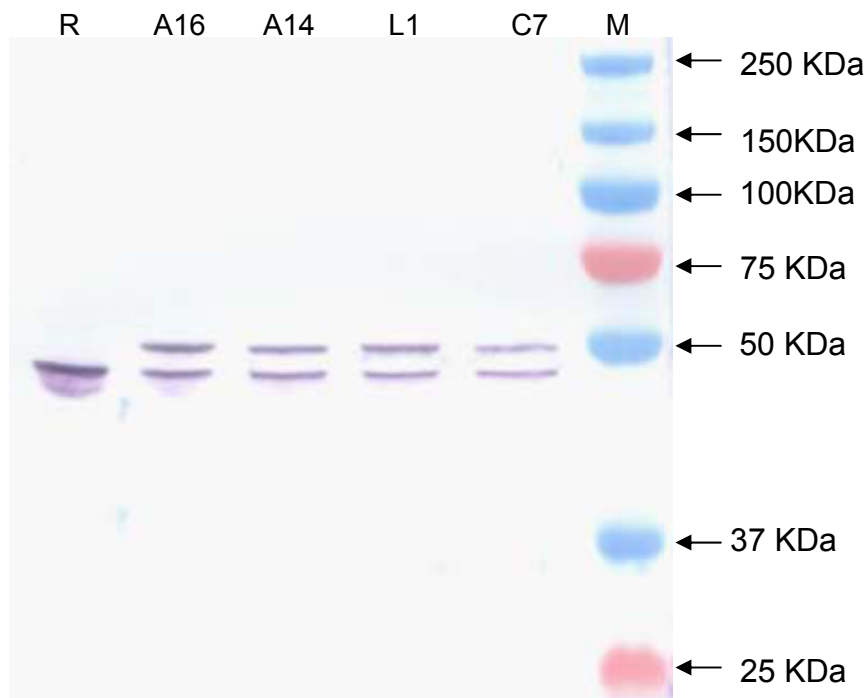


Abb. 3.9 Western-Blot-Analyse zur Detektion der Citratsynthase

Nachweis des CS-Proteins (49 kDa) in den Stämmen DM1800' (R), DM1800'A16 (A16), DM1800'A14 (A14), DM1800'L1 (L1) und DM1800'C7 (C7) durch einen spez. CS-Antikörper und einen zweiten, an alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper. M = Größenstandard

3.4.4 Verringerte CS wirkt sich auf Wachstum und Lysinausbeute aus

Einige der vorliegenden Stämme mit abgestufter CS-Aktivität waren bereits in den vorangegangenen Experimenten durch ein deutlich reduziertes Wachstum aufgefallen. Dies war erwartet worden, da durch die Oxidationen im Citratzyklus (TCA) sowohl der Hauptteil der zum Wachstum benötigten Energie in Form von NADH generiert wird, als auch Vorstufen der für die Proteinbiosynthese benötigten Aminosäuren. Die Frage, die es nun zu klären galt, war, ob die verringerte Aktivität der CS zu einem vergrößerten Stofffluss über anaplerotische Reaktionen in Richtung Lysinbiosynthese führt. Zunächst wurden dazu die Wachstumsraten der Stämme untersucht. Die Wachstumsraten wurden in drei biologischen Replikaten bestimmt. Hierzu wurde in der exponentiellen Wachstumsphase die Steigung der Ausgleichsgeraden ermittelt und der Mittelwert aus den Experimenten gebildet. Die Werte sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Überraschenderweise führte die 68 %ige Verringerung der CS-Aktivität in DM1800'A16, wie zuvor bereits beobachtet, nur zu einer geringen Veränderung der Wachstumsrate im Vergleich zum Referenzstamm DM1800'. Jede weitere Verringerung der CS-Aktivität führte jedoch zu einer deutlichen Reduktion der

Wachstumsrate. Der Stamm DM1800'C5 zeigte mit 6 % CS-Aktivität gegenüber dem Referenzstamm gleichzeitig auch die geringste Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$, die aber immer noch 40 % der Wachstumsrate des Referenzstammes entsprach. Es wurde deutlich, dass die Verringerung der CS-Aktivität in DM1800' unter das Niveau von 32 % der Ausgangsaktivität in einem verringerten Wachstum resultierte. Ebenfalls wurde festgestellt, dass die Lysinkonzentrationen der Kulturüberstände der Stämme mit reduzierter CS-Aktivität deutlich erhöht waren. Aus diesem Grund wurden bei Evonik Degussa in Halle (Westfalen), wiederum in 3 Replikaten, die Lysinkonzentrationen im Kulturüberstand der Stämme nach 20 und 40 Stunden unter GLP-Bedingungen bestimmt. Hierzu wurden 100 μl einer Dauerkultur in 10 ml CGXII-Medium mit 4 % Glucose inokuliert und nach 24-stündiger Kultivierung zu einer $\text{OD}_{660\text{nm}}$ von 0,1 in 10 ml CGXII-Medium mit 4 % Glucose inokuliert. Nach 20 und 40 Stunden wurden die Parameter Lysinkonzentration, optische Dichte und Glucosekonzentration bestimmt, die in Tabelle 3.5 zusammengestellt sind. Dabei zeigte sich, dass bis auf den Referenzstamm keiner der in der CS-Aktivität veränderten Stämme nach 20 Stunden die gesamte Glucose im Medium verbraucht hatte. Aus den Werten nach 40 Stunden ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen verringerter CS-Aktivität und erhöhter Lysinausbeute. Die Verringerung der CS-Aktivität führte also sowohl zu einem verringerten Wachstum als auch zu einer erhöhten Lysinausbeute. Wie bereits aufgrund des fehlenden Wachstumsunterschieds zu erwarten war, führt die Verringerung der CS-Aktivität auf 32 % des Referenzstammes bei DM1800'A16 nur zu einer geringen Verbesserung der Lysinausbeute von 15 % gegenüber dem Referenzstamm, steigt dann aber deutlich mit jeder weiteren Verringerung der CS-Aktivität. Mit 13,19 g/l im Kulturüberstand zeigte DM1800'C7 (10 % CS-Restaktivität) die höchste Lysinkonzentration aller Stämme. Diese ist um 76 % höher als die des Referenzstammes (7,51 g/l). Die höchste Nettoausbeute ($\text{g}_{\text{LysHCl}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$) jedoch zeigte der Stamm DM1800'C5 (6 % CS-Restaktivität) mit 0,32, was einer Steigerung der Ausbeute von 88 % entspricht. Aufgrund der sehr geringen Wachstumsrate war dieser Stamm nach 40 Stunden noch nicht ausgewachsen, und er hatte erst etwa ein Drittel der Glucose im Medium verwertet. Bei der Auswertung der Wachstumskurven wurde deutlich, dass neben der Wachstumsrate auch der Maximalwert für die $\text{OD}_{660\text{nm}}$ für jene Stämme geringer war, die eine geringere CS-Aktivität zeigten. Hierdurch verbessert sich für alle Stämme die Lysinausbeute pro Biomasse (Lys/OD) (Tab. 3.5). Sie ist mit 0,69 für den Stamm DM1800'C7 sogar um den Faktor 2,1 erhöht gegenüber dem Referenzstamm mit 0,33. Die Experimente zeigten, dass die Limitierung der CS-Aktivität sowohl zu einer Verringerung des Wachstumsrate und der gebildeten Biomasse als auch zu einer Verbesserung der Lysinausbeute führt.

Aufgrund dieser deutlichen Steigerungen der Lysinausbeuten im DM1800-Stammhintergrund wurden nun die *dapA*-Promotoren ebenso in den Stamm DM1933 eingebracht. Der Stamm

DM1933, mit deutlichen Veränderungen vor allem in den Genen der Lysinbiosynthese, zeigt bereits eine Lysinausbeute von 0,30-0,35 $\text{g}_{\text{LysHCl}} \text{g}_{\text{Gluc}}^{-1}$. Hierzu wurden in DM1933 ebenso wie in DM1800 zunächst die Methylcitratsynthasegene (*prpC1* und *prpC2*) deletiert; in dem resultierenden Stamm DM1933' wurden dann die beiden *gltA*-Promotoren durch die neun *dapA*-Promotorvarianten ausgetauscht. Die Ergebnisse, welche ebenfalls bei Evonik Degussa unter GLP-Bedingungen erhalten wurden, sind in Tabelle 3.6 zusammengetragen. In diesem ersten Experiment für den Stammhintergrund DM1933 zeigte sich, wenn auch weniger deutlich, die gleiche Tendenz wie bei DM1800. In einem weiteren Experiment (siehe Anhang), bei dem dem Medium zur Verbesserung des Wachstums der Stämme 2 g/l CSL beigemischt wurden, bestätigte sich die Tendenz, wenn auch auf etwas geringerem Niveau als zuvor. In weiteren Experimenten unter den eigenen Standard Kultivierungsbedingungen (siehe Material und Methoden) konnte bestätigt werden, dass der Stamm DM1933'C7 etwa 20 g/l Lys*HCl aus 40 g/l Glucose zu produzieren vermag; dies entspricht einer Ausbeute von 50 %. Dabei sind sowohl die Ausbeute als auch die Endkonzentration deutlich höher als die höchste bislang publizierte von 70 mM (12,7 g/l) aus 40 g/l (220 mM) Glucose unter vergleichbaren Bedingungen (Blombach 2009). Neben Lysin wurde der Kulturüberstand ebenfalls nach möglichen weiteren Nebenprodukten überprüft. Hierbei konnte keine weitere Aminosäure festgestellt werden, lediglich Nebenprodukte wie Acetat, Lactat und geringe Mengen an Trehalose wurden in der 20 h-Probe nachgewiesen (siehe Anhang).

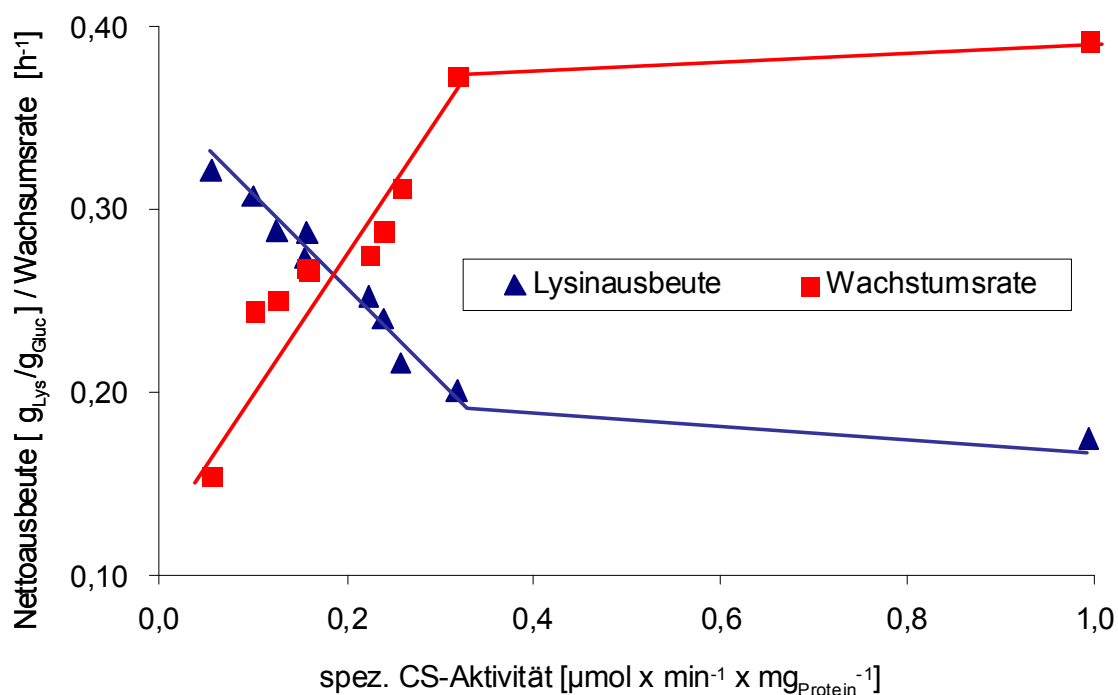


Abb. 3.9 Graphische Darstellung der spez. CS-Aktivität gegen die Nettoausbeute bzw. Wachstumsrate der DM1800-CS-dapA-Promotorvarianten

Tab. 3.5 Lysinausbeute und Wachstum der DM1800-CS-dapA-Promotormutanten

Die Tabelle zeigt die gemittelten optischen Dichten und Lysinkonzentrationen im Überstand nach 20 und 40 Stunden. Die Nettoausbeute (yield, Y) ist hierbei die produzierte Lysinmenge, bezogen auf die konsumierte Glucose, die Bruttoausbeute bezieht sich auf die Gesamtmenge Glucose im Medium. Ebenso angegeben sind Wachstumsraten und spezifische CS-Aktivitäten der Promotormutanten.

Stamm	Zeit [h]	Lys*HCl Konz [g L ⁻¹]	OD _{660nm}	Lys/ OD [g L ⁻¹ OD _{660nm} ⁻¹]	Y Netto [g g ⁻¹]	Y Brutto [g g ⁻¹]	spez.CS-Akt. [%]	Wachstumsrate [h ⁻¹]
DM1800'	20	5,89	29,44	0,20	0,14	0,14	100	0,39
DM1800'A16	20	6,87	26,72	0,26	0,17	0,16	32	0,37
DM1800'A25	20	5,76	23,57	0,24	0,18	0,14	26	0,31
DM1800'A14	20	4,93	18,92	0,26	0,20	0,12	24	0,29
DM1800'A23	20	5,35	17,98	0,30	0,20	0,13	23	0,27
DM1800'L1	20	3,93	14,68	0,27	0,21	0,09	16	0,27
DM1800'A8	20	3,47	10,63	0,33	0,23	0,08	16	0,27
DM1800'B6	20	3,71	11,52	0,32	0,24	0,09	13	0,25
DM1800'C7	20	2,45	7,39	0,33	0,26	0,06	10	0,24
DM1800'C5	20	0,69	0,98	0,70	0,42	0,02	6	0,15
DM1800'ΔPglA	20	1,04	8,50	0,12	0,10	0,02	16	0,33
DM1800'	40	7,51	22,66	0,33	0,17	0,17	100	0,39
DM1800'A16	40	8,63	27,16	0,32	0,20	0,20	32	0,37
DM1800'A25	40	9,31	24,78	0,38	0,22	0,22	26	0,31
DM1800'A14	40	10,32	22,52	0,46	0,24	0,24	24	0,29
DM1800'A23	40	10,84	23,98	0,45	0,25	0,25	23	0,27
DM1800'L1	40	11,75	24,11	0,49	0,27	0,27	16	0,27
DM1800'A8	40	12,36	21,48	0,58	0,29	0,29	16	0,27
DM1800'B6	40	12,38	22,77	0,54	0,29	0,29	13	0,25
DM1800'C7	40	13,19	19,12	0,69	0,31	0,31	10	0,24
DM1800'C5	40	5,66	7,82	0,72	0,32	0,13	6	0,15
DM1800'ΔPglA	40	4,76	19,79	0,24	0,11	0,11	16	0,33

Tab. 3.6 Lysinausbeute und Wachstum der DM1933-CS-dapA-Promotormutanten

Die Tabelle zeigt die gemittelten optischen Dichten sowie die Lysinkonzentrationen nach 20 und 40 Stunden. Ebenfalls angegeben sind die in je drei biologischen Replikaten ermittelten Wachstumsraten und spezifischen CS-Aktivitäten der einzelnen Promotormutanten. Die Stämme DM1933'A8 und DM1933'A25 zeigten bei Evonik in diesem Experiment kein Wachstum. Die CS-Aktivität von DM1933 entsprach mit 0,989 U der des Wt bzw der von DM1800.

Stamm	Zeit [h]	Lys*HCl Konz [g L ⁻¹]	OD _{660nm}	Lys/ OD [g L ⁻¹ OD _{660nm} ⁻¹]	spez.CS-Akt. [%]	Wachstumsrate [1 ^{-h}]
DM1933'	20	14,65	18,75	0,89	100	0,27
DM1933'A16	20	16,21	17,28	0,94	33	0,25
DM1933'A14	20	16,26	16,79	0,97	27	0,23
DM1933'A23	20	17,62	18,30	0,96	24	0,23
DM1933'L1	20	18,02	19,58	0,92	16	0,17
DM1933'B6	20	15,35	19,14	0,80	13	0,18
DM1933'C7	20	9,71	10,71	0,91	11	0,16
DM1933'C5	20	3,66	3,73	0,98	5	0,08
DM1933'ΔPglA	20	3,31	5,73	0,58	16	0,21
DM1933'	40	15,34	15,27	1,14	100	0,27
DM1933'A16	40	16,50	15,95	1,03	33	0,25
DM1933'A14	40	16,35	15,88	1,03	27	0,23
DM1933'A23	40	18,20	15,11	1,20	24	0,23
DM1933'L1	40	18,51	15,90	1,16	16	0,17
DM1933'B6	40	18,41	14,84	1,24	13	0,18
DM1933'C7	40	19,61	13,04	1,50	11	0,16
DM1933'C5	40	5,49	4,61	1,19	5	0,08
DM1933'ΔPglA	40	17,72	13,95	1,27	16	0,21

3.5 Globale Auswirkungen der CS Reduktion

Wie die bisherigen Experimente gezeigt hatten, hat die Reduktion der CS-Aktivität einen deutlichen Einfluss auf Wachstum und Lysinproduktion. Es scheint, dass dieser Eingriff in den Zentralstoffwechsel zu einem Umleiten des Kohlenstoffflusses in Richtung der Lysinbiosynthese führte. Die CS könnte demnach, wie bereits im Modell gezeigt, einen Schalter zwischen der Bildung von Biomasse auf der einen Seite und der Lysinbildung auf der anderen Seite darstellen. Um zu verstehen, ob dabei weitere Prozesse innerhalb der Zelle beteiligt sind, wurden zunächst vergleichende genomweite Expressionsanalysen der Stämme DM1800'A16 (30% CS), DM1800'A14 (24% CS), DM1800'L1 (16% CS) und DM1800'C7 (10% CS) mit dem Referenzstamm DM1800' durchgeführt.

3.5.1 Vergleichende genomweite Expressionsanalyse

Zur weiteren Charakterisierung der Promotoraustauschmutanten wurden die Transkriptome der genannten Stämme mit dem Referenzstamm verglichen. Hierzu wurden je Stamm mindestens drei Microarrays angefertigt. Es wurde aus je einer Kultur der zu vergleichenden Stämme die RNA nach Wachstum auf eine OD_{600nm} von etwa 10 präpariert. Zur Auswertung wurden nur Spots einbezogen, deren Fluoreszenzsignal für eine der Wellenlängen 5-fach über dem Hintergrund lag, deren Quotient aus den relativen Fluoreszenzen in mindestens 2 von 3 bzw. 4 Experimenten einem Faktor von mindestens 2 entsprach und nach einem t-Test als signifikant gegenüber allen Spots des Experimentes als reguliert gezeigt werden konnte (p -Value $>0,05$). War für einen Spot eine der Fluoreszenzen nach Abzug des Hintergrundes kleiner oder gleich 0, so wurde diese zur weiteren Berechnung auf 0,5 gesetzt.

Überraschenderweise war durch die Verringerung der CS-Menge der Stämme eine sehr deutliche Veränderung in der Expression einzelner Gene zu beobachten. Die Tabellen 3.7 und 3.8 zeigen die Veränderung der Expression der Gene durch Verringerung der CS-Aktivität. Angegeben sind die Mittelwerte der Quotienten aus mindestens 2 Experimenten. Wenn sich Gene für einen der Stämme als reguliert erwiesen, wurden die Werte für die weiteren Stämme zur Komplementierung der Tabelle ebenso angegeben.

Die Verringerung der *gltA*-Expression ist in den Transkriptomdaten der Stämme deutlich zu sehen, auch wenn der Faktor der Expressionsänderung in den einzelnen Stämmen nicht dem Faktor der CS-Aktivität entspricht. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Translationseffizienzen zurückzuführen. Am stärksten reagieren die Gene des Glyoxylatweges *aceA* (Isocitratlyase) und *aceB* (Malatsynthase). Schon bei 30 % CS-Restaktivität zeigt sich eine deutliche Steigerung der Expression dieser Gene gegenüber dem Referenzstamm, obwohl nur ein geringer Einfluss auf das Wachstum und die Lysinausbeute festgestellt wurde. Betrachtet man die stark heraufregulierten Gene in Tabelle 3.8 so fällt als gemeinsamer Punkt auf, dass diese durch mindestens einen der beiden Regulatoren RamA und RamB reguliert bzw. als durch einen der beiden reguliert vorhergesagt werden. Wie bereits unter 3.3 beschrieben, spielen die Regulatoren eine wichtige Rolle für *C. glutamicum* bei Wachstum mit Acetat oder auch Ethanol enthaltenden Medien. Bislang konnte allerdings für keinen der beiden Regulatoren ein Effektor identifiziert werden. Die Expression der Gene *pta*, *ack*, *aceA*, und *aceB* steigt stufenweise bei verringerter CS-Aktivität der einzelnen Stämme. Sie werden üblicherweise für die Verstoffwechslung von Acetat in *C. glutamicum* benötigt. Dies führte zu der Vermutung, dass die Verringerung der CS-Aktivität zu einem Rückstau des CS-Substrates Acetyl-CoA führen könnte und somit zu einer möglichen verstärkten Bildung von Acetat. Außerdem sprach die Expression der Gene *adhA* und *aadh*, die ebenso durch die genannten

Regulatoren reguliert wird und für die eine verstärkte Expression bei Wachstum mit Ethanol gezeigt wurde (Arndt 2008, Auchter 2009), für eine mögliche Bildung von Ethanol. Untersuchungen der Kulturüberstände von DM1800' und DM1800'C7 der identischen Proben zeigten jedoch, dass Ethanol nicht nachgewiesen werden konnte und die Mengen des gebildeten Acetats keine signifikanten Unterschiede aufwies (siehe Tabelle Nebenprodukte im Anhang). Diese Beobachtungen legten den Schluss nahe, dass die veränderte Expression dieser Gene auf Veränderungen interner Metabolitkonzentrationen zurückzuführen sein musste.

Das Operon aus *sucC* und *sucD*, das für die Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthase codiert, wird geringer exprimiert, je geringer die CS-Aktivität der Stämme ist. Bislang konnte gezeigt werden, dass es bei Wachstum mit Acetat geringfügig verstärkt exprimiert wird (Han 2008a). Das Gen *pck*, das für die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase codiert, wird ebenfalls geringer exprimiert, je geringer die CS-Aktivität der einzelnen Stämme ist. *In vivo* wurde gezeigt, dass es im Stoffwechsel die Reaktion von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat (PEP) katalysiert. Die Deletion dieses Gens führt in Lysinproduzenten zu einer Steigerung der Lysinproduktion, während eine Verstärkung der Expression zu einer verringerten Lysinproduktion eines Stammes führt (Riedel 2001). Die verringerte Expression von *pck* in den Stämmen mit deutlich verringerter CS-Aktivität könnte ebenfalls zur verbesserten Lysinausbeute der Stämme beitragen. Die Regulation von *pck* ist dabei nicht bekannt. Ein weiteres Gen, das ebenfalls essentiell für die Lysinproduktion ist, ist *lysE*, das für den Lysinexporter codiert und in DM1800'C7 etwa doppelt so stark exprimiert wird wie im Referenzstamm. LysE steht unter transkriptioneller Kontrolle des divergent transkribierten Regulators LysG (Bellmann 2001). LysG wirkt mit den Effektoren Lysin oder Arginin als Aktivator der LysE-Expression. Dies ist ein Hinweis auf erhöhte interne Lysinkonzentrationen der Zellen mit verringerter CS-Aktivität. Interessanterweise zeigten viele der Gene aufsteigende bzw. absteigende Expression, je geringer die CS-Aktivität der Stämme ist. Da die Stämme jedoch auch mit verringerter CS-Aktivität ebenso ein verringertes Wachstum zeigen, ist es möglich, dass ein Teil dieser Expressionsänderungen auf das verringerte Wachstum zurückzuführen sein könnte. Außer der deutlichen Antwort der von RamA und RamB regulierten Gene sowie von *lysE* ist eine Interpretation für die Regulation der weiteren Gene zunächst schwierig. Die Erwartung, mögliche Effekte auf transkriptioneller Ebene zum weiteren Verständnis der erhöhten Lysinausbeuten in den Stämmen mit verringerter CS-Aktivität zu erhalten, wurde nicht erfüllt.

Tab. 3.7 Relativer mRNA-Spiegel der in den Stämmen DM1800'A16, DM1800'A14, DM1800'L1 und DM1800'C7 gegenüber dem Referenzstamm Dm1800' schwächer exprimierten Gene

A16	A14	L1	C7	Annotierung / Gen	oligo
32%	24%	16%	10%		
0,16	0,20	0,23	0,12	<i>sucD</i> , succinyl-CoA synthetase alpha subunit	cg2836
0,33	0,24	0,17	0,13	<i>sucC</i> , succinyl-CoA synthetase subunit beta	cg2837
0,55	0,29	0,22	0,15	<i>malE</i> , malic enzyme	cg3335
n.d.	0,18	n.d.	0,28	putative secreted protein	cg0033
0,59	1,60	1,60	0,29	RNase P	cgs02
0,61	0,51	0,47	0,30	<i>pck</i> , phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	cg3169
0,56	0,44	0,40	0,30	cysteine sulfinate desulfinate/cysteine desulfurase	cg1214
1,12	0,83	0,79	0,31	<i>pgsA1</i> , phosphatidylglycerophosphate synthase	cg1878
1,21	0,99	1,09	0,31	glutamine amidotransferase, pyridoxine biosynthesis	cg0899
0,28	1,09	0,86	0,35	<i>arsC1'</i> , arsenate reductase, downstream of <i>arsC1</i>	cg1707
1,38	0,96	0,80	0,36	secreted oxidoreductase	cg0624
n.d.	0,10	n.d.	0,37	hypothetical protein cg0076	cg0076
1,11	0,57	0,71	0,38	<i>ilvB</i> , acetolactate synthase I large subunit	cg1435
1,04	0,76	0,56	0,39	<i>argF</i> , ornithine carbamoyltransferase	cg1584
n.d.	0,38	0,29	0,39	Na ⁺ /glutamate symporter	cg3080
0,92	0,87	0,92	0,40	GCN5-related N-acetyltransferase	cg2847
0,82	0,48	0,44	0,40	<i>glcA</i> , citrate synthase	cg0949
1,06	0,92	0,58	0,40	<i>argD</i> , acetylornithine aminotransferase	cg1583
0,63	0,46	0,43	0,40	<i>nadA</i> , quinolinate synthetase	cg1216
0,88	0,69	0,66	0,41	<i>panC</i> , pantoate--beta-alanine ligase protein	cg0148
0,61	0,47	0,42	0,43	<i>nadC</i> , nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	cg1215
1,02	0,82	0,72	0,43	iron/thiamine transport system, secreted component	cg0508
0,95	0,73	0,84	0,43	putative fructose-2,6-bisphosphatase	cg2581
1,06	0,87	0,81	0,44	putative pyridoxine biosynthesis enzyme	cg2450
n.d.	0,76	1,03	0,44	hypothetical protein cg2491	cg2491
n.d.	0,36	n.d.	0,45	hypothetical protein cg3376	cg3376
n.d.	0,75	n.d.	0,45	cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems	cg0748
1,38	0,89	0,77	0,45	cobalt transport system, permease component	cg0623
0,96	0,76	0,69	0,47	<i>purL</i> , phosphoribosylformylglycinamide synthase	cg2862
n.d.	0,81	1,01	0,48	putative lyse type translocator	cg0183
0,75	1,00	0,70	0,48	putative aminotransferase	cg0418
n.d.	0,24	n.d.	0,49	bacterial regulatory protein, Crp family	cg3291
n.d.	0,36	0,29	0,65	site-specific recombinases, DNA invertase	cg3274
0,46	0,46	1,14	0,69	<i>tnp2c</i> (ISCg2c), transposase	cg2854
0,43	0,47	0,47	0,82	ADP-ribose pyrophosphatase	cg1218
0,74	0,43	0,53	0,84	predicted transcriptional regulator	cg2320
n.d.	0,37	1,07	1,14	cation transport ATPase	cg3295

Tab. 3.8 Relativer mRNA-Spiegel der in den Stämmen DM1800'A16, DM1800'A14, DM1800'L1 und DM1800'C7 gegenüber dem Referenzstamm DM1800' stärker exprimierten Gene

A16	A14	L1	C7	Annotierung / Gen	oligo
32%	24%	16%	10%		
3,36	8,49	18,06	24,20	<i>aceA</i> , isocitrate lyase	cg2560
2,12	5,01	11,26	10,73	<i>aceB</i> , malate synthase	cg2559
1,70	3,33	3,92	6,95	<i>adhA</i> , Zn-dependent alcohol dehydrogenase	cg3107
2,26	4,58	6,43	6,91	<i>pta</i> , phosphate acetyltransferase	cg3048
2,77	4,56	4,88	6,51	<i>ackA</i> , acetate/propionate kinase	cg3047
2,01	2,35	1,88	5,39	aldehyde dehydrogenase	cg3096
1,02	1,73	3,33	3,80	slightly similar to aquaporin	cg3110
1,89	1,49	n.d.	3,56	hypothetical protein cg4002	cg4002
n.d.	1,27	n.d.	3,33	hypothetical protein cg0909	cg0909
1,06	3,15	3,95	3,26	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores	cg1832
2,42	2,62	3,97	2,97	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores	cg1833
1,03	1,37	1,47	2,89	conserved hypothetical membrane protein	cg0706
0,68	1,00	1,41	2,89	<i>tnp10a</i> (ISCg10a), transposase-fragment	cg1187
0,74	1,35	1,77	2,87	hypothetical protein cg2056	cg2056
0,54	1,31	2,10	2,78	hypothetical protein cg2054	cg2054
0,98	1,43	1,57	2,62	hypothetical protein cg2567	cg2567
n.d.	1,17	n.d.	2,54	putative secreted protein	cg1937
0,82	1,65	2,02	2,52	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport	cg2610
1,36	0,93	1,55	2,45	cation transport ATPase	cg3282
1,77	2,66	2,67	2,39	putative integral membrane protein	cg0952
n.d.	0,65	n.d.	2,34	hypothetical protein cg1967	cg1967
0,85	1,28	0,95	2,34	putative dicarboxylic acid hydrolase	cg0540
n.d.	1,24	1,62	2,27	<i>lip</i> , putative lipase	cg1676
0,90	0,98	1,31	2,25	putative pterin-4- α -carbinolamine dehydratase	cg0549
n.d.	5,38	6,27	2,25	hypothetical membrane protein	cg0018
1,10	0,99	1,42	2,24	<i>otsA</i> , trehalose-6-phosphate synthase	cg2907
0,86	1,11	1,33	2,21	hypothetical protein cg0463	cg0463
1,29	1,47	1,60	2,20	putative stress-responsive transcriptional regulator	cg1325
1,77	2,04	1,40	2,16	<i>lysE</i> , lysine efflux permease	cg1424
1,14	1,78	1,39	2,13	hypothetical protein cg1091	cg1091
0,71	0,95	1,39	2,12	hypothetical protein predicted by GlimMer	cg2438
0,37	1,14	1,69	2,12	hypothetical protein cg0380	cg0380
1,24	1,66	1,93	2,07	flavin-containing monooxygenase (FMO)	cg3195
n.d.	1,11	n.d.	2,06	hypothetical protein cg2000	cg2000
0,72	1,04	1,10	2,01	<i>cgtR10</i> , putative two component response regulator	cg1084
1,05	1,26	1,13	2,00	membrane-associated phospholipid phosphatase	cg3193
1,82	1,91	2,05	1,61	Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporter	cg0953
1,65	2,70	3,08	1,58	hypothetical protein cg0801	cg0801
0,88	1,40	2,16	1,31	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores	cg0778
2,31	1,08	0,84	1,08	rhodanese-related sulfurtransferase	cg3000
0,89	2,27	1,26	1,07	predicted permease	cg3112

3.5.2 Einfluss von *aceA*, *aceB*, *pck* und *odx* auf die Lysinausbeute

Die Gene des Glyoxylatzyklus *aceA* und *aceB* hatten in den Microarrays die deutlichsten Expressionsunterschiede gezeigt. Gegenüber dem Referenzstamm zeigten sie eine bis zu 24-fach bzw. 11-fach stärkere Expression. Um ihren Einfluss auf die Lysinausbeute näher zu untersuchen, wurden die Gene in DM1800' und DM1800'C7 deletiert und die resultierenden Stämme DM1800' Δ *aceAB* und DM1800'C7 Δ *aceAB* auf ihre Lysinproduktion hin untersucht. Zusätzlich wurde in DM1800' und DM1800'C7 das Gen *pck* deletiert. Diese Deletion zeigte für verschiedene L-Lysinproduzenten positive Auswirkungen auf die Lysinausbeute (Riedel 2001); da es in DM1800'C7 deutlich geringer exprimiert wird, könnte eine Deletion hier keinen zusätzlichen Einfluss haben. Ebenso wurde das Gen *odx*, dessen Produkt *in vitro* die Reaktion von Oxalacetat zu Pyruvat und CO₂ katalysiert (Jetten 1995), in beiden Stämmen deletiert. Diese Deletion zeigte bislang keine Auswirkungen in anderen *C. glutamicum* Lysinproduktionsstämmen. Da zunächst im stöchiometrischen Modell (S. Noack) ein sehr großer Fluss über dieses Enzym vorhergesagt wurde, sollte die Deletion ebenso die Möglichkeit zur Verbesserung des Modells geben.

Die Stämme wurden an den Kooperationspartner Evonik Degussa versandt und dort kultiviert und vermessen. Die Auswertung nach 40 Stunden ist in Tabelle 3.9 zusammengetragen. Die Kultivierung von DM1800'C7 gelang in diesem Experiment nicht, deshalb wurde auf die Daten einer vorangegangenen Kultivierung zurückgegriffen. Dies ist aufgrund der standardisierten Verfahren und der statistischen Abdeckung bei Evonik Degussa zulässig. Ein Einfluss auf die Bildung von Lysin durch die Gene des Glyoxylatzyklus *aceA* und *aceB* (Isocitratlyase und Malatsynthase) konnte noch nicht belegt werden. Für die Bildung von L-Threonin in *E. coli*, das ebenso wie L-Lysin aus L-Aspartat gebildet wird, konnte aber ein positiver Effekt der beiden Genprodukte nachgewiesen werden (Lee 2007). Die Deletion der beiden Gene führt im Stamm DM1800' Δ *aceAB* zu keiner signifikanten Verringerung der Lysinbildung. In DM1800'C7 Δ *aceAB* ist ein geringer Unterschied von 1 g/l (8 %) messbar. Da in *E. coli* eine um 30-50 % verbesserte Threoninausbeute gezeigt wurde, ist davon auszugehen, dass der Fluss über den Glyoxylatweg weder im Referenzstamm noch in der CS-Mutante groß ist und so eine Rolle bei der deutlichen Verbesserung der Lysinausbeute führt. Diese Information ist ebenso hilfreich für die Weiterentwicklung des stöchiometrischen Modells.

Wie erwartet, zeigte die Deletion von *pck* im Referenzstamm eine 12 %ige Steigerung der Lysinausbeute. Die gleiche Deletion hat in C7 jedoch keine positive Auswirkung. Vermutlich ist die Expression des Gens in dieser Mutante bereits so gering, dass sie keine negative Auswirkung auf den Oxalacetatpool der Zelle hat. Die Regulation, die zu einer verringerten Expression von *pck* führt, bleibt hierbei unklar, dennoch zeigt sich an diesem Beispiel, dass die Verringerung der CS-Aktivität zwar *per se* zu einer Verbesserung der Lysinausbeute

führt, gleichzeitig aber regulatorische Effekte in der Zelle zum Tragen kommen, die sich kumulativ positiv auf die Bildung von L-Lysin auswirken.

Viele genetische Veränderungen der Lysinproduktionsstämme zielen darauf ab, den Fluss Richtung Oxalacetat zu verbessern bzw. dessen Abbau zu verhindern. Bislang konnte allerdings kein Einfluss von *odx* auf die Lysinproduktion nachgewiesen werden (B. Eikmanns, pers. Mitteilung). Die Deletion von *odx* zeigte auch in diesem Experiment keinen positiven Einfluss auf die Lysinausbeute.

Tab. 3.9 Lysinausbeuten verschiedener Stämme nach 40 Stunden Kultivierung

Stamm	Lys*HCL g L ⁻¹	Y (P/S) Brutto (g g ⁻¹)
DM1800'	8,67	0,21
DM1800'Δpck	9,72	0,23
DM1800'ΔaceAB	8,37	0,20
DM1800'Δodx	8,65	0,21
DM1800'C7	13,19	0,31
DM1800'C7Δpck	12,53	0,30
DM1800'C7ΔaceAB	12,13	0,29
DM1800'C7Δodx	12,03	0,29

3.5.3 Bestimmung interner Metabolitkonzentrationen

Die deutlichen Einflüsse auf Wachstum und Lysinausbeute durch die Verringerung der CS-Aktivität in den erstellten Stämmen zeigten auf transkriptioneller Ebene keinen deutlichen Effekt innerhalb des Zentralstoffwechsels oder der Lysinbiosynthesewege, der die erhöhten Ausbeuten erklärt. Zur weiteren Charakterisierung der Stämme, wurde die quantitative Bestimmung der internen Metabolitkonzentrationen mit Unterstützung des IBT-2 genutzt. Der Vergleich der internen Metabolitkonzentrationen der Stämme sollte ebenso dazu beitragen, mögliche weitere Engpässe im Metabolismus zu identifizieren. Ebenso sollte die Frage adressiert werden, welcher Faktor für das verringerte Wachstum verantwortlich ist. Möglich ist, dass ein oder mehrere Bausteine (Metabolite) oder aber die Regeneration der Reduktionsäquivalente und damit die Energieversorgung der Zelle hierfür verantwortlich sind.

Die bereits bezüglich der globalen Genexpression charakterisierten Stämme DM1800', DM1800'A16, DM1800'A14, DM1800'L1 und DM1800'C7 (mit 100 %, 32 %, 24 %, 16 % und 10 % CS-Aktivität) wurden hierzu nach Vorkultivierung in CGIII-Medium und CGXII Medium mit 4 % Glucose zu einer OD_{600nm} von 0,5 in 50 ml CGXII-Medium mit 4 % Glucose inokuliert.

Bei einer OD_{600nm} von etwa 10 wurden 5 ml direkt zu 15 ml 60 %igem Methanol einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegeben, um alle Reaktionen zu stoppen. Je Stamm wurden drei Kulturen untersucht und in doppelter Bestimmung die Metabolitkonzentrationen bestimmt. Insgesamt wurden 3 dieser Experimente durchgeführt. In den Tabellen 3.10 und 3.11 sind die Mittelwerte eines Experimentes gezeigt. Aufgrund der hohen Sensitivität und des Messfehlers dieser Methode kommt es zu relativ großen Standardabweichungen bei den Messungen, wodurch signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen nur bei recht großen Unterschieden ermittelt werden können. Betrachtet man die einzelnen Stoffwechselwege, so fällt auf, dass die internen Konzentrationen für Metabolite der Glycolyse bei geringerer CS-Aktivität größer sind als im Referenzstamm. Am deutlichsten wird dieser Unterschied im Vergleich der beiden Stämme DM1800' und DM1800'C7. Der Faktor beträgt hier je nach Metabolit 1,5-2. Vor allem Phosphoenolpyruvat und Acetyl-CoA sind deutlich höher konzentriert in DM1800'C7. Beide Metabolite liegen im Stoffwechsel vor der Citratsynthese. Im Pentosephosphatweg (PPP) konnten für 6-Phosphogluconat und Erythrose-4-Phosphat signifikante Konzentrationsanstiege in den CS-Mutanten gemessen werden. Für den Citratzyklus (TCA), dessen erster Metabolit das Citrat ist, konnte eine signifikante Verringerung des Citrats in DM1800'L1 und DM1800'C7 nachgewiesen werden. Dies gilt ebenso, wenn auch in geringerem Maße für 2-Oxoglutarat. Auch bei Malat nimmt die interne Konzentration mit verringerter CS-Aktivität ab, während die Konzentration des Succinats leicht zunimmt. Für die Metabolite des Energiestoffwechsels zeigten sich bei verringerter CS-Aktivität erhöhte Konzentrationen von AMP und ADP bei unveränderter ATP Konzentration. Damit wies auch die Adenylat-Energie-Ladung (AEC) einen etwas geringeren Wert auf (siehe Tab. 3.10) (Chapman 1971).

Ein geringerer AEC der Zellen gilt als Indiz für Wachstumslimitierungen, beispielsweise bei Eintritt in die stationäre Phase, oder Substratlimitierungen. In *E. coli* wurde für exponentiell wachsende Zellen ein AEC von 0,8 gezeigt (Chapman 1971). Dies gilt ebenso für *C. glutamicum* unter den untersuchten Bedingungen (exponentielles Wachstum, in CGXII Minimalmedium, mit 4% Glucose) (S. Noack, pers. Mitteilung)

Die Konzentrationen der Reduktionsäquivalente NAD^+ und NADP^+ stiegen mit verringerter CS-Aktivität bis auf das Doppelte in DM1800'C7 gegenüber dem Referenzstamm, während die Konzentrationen von NADH und NADPH nur geringe Veränderungen aufwiesen. Da die Konzentrationen von NADH und NADPH sehr gering sind, ist der Messfehler und der Fehler zur Berechnung der Konzentration sehr groß, sodass sich über das Verhältnis der oxidierten zu den reduzierten Formen nicht viel aussagen lässt.

Tab. 3.10 Zellinterne Konzentration der Metabolite der Stämme DM1800' (R), DM1800'A16 (A16), DM1800'A14 (A14), DM1800'L1 (L1) und DM1800'C7 (C7)

Stamm	Glycolyse				
	R (100%)	A16 (32%)	A14 (24%)	L1 (16%)	C7 (10%)
Metabolit	μM	μM	μM	μM	μM
Glucose-6P	201 ± 30	195 ± 28	240 ± 33	243 ± 69	377 ± 38
Fructose-6P	68 ± 5	80 ± 13	86 ± 21	81 ± 17	116 ± 6
Fructose-1,6-BP	1877 ± 584	2506 ± 1185	2454 ± 1 285	2971 ± 735	4137 ± 98
Dihydroxyaceton-P	194 ± 48	169 ± 46	149 ± 33	155 ± 40	177 ± 21
GAP	41 ± 8	49 ± 13	40 ± 11	46 ± 7	59 ± 2
2-/3-PG	342 ± 52	405 ± 64	371 ± 64	392 ± 55	525 ± 25
Phosphoenolpyruvat	25 ± 8	25 ± 5	22 ± 3	25 ± 13	59 ± 3
Acetyl-CoA	31 ± 2	42 ± 4	40 ± 7	36 ± 5	50 ± 1
Pentosephosphatweg					
6P-Gluconat	39 ± 1 2	44 ± 13	37 ± 12	40 ± 13	79 ± 9
Ribose-5P	50 ± 9	54 ± 18	59 ± 12	42 ± 5	57 ± 3
Ribul-5P/Xyl-5P	122 ± 21	133 ± 42	153 ± 42	101 ± 13	146 ± 8
Sedoheptulose-7P	215 ± 73	181 ± 1 17	297 ± 116	174 ± 61	201 ± 11
Erythrose-4P	53 ± 8	57 ± 11	75 ± 8	62 ± 7	97 ± 7
Citratzyklus					
Citrat	815 ± 223	861 ± 173	1008 ± 2 93	522 ± 106	446 ± 7
cis-Aconitat	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,6	0,9 ± 0,6	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Isocitrat	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	11 ± 1	12 ± 1
2-Oxoglutarat	4990 ± 190	5320 ± 600	4180 ± 680	3380 ± 330	3890 ± 110
Succinat	845 ± 117	932 ± 217	858 ± 197	978 ± 50	1158 ± 12
Fumarat	18 ± 4	16 ± 2	12 ± 2	10 ± 3	9 ± 2
Malat	491 ± 212	280 ± 51	346 ± 109	313 ± 58	250 ± 18
Glyoxylat	83 ± 6	77 ± 8	72 ± 9	59 ± 5	55 ± 3
Energie					
AMP	195 ± 55	303 ± 162	334 ± 201	419 ± 58	481 ± 47
ADP	1232 ± 81	1437 ± 322	1624 ± 355	1723 ± 65	2104 ± 129
ATP	1991 ± 178	2189 ± 641	2493 ± 702	1914 ± 110	2118 ± 83
AEC*	0,76 ± 0,03	0,74 ± 0,09	0,74 ± 0,09	0,68 ± 0,02	0,67 ± 0,01
NAD	367 ± 89	506 ± 94	627 ± 94	559 ± 85	773 ± 30
NADH	4,2 ± 1,1	4,6 ± 1,0	4,6 ± 1,9	4,6 ± 1,1	7,2 ± 0,9
NADP	190 ± 7	227 ± 51	310 ± 16	301 ± 33	448 ± 12
NADPH	9,5 ± 0,6	9,3 ± 0,5	10,4 ± 0,7	9,4 ± 2,0	12,8 ± 0,6

Tab. 3.11 Intrazelluläre Konzentration der Metabolite der Stämme DM1800' (R), DM1800'A16 (A16), DM1800'A14 (A14), DM1800'L1 (L1) und DM1800'C7 (C7)

Metabolit	Aminosäuren				
	Stamm R (100 %)	A16 (32 %)	A14 (24 %)	L1 (16 %)	C7 (10 %)
	μM	μM	μM	μM	μM
Aspartat	9300 \pm 4400	12400 \pm 3600	21400 \pm 6600	20500 \pm 5300	41000 \pm 6600
Glutamin	25800 \pm 1160	21600 \pm 310	18400 \pm 320	16400 \pm 300	19900 \pm 300
Threonin	16 \pm 8	18 \pm 3	23 \pm 6	21 \pm 6	39 \pm 6
Serin	19 \pm 11	21 \pm 9	26 \pm 12	24 \pm 9	38 \pm 7
Lysin	2136 \pm 922	1341 \pm 552	2321 \pm 1671	2627 \pm 629	2469 \pm 260
Tyrosin	1,6 \pm 1,2	2,4 \pm 0,5	1,8 \pm 0,6	1,6 \pm 0,4	2,3 \pm 0,5
Glycin	237 \pm 127	292 \pm 49	306 \pm 129	322 \pm 84	293 \pm 79
Prolin	536 \pm 209	365 \pm 64	262 \pm 62	206 \pm 34	246 \pm 26
Methionin	0,7 \pm 0,5	0,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,5	1,5 \pm 0,8	1,7 \pm 0,3
Alanin	1780 \pm 920	1640 \pm 420	1860 \pm 760	2000 \pm 480	3450 \pm 530
Valin	1160 \pm 750	780 \pm 220	1130 \pm 420	1140 \pm 200	2030 \pm 330
Phenylalanin	4,9 \pm 3,2	3,7 \pm 0,9	5,0 \pm 1,1	4,0 \pm 1,1	5,1 \pm 1,2
Isoleucin/Leucin	20,2 \pm 11,7	14,6 \pm 5,4	21,2 \pm 6,9	20,0 \pm 4,8	35,1 \pm 5,6
Glutamat (mM)	225 \pm 74	214 \pm 19	192 \pm 39	184 \pm 25	222 \pm 26
Homoserin	25 \pm 12	28 \pm 4	34 \pm 8	33 \pm 7	48 \pm 8

*AEC, nach Chapman 1971, Dimensionslos

Die deutlichsten Konzentrationsunterschiede bestanden bei den Aminosäuren. Der höchste Anstieg war für das Aspartat zu beobachten. So ist die Konzentration in den Stämmen DM1800'A14 und DM1800'L1 etwa doppelt so hoch wie im Referenzstamm, in DM1800'C7 sogar 4-mal so hoch. Auch die vom Aspartat abgeleiteten Aminosäuren wie das Threonin, Methionin und auch Homoserin sind in DM1800'C7 gegenüber DM1800' etwa doppelt so hoch konzentriert. Aspartat wird direkt aus Oxalacetat gebildet, das aufgrund seiner Instabilität nicht nachgewiesen werden kann. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass die Oxalacetatkonzentration durch die Verringerung der CS-Aktivität steigt. Die Konzentration von Prolin in DM1800'C7 ist geringer als im Referenzstamm. Insgesamt nimmt die Prolinkonzentration mit verringerter CS-Aktivität ab. Die Bestimmung der internen Konzentrationen bildet einen stationären Zustand der Zellen ab. Die Flüsse über die Einzelreaktionen des Stoffwechsels lassen sich also nicht direkt nachvollziehen, dennoch sind die Konzentrationen ein Hinweis für den möglichen Anstau oder einen Mangel an Metaboliten.

3.6 Kohlenstoffbilanzen und Ratenbestimmung

Bislang wurde gezeigt, dass die Lysinausbeute durch die Verringerung der CS-Aktivität deutlich steigt, bei gleichzeitig sinkender Wachstumsrate. Dies entsprach in der Tendenz zunächst den Ergebnissen, die das stöchiometrische Modell von Stephan Noack bei verringertem Fluss über den Citratzyklus (TCA) zeigte. Ob jedoch die Flüsse, die das Modell vorgibt, ebenso *in vivo* vorliegen, konnte aus den bisherigen Ergebnissen nicht überprüft werden. Bei der Lysinproduktion mit Glucose entstehen in *C. glutamicum* 3 Hauptprodukte. Während der Wildtyp bei Wachstum mit Glucose etwa 50 % der aufgenommenen Glucose in Biomasse umsetzt, und die verbleibenden 50 % zu CO₂ werden, wird in Lysinproduzenten ein Teil des aufgenommenen Kohlenstoffs zu Lysin umgesetzt, das entweder von der Biomasse oder dem CO₂ abgezweigt wird. Das Modell hatte gezeigt, dass bei verringertem Fluss über den TCA sowohl die Bildung der Biomasse als auch die Bildung von CO₂ verringert sein könnten. Gleichzeitig können im Modell nur stationäre Flusslagen simuliert werden; damit ist nur ein Vergleich von Raten möglich. Um sowohl die Kohlenstoff-Bilanz als auch Aufnahme- und Efflux-Rate zu bestimmen, wurden Experimente im Bioreaktor durchgeführt.

3.6.1 Kultivierung der Stämme unter Batch-Bedingungen im Bioreaktor

Um zu überprüfen, inwieweit sich die in den Schüttelkolbenexperimenten beobachtete Lysinakkumulation auf eine *batch*-Fermentation übertragen lässt, wurden die Stämme DM1800' und DM1800'C7 (10 %-CS-Aktivität) in einer 4-fach „Multifors“-Anlage (Infors-HT, Basel, Schweiz) kultiviert. Für die Fermentationen wurde CGXII-Medium wie bei den Schüttelkolbenexperimenten verwendet; aufgrund der automatischen pH-Kontrolle wurde dabei auf die Zugabe der Puffersubstanz 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) verzichtet. Vor Fermentationsbeginn wurden die Bioreaktoren, die bereits mit 550 ml ungepuffertem CGXII-Minimalmedium ohne Glucose befüllt waren, mit Sensoren, Elektroden, Zufuhrstrecken und erforderlichen Anschlüssen autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Bioreaktoren auf Raumtemperatur wurde den Rührkesseln 50 ml einer 50 %igen Glucoselösung (4 % Endkonzentration) mit Spurensalzen, Biotin und Protocatechuat über eine sterile Verbindung zugeführt. Das vorgelegte Fermentationsmedium wurde zu einer OD_{600nm} von etwa 0,5 (15 ml, entspricht 2,5 % (v/v)) mit einer exponentiell wachsenden CGXII-Vorkultur beimpft.

Abbildung 3.10 zeigt den Prozessverlauf beim Wachstum je zweier Stämme DM1800' und DM1800'C7 im Bioreaktor. Zunächst zeigte sich, dass der Wachstumsunterschied der Stämme im Bioreaktor nicht so deutlich war wie der zuvor in den Schüttelkolbenexperimenten ermittelte. DM1800' zeigte eine Wachstumsrate von 0,35 h⁻¹,

die der im Schüttelkolben ermittelten Rate von $0,35 \text{ h}^{-1}$ entsprach. DM1800'C7 hingegen wuchs mit einer Wachstumsrate von $0,28 \text{ h}^{-1}$, wobei zuvor die Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ ermittelt worden war.

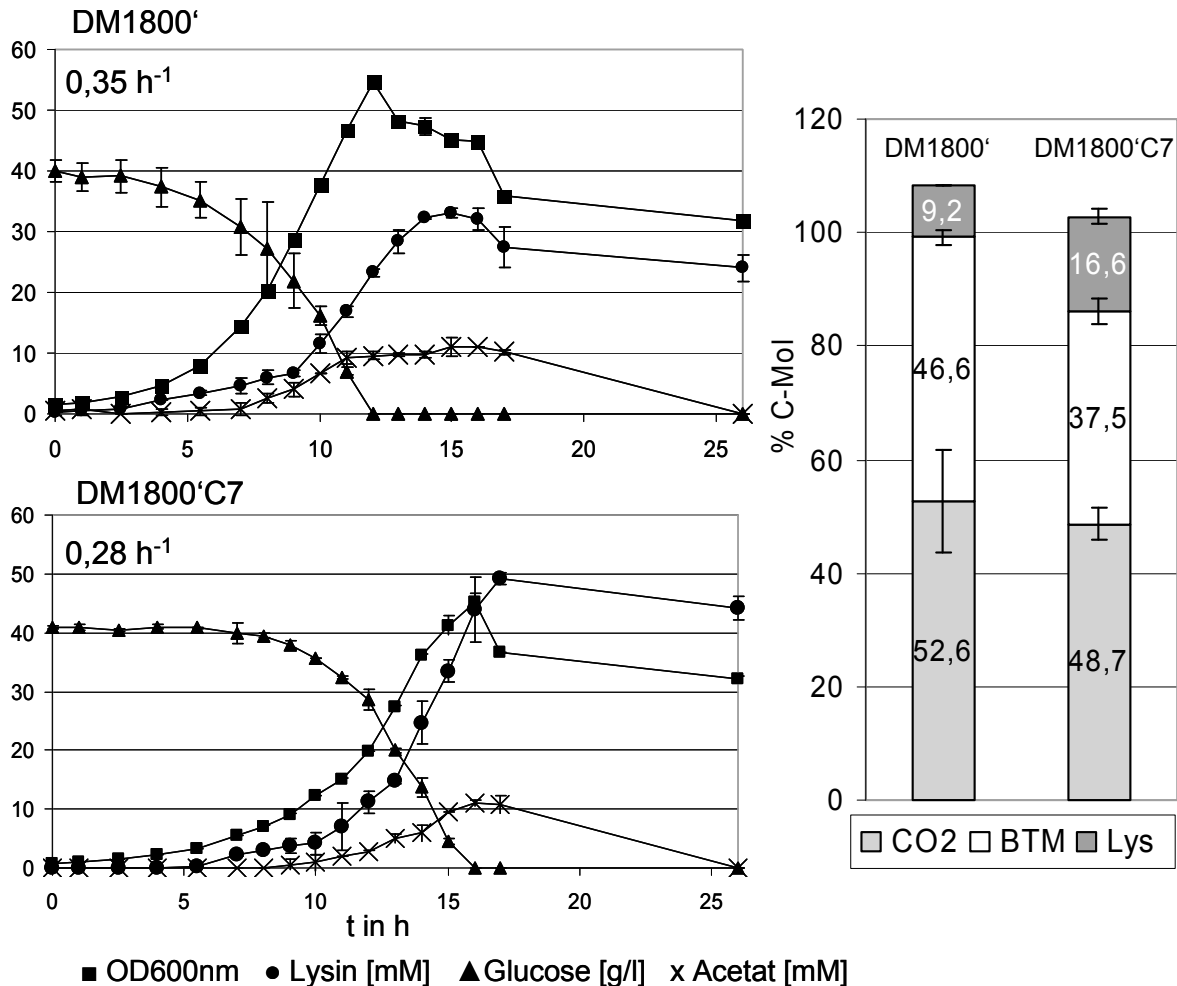


Abb. 3.10 Wachstum und C-bilanzen von DM1800' und 1800'C7 im Bioreaktor

Angegeben sind die gemittelten $OD_{600\text{nm}}$ Werte, sowie Konzentrationen von Lysin, Glucose und Acetat je zweier Bioreaktoren über den Zeitverlauf mit der jeweiligen Standardabweichung (links) und Mittelwerte der Kohlenstoffbilanzen der beiden Stämme in Mol-% Kohlenstoff der jeweils 2 Experimente mit Standardabweichung (rechts).

Die erzielten Lysinausbeuten sind für beide Stämme deutlich geringer, dennoch blieb die Tendenz die gleiche. Unter den gegebenen Bedingungen produzierte DM1800' maximal etwa 35 mM (6 g/l) Lysin, DM1800'C7 etwa 49 mM (8,8 g/l). Damit produziert DM1800'C7 unter Batchbedingungen 41 % mehr Lysin als DM1800', was deutlich unter der 75 %igen Verbesserung im Schüttelkolben lag. Dieser Unterschied lässt sich wahrscheinlich auf das deutlich verbesserte Wachstum zurückführen. Aufgrund der hohen Betriebskosten der Bioreaktoren im industriellen Maßstab ($>500 \text{ m}^3$) ist die wichtigste Größe für

Produzentenstämme die Raumzeitausbeute - eine Größe, die sich aus der maximalen Produktkonzentration und dem zur Produktion benötigten zeitlichen Aufwand ergibt.

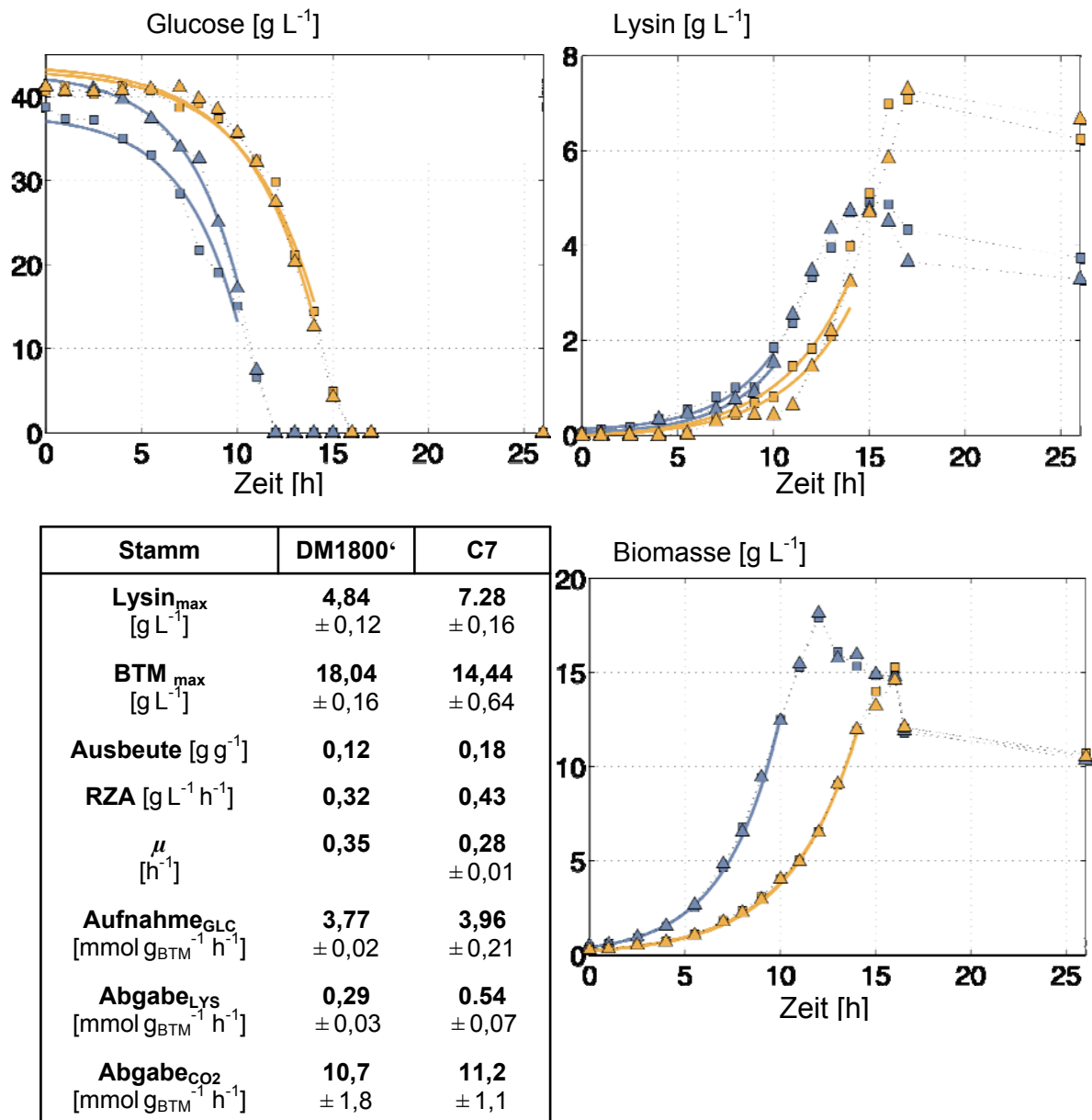


Abb. 3.11 Anpassung der extrazellulären Raten im Bioreaktor in der exponentiellen Wachstumsphase

Gezeigt sind die Abnahme der Glucosekonzentration sowie die Zunahmen an Lysin und Biomasse je zweier Bioreaktoren der Stämme DM1800' (blau) und Dm1800'C7 (gelb) über den Zeitverlauf. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Anpassungen an die experimentellen Datenpunkte. Die Tabelle zeigt die durch Anpassung an insgesamt je 4 Datensätze ermittelten Mittelwerte der extrazellulären Raten.

Die ermittelten Raumzeitausbeuten der Stämme sind $0,32 \text{ g}_{\text{Lys}} \times \text{l}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ für DM1800' und $0,43 \text{ g}_{\text{Lys}} \times \text{l}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ für DM1800'C7. Dies entspricht einer Verbesserung von 35 %. Beide Stämme zeigen eine transiente Akkumulation von Acetat, die mit einer Konzentration von etwa 10 mM typisch für *C. glutamicum* bei Wachstum mit Glucose ist (Han 2008a) und bis zu

30 mM betragen kann. Die Sauerstoffsättigung im Medium wurde durch Anpassung der Rührgeschwindigkeit und bei Bedarf Beimengung von reinem Sauerstoff auf einem konstanten Wert von 30 % der Maximalkonzentration gehalten, wodurch die Bildung von Lactat, die im Schüttelkolben bis zu 150 mM betragen kann, verhindert wurde. Für die Lysinbildung zeigt sich ein typischer Verlauf, der erst eine bis zwei Stunden, nachdem keine Glucose mehr im Medium nachgewiesen werden kann, endet. Hierbei ist unklar, aus welcher Quelle sich die Lysinbildung speist. Die Untersuchung auf mögliche weitere Nebenprodukte via HPLC und MALDI-TOF-MS zeigte bis auf typische, geringe Mengen an Trehalose (0,5 mM) keine Nebenproduktbildung. Die Kohlenstoffbilanzen wurden erstellt und konnten mit einem Fehler innerhalb von 10 % geschlossen werden. Als Zeitpunkt wurde derjenige gewählt, zu dem Glucose das letzte Mal nachweisbar war (exponentielle Phase). Die Kohlenstoffbilanz zeigt deutlich, dass während des exponentiellen Wachstums die CO₂-Produktion beider Stämme keine signifikanten Unterschiede aufwies, was zunächst in klarem Widerspruch zur Modellannahme steht, dass die Verringerung des TCA Flusses zu verringerter Produktion von CO₂ führen müsste. Das Mehr an Lysin, das in DM1800'C7 gegenüber dem Referenzstamm gebildet wird, speist sich vollständig aus dem geringeren Wachstum bzw der verringerten Bildung von Biomasse. Zusätzlich wurden aus den Daten dieses und eines zweiten Experimentes, (je 4 vollständige Datensätze pro Stamm) durch Anpassung mit Hilfe eines Prozessmodells die spezifischen extrazellulären Raten wie Glucoseaufnahme und Produktion von Biomasse, Lysin und CO₂ ermittelt (Abbildung 3.11). Es zeigte sich, dass die spezifische Glucoseaufnahmerate und CO₂-Produktionsrate der Stämme keine signifikante Veränderung zeigten, während die Produktionsrate von Lysin in DM1800'C7 etwa doppelt so hoch war wie in DM1800'. Die ermittelten Raten konnten nun zum Vergleich mit den im Modell generierten genutzt werden.

3.7 Supplementation der DM1800-CS-dapA-Promotormutanten

Um besser verstehen zu können, welcher Faktor für das geringere Wachstum der Stämme mit geringer CS-Aktivität verantwortlich ist, wurde untersucht, ob die Zugabe bestimmter Supplemente zur Verbesserung des Wachstums führen kann. Die Verringerung der CS-Aktivität lässt ebenso auf einen verringerten Fluss über die CS schließen. Hierdurch sollte der Fluss über Citrat zu 2-Oxoglutarat und damit zu den Aminosäuren, die aus Glutamat hervorgehen (Glutamin, Prolin und Arginin) verringert sein. Um zu untersuchen, ob ein Mangel dieser Aminosäuren der einzige Grund für das verringerte Wachstum ist, wurden Wachstumsversuche der Stämme DM1800', DM1800'C7 und DM1800'C5 in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose und Supplementation von je 4 mM der Aminosäuren Prolin, Arginin und Glutamat durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Wachstumssteigerung von 20% bzw 60% der Stämme DM1800'C7 und DM1800'C5.

3.7.1 Supplementation mit Glutamat, Arginin, Prolin und Citrat

Um nun zu prüfen, ob bereits die Zugabe einer dieser Aminosäuren zu einem verbesserten Wachstum führt, wurden wiederum Wachstumsversuche in Schüttelkolben mit je 4 mM der einzelnen Aminosäuren durchgeführt, die sowohl der Vorkultur als auch der Hauptkultur zugegeben wurden. Ebenfalls wurde getestet, ob die Zugabe von 4 mM Citrat einen Einfluss auf das Wachstum zeigt. Tabelle 3.12 zeigt die Mittelwerte der Wachstumsraten für die Stämme, die in drei unabhängigen Kultivierungen ermittelt wurden.

Es war deutlich zu beobachten, dass durch die Zugabe von Prolin die Wachstumsrate für die Stämme DM1800'C7 und DM1800'C5 zunimmt. Die Zugabe von Glutamat, Arginin und Citrat hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss. Mit Prolin wächst der Stamm DM1800'C7 etwa gleich schnell wie der Referenzstamm, die deutlichste Steigerung war jedoch für den Stamm DM1800'C5 zu beobachten. Durch Zugabe von Prolin wächst dieser Stamm fast doppelt so schnell wie ohne. Verblüffenderweise produzierten die mit Prolinzugabe schneller wachsenden Stämme zudem bis zu 10 % mehr Lysin als ohne Prolin, was in Widerspruch zu der Aussage steht, dass isogene Stämme bei verringertem Wachstum mehr Lysin produzieren (Coello 1992)

C. glutamicum kann mit Citrat (Polen 2007), Glutamat (Kramer 1990) und Prolin (Bott 2003) als einzigen Kohlenstoffquellen wachsen. Bei Wachstum mit Glucose können sowohl Arginin (Ergebnisse der eigenen Gruppe, N. Stähler), Citrat (Polen 2007), als auch deutlich schlechter Glutamat (Kramer 1990) aufgenommen werden. Alle drei zeigten jedoch keinen Einfluss auf die Wachstumsraten der Stämme. Prolin kann als kompatibles Solut bei osmotischem Stress in *C. glutamicum* auch bei Wachstum mit Glucose sehr gut aufgenommen werden und auch weiter verstoffwechselt werden. Dabei kann Prolin durch die drei verschiedenen Transporter PutP, ProP und EctP (Peter 1998) aufgenommen werden und möglicherweise durch die bifunktionale Prolindehydrogenase PutA in zwei Oxidationsschritten, bei denen je zwei Elektronen auf Menachinon und NAD^+ übertragen werden, zu Glutamat umgesetzt werden. Prolin kann also als Baustein selbst wichtig sein und das Wachstum verbessern, sowie zu den möglichen drei weiteren Mangelsubstraten (Glutamat, Arginin und Glutamin) umgesetzt werden. Hinzu kommt, dass die Elektronen aus Prolin möglicherweise direkt bzw. indirekt in die Atmungskette eingeschleust werden und so zu einer verbesserten Energieverfügbarkeit der Zellen beitragen, die möglicherweise die Wachstumslimitierung bedingt. Als drittes ist Prolin ein kompatibles Solut, das in *C. glutamicum* zur Osmoregulation gebildet und/oder aufgenommen wird. Die Bestimmung der internen Metabolitkonzentrationen hatte gezeigt, dass die Prolinkonzentration mit sinkender CS-Aktivität deutlich abnimmt. Es ist also ebenso möglich, dass die Zellen neben den

anderen beiden Mangelsituationen zusätzliche Schwierigkeiten bei der Osmoregulation haben, wozu es jedoch keinen Anhaltspunkt in den genomweiten Transkriptionsanalysen gibt.

Tab. 3.12 Wachstumsraten der Stämme nach Zugabe verschiedener Supplemente

CGXII 4% Glucose Supplement (4 mM)	Wachstumsrate [h^{-1}]		
	DM1800' (100 % CS)	DM1800'C7 (10 % CS)	DM1800'C5 (6 % CS)
Ohne	0,37 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01
Glutamat	0,35 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02
Prolin	0,39 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01
Arginin	0,37 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	0,15 \pm 0,03
Citrat	0,37 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01

3.7.2 Charakterisierung der Prolin-Supplementation von DM1800'C7

Bei der postulierten Umsetzung von Prolin über PutA zu Glutamat werden zwei Elektronen direkt in die Atmungskette eingespeist und es entsteht ein NADH. Aus diesem Grund wurden weitere Supplemente ausgewählt, bei deren Verstoffwechselung der Zelle Elektronen zur Verfügung gestellt werden. Diese sind Pyruvat und D-Lactat, auf denen *C. glutamicum* als einzigen Kohlenstoffquellen wachsen kann und bei deren Aufnahme ebenfalls Elektronen direkt in die Atmungskette eingeschleust werden können (Bott 2003). Diese Versuche wurden wiederum im Bioreaktor durchgeführt, um mögliche Veränderungen der Sauerstoffaufnahme feststellen zu können. Die Auswertung der Wachstumsraten zeigte für das Wachstum mit Pyruvat und D-Lactat eine deutliche Minderung der Wachstumsrate auf 0,22 gegenüber dem Wachstum auf CGXII ohne Supplementation, das 0,28 betrug (Daten nicht gezeigt), weshalb diese Experimente abgebrochen wurden. Bei Supplementation mit Glutamat wurde eine Wachstumsrate von 0,25 festgestellt, die etwas geringer war als die von 0,28 ohne Supplementzugabe. Die Zugabe von Prolin zeigte wie bereits im Schüttelkolben eine deutliche Zunahme der Wachstumsrate auf 0,32. Dies entspricht allerdings nicht der zuvor bestimmten Wachstumsrate des Referenzstammes ohne Supplement von 0,35, wie es in den Schüttelkolbenexperimenten beobachtet worden war. Die Lysinausbeute lag für den mit Prolin gewachsenen Stamm etwa 10 % über der Ausbeute desjenigen, der mit Glutamat supplementiert worden war. Dieses Ergebnis wurde bereits in den Schüttelkolbenexperimenten gezeigt. Dennoch blieb es ein überraschender Befund, da

sowohl Wachstum als auch Lysinausbeute deutlich verbessert waren, Faktoren von denen angenommen wurde, dass sie sich ausschließen. Weitere Untersuchungen zur Atmungsrate bei Supplementation mit Prolin und Glutamat haben gezeigt, dass diese nicht signifikant verändert sind (Daten nicht gezeigt).

Um den Effekt von Prolin auf den Stamm DM1800'C7 eingehender zu charakterisieren, wurden bei einer OD_{600nm} von 5 aus je zwei parallel laufenden Bioreaktoren Proben entnommen, um daraus die RNA zu präparieren, und diese in genomweiten Expressionsanalysen zu untersuchen. Das Ergebnis aus 2 Transkriptomvergleichen ist in den Tabellen 3.13 und 3.14 zusammengetragen.

Tab. 3.13 Relativer mRNA-Spiegel von DM1800'C7 mit Prolin gegenüber DM1800'C7 mit Glutamat stärker exprimierten Gene

Prolin/Glutamat			Annotierung / Gen	Oligo
Chip1	Chip2	Ø		
5,28	4,84	5,05	flavin-containing monooxygenase 3	cg1292
4,12	4,01	4,07	hypothetical protein cg0801	cg0801
3,41	4,1	3,72	<i>proP</i> , proline/ectoine carrier	cg3395
3,30	2,08	2,55	<i>cspA</i> , cold-shock protein CSPA	cg0215
2,25	2,30	2,27	<i>betP</i> , glycine betaine transporter	cg1016
2,56	2,04	2,27	ABC-type transport system, lipoprotein release	cg3321

Tab. 3.14 relativer mRNA-Spiegel von DM1800'C7 mit Prolin gegenüber DM1800'C7 mit Glutamat schwächer exprimierten Gene

Prolin/Glutamat			Annotierung / Gen	Oligo
Chip1	Chip2	Ø		
0,19	0,30	0,25	allophanate hydrolase subunit 1	cg1140
0,26	0,25	0,26	allophanate hydrolase subunit 2	cg1139
0,28	0,31	0,30	hypothetical protein cg1141	cg1141
0,39	0,27	0,33	acetyltransferase	cg1417
0,46	0,34	0,40	<i>irp1</i> , DtxR/iron regulated lipoprotein precursor	cg0771
0,46	0,41	0,44	putative Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporter	cg1142
0,46	0,46	0,46	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores	cg0924

Die Analyse der Transkriptome zeigen, dass es trotz des sehr deutlichen Phänotyps nur geringe Unterschiede in der Expression mit den unterschiedlichen Supplementen gibt. Für Prolin war lediglich eine verstärkte Expression des Transporters ProP für dessen Aufnahme zu beobachten sowie auch des Transporters BetP, der ebenfalls bei der Osmoregulation eine Rolle spielt, allerdings bislang nur als Betain-Transporter beschrieben ist (Peter 1996). Am stärksten reguliert zeigten sich eine Monooxygenase unbekannter Funktion und ein

Protein unbekannter Funktion. Bei Wachstum mit Glutamat reagieren die Untereinheiten einer möglichen Allophanathydrolase am stärksten, die in Organismen ohne Urease für die Verstoffwechslung von Harnstoff zuständig sind. Möglich ist, dass diese Gene durch das verstärkte Stickstoffangebot durch die Aufnahme von Glutamat heraufreguliert oder durch die Aufnahme von Prolin herunterreguliert wird. Zusätzlich ist ein weiteres Gen (cg1141) unbekannter Funktion, das konvergent zu den beiden zuvor genannten transkribiert wird, verstärkt exprimiert. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein Operon handelt. Insgesamt bietet der Vergleich jedoch keine schlüssige Antwort, warum DM1800'C7 mit Prolin einen solchen Wachstumsvorteil hat. Aufgrund der geringen Expressionsunterschiede wurde auf die Vergleiche weiterer Transkriptome, zur Untersuchung des Wachstums mit und ohne Prolin verzichtet.

3.7.3 Vergleich von Prolin- und Betainzugabe bei reduzierter CS-Aktivität

Aus der Literatur ist bekannt, dass in *C. glutamicum* bei hohen externen Osmolalitäten (1,5-2 osmol) die Prolinkonzentration in den Zellen etwa 10-fach ansteigen kann, um dem osmotischen Druck entgegenzuwirken (Varela 2003). Zusätzlich können bei osmotischem Stress kompatible Solute wie Glycin-Betain oder Ectoin aufgenommen werden, wenn sie im Medium vorliegen (Peter 1998). Dabei kann Prolin durch *C. glutamicum* synthetisiert werden, während sowohl Ectoin als auch Glycin-Betain nur von außen aufgenommen, aber nicht metabolisiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass bei hohem osmotischen Stress die Zugabe von Betain die Produktivität eines Lysinproduzenten (MH20-22B) in den frühen Wachstumsphasen verbesserte, während die Gesamtausbeute gleich blieb (Ronsch 2003). Allerdings sind die Osmolalitäten im genutzten CGXII-Medium sehr gering. Um dennoch auszuschließen, dass der Effekt, der bei Zugabe von Prolin in den Stämmen mit geringer CS-Aktivität beobachtet werden konnte, auf der schlechteren Osmoregulation der Stämme beruht, wurden Experimente im Schüttelkolben mit Zugabe von 5 mM Betain durchgeführt. Parallel wurde das Wachstum mit 5 mM Prolin und ohne Supplement aufgezeichnet. Untersucht wurde das Wachstum der Stämme DM1800', DM1800'C7 und DM1800'C5 in drei Replikaten. Abbildung 3.12 zeigt die gemittelten Wachstumsraten und Lysinausbeuten mit bzw. ohne Supplement. Es zeigte sich wie bereits in den vorhergegangenen Versuchen, dass die Lysinausbeute gegenüber den nicht supplementierten Kontrollen um 10-15 % verbessert war. Die Zugabe von Betain zeigte jedoch keine signifikante Auswirkung. Die Wachstumsrate von DM1800' ist mit keinem der Supplemente signifikant verändert. Anders ist dies in DM1800'C7 und DM1800'C5. Wie bereits in den Vorversuchen war bei Prolinzugabe die Wachstumsrate beider Stämme deutlich erhöht. Dabei war sie für DM1800'C7 um etwa 25 % gesteigert gegenüber der nicht supplementierten Kontrolle. In DM1800'C5 war sie sogar um 55 % gesteigert. Auch in den

Vorversuchen hatte die Prolinsupplementation einen größeren Einfluss auf den Stamm DM1800'C5 mit der geringeren spezifischen CS-Aktivität. Die Zugabe von Betain zeigte für beide Stämme ebenso einen positiven Einfluss auf das Wachstum. Dieser war jedoch deutlich geringer als der von Prolin. Für beide Stämme konnten Anstiege der Wachstumsraten von 10-15 % beobachtet werden. Im Gegensatz zu Prolin kann Betain in *C. glutamicum* nicht verstoffwechselt werden. Der positive Effekt auf das Wachstum, der davon ausgeht, beschränkt sich somit auf die Osmoregulation der Zellen. Zum „Prolineffekt“, den die Stämme mit geringer CS-Aktivität zeigen, mag zum Teil dessen Wirkung als kompatibles Solut beitragen, nicht aber die Auswirkung auf die Lysinproduktion.

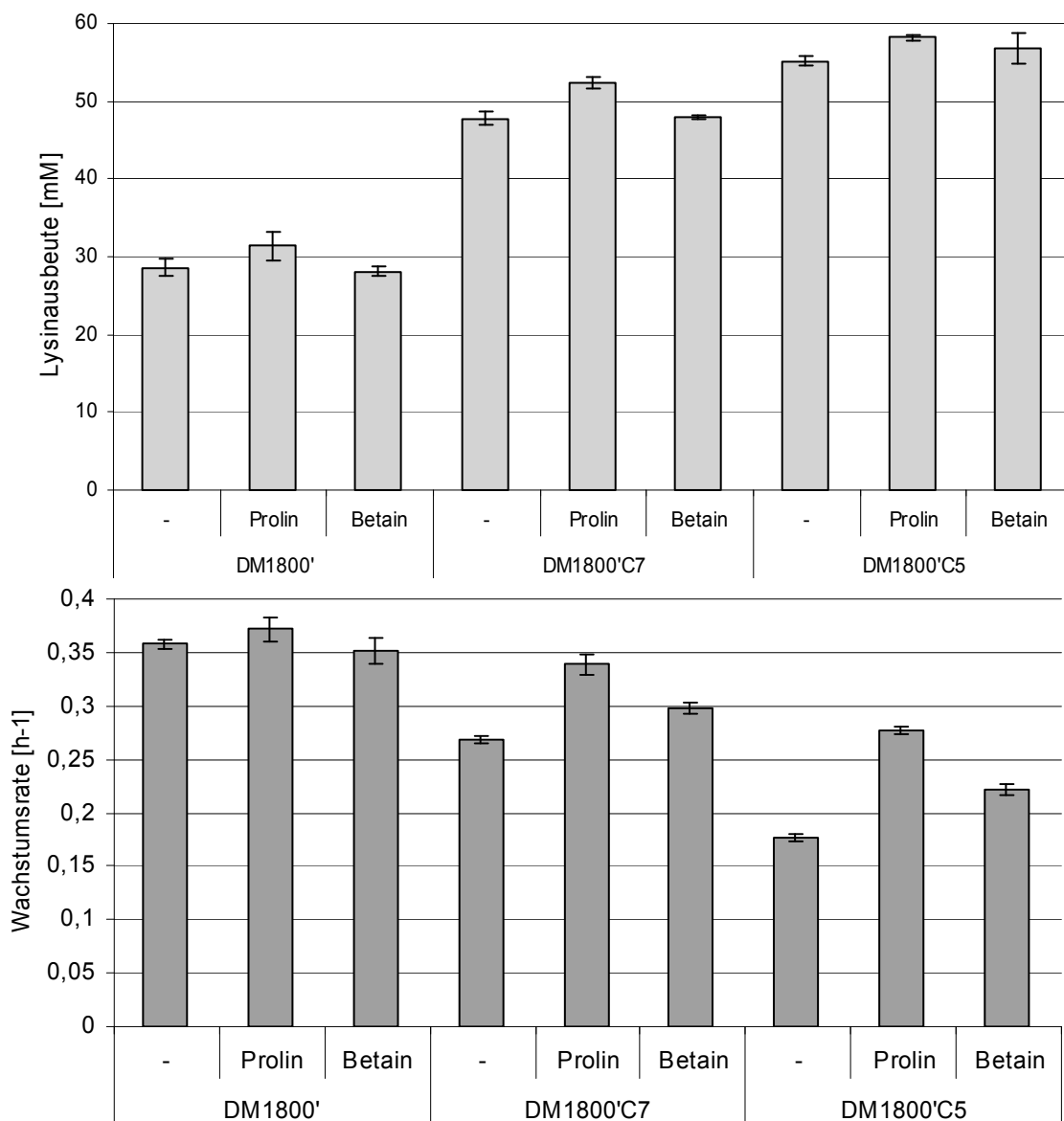


Abb. 3.12 Wachstum und Lysinbildung bei Supplementation mit Prolin und Betain

Angegeben sind die gemittelten Wachstumsraten sowie Lysin-konzentrationen dreier Kultivierungen mit den jeweiligen Standardabweichungen für die drei Stämme DM1800', DM1800'C7 und DM1800'C5 ohne oder mit Supplementation von 5 mM Betain bzw. Prolin

3.7.4 Kohlenstoffbilanz und extrazelluläre Raten bei Prolinsupplementation

Zur weiteren Eingrenzung des Phänotyps der Stämme mit geringer spezifischer CS-Aktivität bei Prolinzugabe wurden durch LC-MS-Analysen des Kulturüberstandes die Konzentrationen von Prolin und Glutamat bestimmt, um deren Aufnahmeraten bestimmen zu können. Sollten diese sehr unterschiedlich voneinander sein, könnte dies eine simple Erklärung des „Prolineffektes“ sein. Diese Versuche wurden wiederum im Bioreaktor durchgeführt, um extrazelluläre Raten bestimmen zu können. Es wurden je zwei Kultivierungen von DM1800'C7 ohne und mit 5 mM Prolin durchgeführt und die Prozessparameter aufgezeichnet. Durch Anpassung an die Prozessdaten wurden die extrazellulären Raten wie Glucoseaufnahme und Bildung von Biomasse und Lysin wie zuvor ermittelt (Abb. 3.13). Es zeigte sich, dass außer der bereits zuvor beobachteten Zunahme der Wachstumsrate von $0,28 \text{ h}^{-1}$ auf $0,31 \text{ h}^{-1}$ und der bereits vermuteten Verbesserung der Lysinbildungsrate von $0,54 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,68 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vor allem die Glucoseaufnahmerate deutlich verbessert war. Sie stieg von etwa $4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ohne Prolin auf $5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Wachstum mit Prolin. Die aus den Schüttelkolben erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Stämme sowohl schneller wuchsen als auch eine höhere Lysinausbeute zeigten, was zunächst in Widerspruch steht, da aufgenommener Kohlenstoff entweder in die Bildung von Biomasse oder in die Produktbildung umgesetzt werden kann. Zunächst erklärt also die gesteigerte Kohlenstoffaufnahme die Überwindung dieses Dilemmas. Es bleibt jedoch das Problem, dass die Wachstumseinschränkung von DM1800'C7 durch die verringerte CS-Aktivität entweder durch den Mangel an zum Wachstum benötigten Bausteinen (Prolin, Glutamat, Glutamin und Arginin) und/oder durch den Mangel an Energie bzw. Reduktionsäquivalenten, die im TCA gebildet werden, bedingt wird. Durch Aufnahme des Prolin wird dieser Mangel also zum Teil überwunden. Aus den Messungen der Prolinkonzentrationen im Kulturüberstand zu den jeweiligen Zeitpunkten ergab sich eine Aufnahmerate von $0,23 \pm 0,05 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Für Glutamat hingegen wurde eine Aufnahmerate von $0,03 \pm 0,02 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt, die etwa eine Größenordnung unter der des Prolin liegt. Der Bedarf der Aminosäuren für den Lysinproduzenten MH20-22B beträgt für Prolin $170 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$, für Glutamat $360 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$, für Glutamin $147 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ und für Arginin $189 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Eggeling 2005). Dies entspricht einem Gesamtbedarf von $866 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$; durch die Aufnahme des Prolin und dessen Umsetzung zu Glutamat könnten also etwa 25 % des Bedarfes für 1 g_{BTM} gedeckt werden. Gegenüber DM1800' ist die Wachstumsrate von DM1800'C7 um 20 % verringert. Beruhte dieses verringerte Wachstum ausschließlich auf der verringerten Verfügbarkeit der genannten Metabolite zur Bildung an Biomasse, ließe sich dies durch die Prolinaufnahme vollständig erklären, so es denn nach der Aufnahme vollständig verstoffwechselt würde. Da das Wachstum allerdings

nicht in diesem Maße zunimmt, ist davon auszugehen, dass das aufgenommene Prolin entweder nicht direkt in die anderen Aminosäuren umgesetzt wird oder dass zudem auch der Energiebedarf bzw. Bedarf an Reduktionsäquivalenten nicht gedeckt werden kann.

Der interessanteste Punkt bleibt jedoch, dass die Zugabe von Prolin die Glucoseaufnahme rate deutlich verbessert. Gegenüber dem nicht supplementierten DM1800'C7 steigt durch die Verbesserung des Wachstums und der Glucoseaufnahme die Raumzeitausbeute (RZA) des Stammes um weitere 15 %. Dies ist, wie bereits zuvor bemerkt, einer der wichtigsten Parameter für biotechnologische Anwendungen in der Industrie. Das Erstellen der Kohlenstoffbilanz gelang lediglich für einen der Bioreaktoren mit Prolinsupplementation (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich hierbei kein großer Unterschied zu den nicht supplementierten Stämmen. Dies bedeutet aber ebenso, dass das mehr an aufgenommener Glucose zu einer ebenso gesteigerten CO₂-Produktionsrate führt.

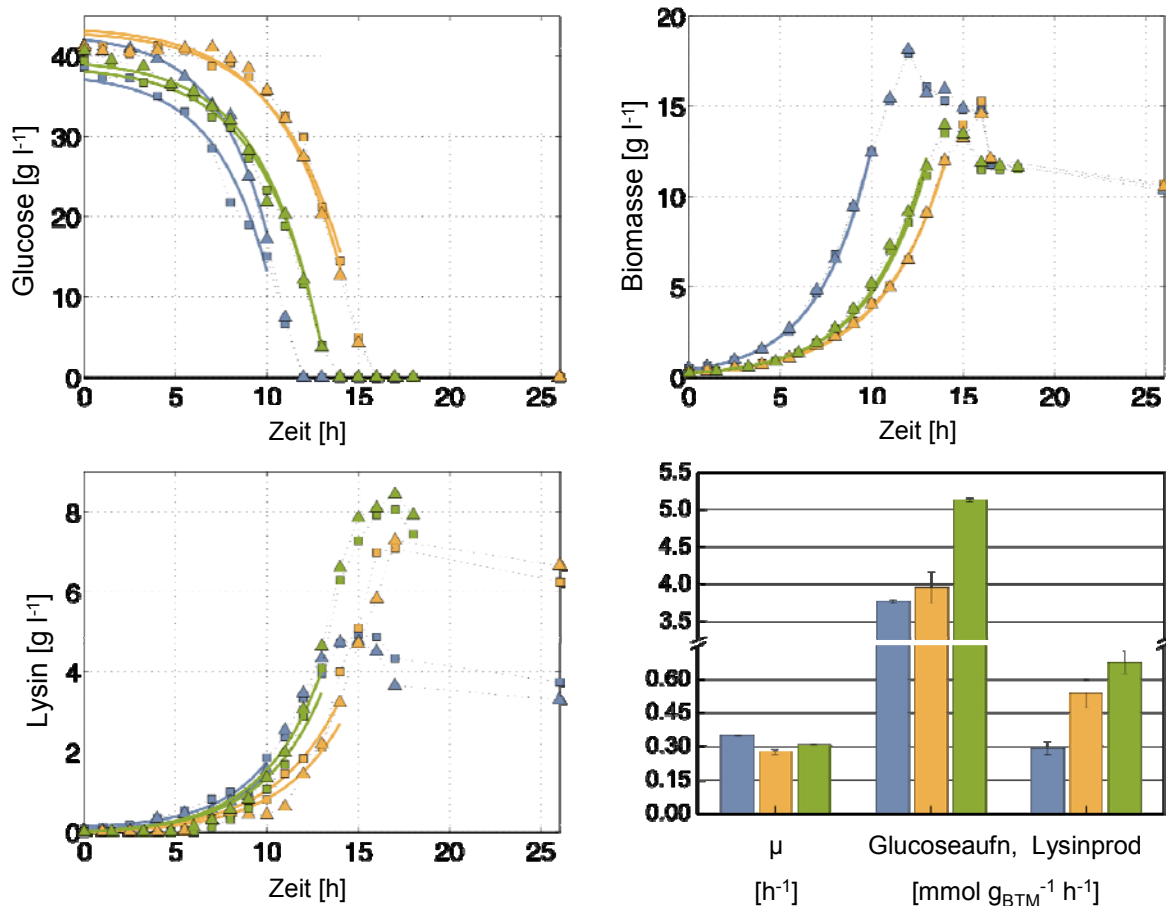


Abb. 3.13 Extrazelluläre Raten bei Prolinsupplementation

Angegeben sind die Anpassungen der extrazellulären Raten an die Prozessdaten zweier Kultivierungen von DM1800'C7 bei Prolinsupplementation im Vergleich zu den zuvor ermittelten. DM1800' (blau), DM1800'C7 (gelb) und DM1800'C7 Prolin (grün)

Tab. 3.15 Extrazelluläre Raten der Stämme mit und ohne Prolinsupplementation

Stamm	LYS [g l ⁻¹]	BTM [g l ⁻¹]	Y _n [g g ⁻¹]	RZA [g l ⁻¹ h ⁻¹]	μ [h ⁻¹]	Aufnahme _{GLC} [mmol g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹]	Produktion _{LYS} [mmol g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹]
DM1800 ^c	4,84 ±0,12	18,04 ±0,16	0,12	0,32	0,35	3,77 ±0,02	0,29 ±0,03
DM1800 ^c C7	7,28 ±0,16	14,44 ±0,64	0,18	0,43	0,28 ±0,01	3,96 ±0,21	0,54 ±0,07
DM1800 ^c C7 Prolin	8,25 ±0,28	13,73 ±0,33	0,21	0,49	0,31	5,12 ±0,03	0,68 ±0,05

3.8 Bearbeitung weiterer Zielgene zur verbesserten Lysinproduktion

Aus der Betrachtung des Modells und den erzielten Ergebnissen ergaben sich weitere Möglichkeiten, den metabolischen Fluss dem „Optimum“ des Modells anzupassen. Ebenso wie die Limitierung des Flusses über die CS hätte die Limitierung des Flusses über die Pyruvatdehydrogenase (PDH) theoretisch eine verbesserte Lysinausbeute zur Folge. Dabei wäre es möglich, dass die regulatorische Antwort, die in den genomweiten Expressionsanalysen nachgewiesen wurde, unterbleibt, da der verringerte Fluss über die PDH wahrscheinlich auch zu einer verringerten Acetyl-CoA-Konzentration führt. Durch das Modell wurde ebenso deutlich, dass neben dem erhöhten Fluss in die Lysinbiosynthese über die anaplerotischen Reaktionen ein erhöhter Fluss im Pentosephosphatweg nötig ist, um den NADPH-Bedarf durch die Lysinbiosynthese (4 NADPH pro Lysin) zu decken. Hierzu sollte die Verstärkung der Expression der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase genutzt werden.

3.8.1 Pyruvatdehydrogenase

Die PDH von *C. glutamicum* gehört wie die 2-Oxoglutaratdehydrogenase (OGDH) zu den 2-Oxosäuredehydrogenase-Komplexen (OADHC). Diese sind Komplexe aus 3-4 unterschiedlichen Untereinheiten, die die drei katalytischen Funktionen des Enzymkomplexes tragen. OADHC können eine beeindruckende Größe erreichen, sie zählen zu den größten bekannten, nichtviralen, makromolekularen Strukturen (Aevansson 1999). Im ersten Schritt des Reaktionsmechanismus bindet Thiaminpyrophosphat (TPP), der Cofaktor des ersten Enzyms (E1) des Komplexes, an das alpha-C-Atom der 2-Oxosäure, wodurch CO₂ abgespalten und das Carbanion kovalent an TPP gebunden wird. Von dort aus wird das gebundene Carbanion auf das Liponamid am zweiten Enzym (E2) im Komplex übertragen, das unter Reduktion des Liponamids zu einem Thioester und einer Sulfhydrylgruppe wird. Es folgt nun ein Umestern auf die Schwefelgruppe des Coenzym-A (S-CoA) zu einem Acyl-CoA. Das reduzierte Dihydrolipoyl wird nun durch eine Dehydrogenase, das dritte Enzym

(E3), wieder in den Ausgangszustand oxidiert. Die Elektronen werden durch den Cofaktor FAD des E3 aufgenommen, anschließend auf NAD^+ übertragen und NADH freigesetzt.

In *C. glutamicum* wird E1 durch das Gen *aceF* codiert, E2 durch *aceE* und E3 durch *lpd*. Wie auch in *E. coli* wird dabei das E3 (*lpd*) von den beiden Enzymkomplexen PDH und OGDH genutzt. Das Genprodukt von *aceF* ist aber in *C. glutamicum*, anders als in *E.* einzige Protein mit den für E2 typischen Lipoyldomänen und seine Deletion führt zum vollständigen Verlust der PDH- und OGDH-Aktivitäten (M. Hoffelder, nicht publiziert). Es ist also wahrscheinlich, dass *aceF* als E2 von beiden Komplexen genutzt wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von *aceF* im Lysinproduzenten DM1729 (s. Abb. 1.2) zu Verlust der PDH-Aktivität führte, der Stamm aber eine deutlich verbesserte Lysinausbeute zeigte (Blombach 2007b). Allerdings war dieser Stamm auxotroph für die aus Glutamat gebildeten Aminosäuren und akkumulierte große Mengen Pyruvat und Valin im Kulturüberstand; zudem war seine Wachstumsrate deutlich niedriger als die des Referenzstammes. Um den Fluss über PDH zu verringern, wurden zwei Stämme konstruiert, in denen 2 der 3 lipoylierten Lysinreste des AceF durch Glutamine ersetzt wurden: *aceFK43Q,K162Q* und *aceFK162Q,K278Q*. Es wurden zwei verschiedene Konstrukte gewählt, bei denen jeweils das erste und das zweite bzw. das zweite und das dritte Lysin der drei Lipoyldomänen durch Glutamin ersetzt wurden. Beide Veränderungen wurden sowohl in den Wildtyp als auch in DM1800' und DM1800'C7 eingebracht. Die Stämme zeigten keinerlei Veränderung im Wachstum und der Lysinausbeute. Enzymmessungen zeigten jedoch, dass der Verlust der Lysinreste und damit wahrscheinlich der Liponsäuren, an Position 2+3 AceF-K162Q,K278Q zu einer um 25 % verringerten spezifischen PDH-Aktivität führte, während der Verlust der Liponsäuren an den Positionen 1+2 in AceF-K43Q,K162Q zu keiner Veränderung führte (K. Raasch, unveröffentlicht). Dieser Befund war zunächst überraschend, da durch Evolution üblicherweise nicht benötigte Funktionen, welche zudem energieintensiv sind, durch Selektion ausgemustert werden. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Messung der PDH-Aktivität *in vitro* deutlich von der PDH-Aktivität *in vivo* unterscheidet, da für die Messung viele Reinigungsschritte notwendig sind. In Zusammenarbeit mit Dr. Bastian Blombach (Universität Ulm) werden weitere Möglichkeiten wie der Austausch des Promotors vor *aceE* durch die *dapA*-Promotorvarianten untersucht.

3.8.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) katalysiert die Umsetzung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat, wobei die dabei entstehenden Elektronen auf NADP^+ übertragen werden. Sie ist in *C. glutamicum* ein heteromultimerer Komplex der als Operon organisierten *zwf* und *opcA* Genprodukte und stellt das erste Enzym des Pentosephosphatwegs (PPP) dar (Moritz 2000). Sie wird auf transkriptioneller Ebene bei

Wachstum mit Glucose durch die Regulatoren GntR1 und GntR2 schwach reprimiert (Frunzke 2008). Auf Enzymebene wird sie jedoch stark durch NADPH reguliert (Moritz 2000). Der Fluss über den PPP ist vor allem vom Fluss über G6PDH reguliert, der *in vivo* wiederum von der NADPH-Konzentration in der Zelle abhängig ist (Marx 1999). Für *zwf* sind Mutationen bekannt, die zu einem erhöhten Fluss über den PPP führen und so zu höheren NADPH-Konzentration der Zellen führt. Dies kann auch positive Auswirkungen auf die Lysinproduktion zeigen (Becker 2007). Durch die erhöhten Lysinausbeuten und – exkretionsraten müssen die Zellen zur Bereitstellung des notwendigen NADPH einen erhöhten PPP-Fluss aufweisen. Es ist möglich, dass dabei der maximal mögliche Fluss erreicht wird, wofür die erhöhten G6P-Konzentrationen im Stamm DM1800’C7 ein Indiz wären. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Stämme DM1800’ (100 % CS), DM1800’A14(24 % CS) und DM1800’C7(10 % CS) mit dem Plasmid pAN6zwf (A. Otten, unveröffentlicht) transformiert, um durch Zugabe von IPTG die Expression von *zwf* zu ermöglichen. Zusätzlich wurden die Stämme als Kontrolle mit dem Leervektor pAN6 transformiert. Die resultierenden Stämme wurden anschließend in CGXII-Medium mit 4 % Glucose kultiviert; zur weiteren Kontrolle wurden die Parentalstämme ohne Plasmid kultiviert. Der Vorkultur wurde für die Stämme mit Plasmid Kanamycin zugegeben, in der Hauptkultur wurde auf die Antibiotikumzugabe verzichtet. Die Lysinkonzentrationen im Kulturüberstand wurden nach 20, 40 und 60 Stunden bestimmt. Abbildung 3.14 zeigt die maximalen Werte der Lysinkonzentrationen der Stämme. Es zeigte sich zunächst als typische Beobachtung, dass die Stämme mit Leervektor 10 – 20 % geringere Lysinkonzentrationen aufweisen als die Parentalstämme. Dies erklärt sich durch den gesteigerten Energie- und Kohlenstoffbedarf zur Synthese der Plasmide. Die Stämme mit dem nicht induzierten pAN6zwf-Plasmiden zeigten gegenüber den Stämmen mit Leervektor eine etwas verringerte Lysinbildung. Durch die Induktion der Expression steigt auch die gebildete Menge an Lysin. Diese Steigerung ist jedoch für DM1800’ aufgrund des Standardfehlers nicht signifikant und würde im Bereich von etwa 10 % liegen. Für die beiden Stämme mit verringerter CS-Aktivität sind jedoch sehr deutliche Steigerungen der L-Lysinmengen messbar. Für DM1800’A14 beträgt die Steigerung gegenüber der Leervektorkontrolle etwa 45 % und liegt sogar 17 % über der Kontrolle ohne Vektor. Für DM1800’C7 beträgt die Steigerung der L-Lysinmenge im Kulturüberstand bei induzierter Expression 60 % gegenüber dem Kontrollstamm mit Leervektor. Gegenüber dem Stamm ohne Plasmid konnte ebenfalls ein Anstieg beobachtet werden, der 10 % betrug. Ausgehend von DM1800’ mit Leervektor pAN6, beträgt die Steigerung der Lysinproduktion durch Beschränkung der CS-Menge in der Zelle auf 10 % und die Verstärkung an G6PDH in *C. glutamicum* 100 %. Es ist zu erwarten, dass diese Verstärkung der Expression von *zwf* durch Eingriffe in das Genom, etwa durch Genverdoppelung, in einem Stamm ohne Vektor noch einmal steigen würde. Jedoch war

Ergebnis

auch eine deutliche Verringerung des Wachstums der Stämme mit induzierter *zwf* Expression zu beobachten, sodass die Messungen auf 60 Stunden ausgedehnt werden mussten. Es ist bekannt, dass durch ein verringertes Wachstum grundsätzlich mehr Produktbildung zu beobachten ist.

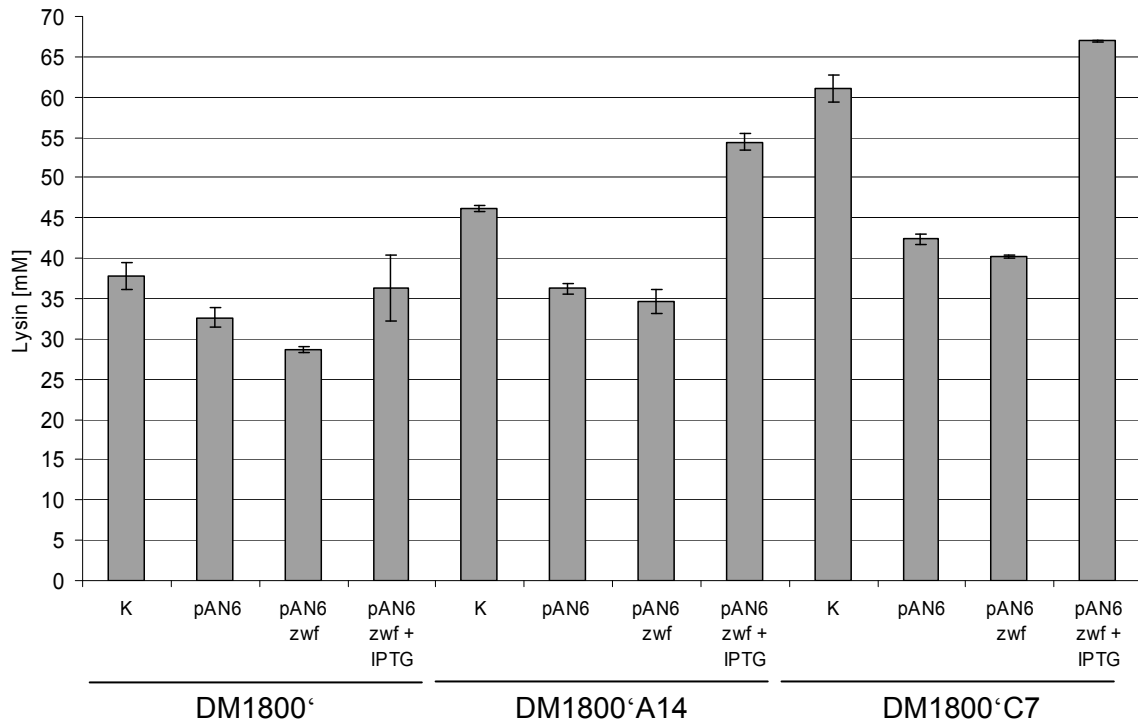


Abb. 3.14 Maximale Lysinkonzentration der angegebenen Stämme im Kulturüberstand

Lysinkonzentrationen für die Stämme DM1800', DM1800'A14 und DM1800'C7 jeweils ohne Vektor, mit Leervektor (pAN6), nicht induziert (pAN6zwf) und Induziert (pAN6zwf + IPTG) mit 0,1 μ M IPTG.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der *gltA* (Citratsynthase) Transkription

Trotz der zentralen Bedeutung der Citratsynthase in *C. glutamicum* wie auch in den meisten anderen aeroben Organismen war über ihre transkriptionelle Regulation zur Anpassung an die Kohlenstoffquelle bislang wenig bekannt. Für *C. glutamicum* konnte in genomweiten Expressionsanalysen gezeigt werden, dass die *gltA*-Expression bei Wachstum mit Acetat gegenüber Wachstum mit Glucose etwa verdoppelt ist (Gerstmeir 2003, Muffler 2002). Über den Mechanismus war aber nichts bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *gltA* in *C. glutamicum* durch zwei monocistronische Transkripte exprimiert wird. Beide Transkripte werden abhängig von der Kohlenstoffquelle reguliert.

Anders als *E. coli* verfügt *C. glutamicum* über eine CS vom Typ-I, wie sie in allen anderen Organismen mit Ausnahme der gramnegativen Bakterien vorkommt. In *E. coli*, ebenso wie in dieser Arbeit für *C. glutamicum* gezeigt, werden zwei monocistronische mRNAs mit verschiedenen Start- aber identischen Endpunkten zur *gltA*-Transkription gebildet (Wilde 1986). Für *E. coli* konnte lediglich für den Regulator ArcA ein Einfluss auf die Transkription als Repressor bei anaerobem Wachstum nachgewiesen werden (Park 1994). Die CS des Typ-II in *E. coli* wird jedoch auf Proteinebene sehr stark durch die Metabolite NADH und 2-Oxoglutarat allosterisch gehemmt, sodass davon auszugehen ist, dass die Regulation des TCA-Zyklus-Flusses vor allem posttranslational erfolgt. *Bacillus subtilis* besitzt zwei Gene für CS des Typ-I, *citZ* und *citA* (Jin 1994a). *citZ* ist zusammen mit den Genen für die Isocitratdehydrogenase und die Malatdehydrogenase als Operon organisiert. Die Deletion von *citZ* führt zu einer teilweisen Glutamat-Auxotrophie und die *citZ* Expression wird bei Wachstum in Vollmedium durch Glucosezugabe etwa 2-fach bzw. Glucose- und Glutamatzugabe etwa 10-fach reprimiert (Jin 1994b).

In Northernblotanalysen und Promotor-Reporter-gen-Fusionen konnte gezeigt werden, dass in *C. glutamicum* bei Wachstum mit Glucose vorwiegend das längere *gltA* Fragment gebildet wird, während bei Wachstum mit Acetat das kürzere dominiert. Beide Transkriptionsstartpunkte und der Terminator konnten identifiziert werden. Der publizierte Befund, dass *gltA* zusammen mit dem strangabwärts gelegenen Gen *fkB* als polycistronische mRNA gebildet wird (Han 2008b), konnte nicht reproduziert werden, für *fkB* konnte ein einzelnes monocistronisches Transkript nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Regulators RamA die Expression beider Transkripte stark inhibiert und dass der Regulator vor beiden Promotoren bindet. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Funktion von RamA als Aktivator der *gltA*-Expression, die auch für weitere Zielgene beschrieben ist (Cramer 2006). Die Deletion des *ramB*-Gens hatte ebenfalls Einfluss auf die

Bildung beider Transkripte. Beide werden stärker exprimiert, wobei der Einfluss für das längere Transkript deutlich stärker war. Die Bindung von RamB konnte nur für diesen zweiten Promotor gezeigt werden (van Ooyen 2010). RamB scheint Repressor der *gltA*-Transkription zu sein, auch dies wurde bereits für weitere Zielgene gezeigt (Cramer 2007).

Diese beiden Regulatoren spielen als Antagonisten eine wichtige Rolle für die Regulation vieler Gene des Zentralstoffwechsels bei Wachstum von *C. glutamicum* mit Acetat bzw Ethanol. Beide Kohlenstoffquellen gelangen als Acetyl-CoA in den Zentralstoffwechsel zur Gewinnung von Energie und zur Bildung von Biomasse benötigter Bausteine. Um diese nötigen Bausteine und Energie für die Gluconeogenese liefern zu können, nimmt der Fluss über den Citratzyklus und den Glyoxylatcyclus dabei zu (Wendisch 2000). Dabei werden alle notwendigen Gene (Aconitase, Succinatdehydrogenase, Malatsynthase, Isocitratlyase, Phosphotransacetylase und Acetatkinase) durch mindestens einen der Regulatoren RamA, RamB und GlxR reguliert (Bott 2009). Bislang konnte jedoch weder für RamA noch für RamB ein Effektor identifiziert werden, was elementar für das Verstehen des Mechanismus ist.

Gegenüber anderen Veröffentlichungen (Park 2010) blieb die Deletion des Regulators GlxR in *C. glutamicum* in vielen Versuchen erfolglos (IBT-1; Cebitec, Bielefeld, persönliche Mitteilungen). Bislang konnte für 24 Gene die Bindung des Regulators GlxR im Promotorbereich nachgewiesen werden. Genomweite *in silico* Analysen zum Bindemotiv zeigten, dass bis zu 14 % aller Gene in *C. glutamicum* durch GlxR reguliert sein könnten (Busmann 2009, Kohl 2009, van Ooyen 2010), darunter viele Gene des Zentralstoffwechsels, was ein möglicher Grund für die Schwierigkeit seiner Deletion sein könnte. GlxR gehört zur Familie der Crp-Fnr-Regulatoren, deren bekanntester und bestuntersuchter Vertreter der Regulator Crp aus *E. coli* ist. Beide benötigen zur Bindung der Zielsequenzen die Bindung des Effektors cAMP, wodurch zumindest in *E. coli* eine direkte Kopplung zum Energiestoffwechsel für die Nutzung entsprechender Kohlenstoffquellen vorliegt (Bettenbrock 2007, Park 2006). Während für *E. coli* gezeigt wurde, dass die cAMP-Konzentration bei Wachstum mit Kohlenstoffquellen, die über das Phosphotransferasesystem aufgenommen werden, niedriger ist als mit anderen, liegen für *C. glutamicum* dazu bislang keine eindeutigen Befunde vor (Kim 2004, Polen 2007). Bei Verstärkung der *gltR*-Expression bei Wachstum von *C. glutamicum* mit Glucose war die Expression des längeren *gltA*-Transkriptes um etwa 50 % und die spezifische CS-Aktivität um 41 % verringert, ebenso verringerte sich bei Wachstum mit Acetat die spezifische CS-Aktivität um 25 %. Dies macht es wahrscheinlich, dass GlxR Repressor der *gltA*-Transkription fungiert, wie es zuvor bereits für die *sdhCAB*-Transkription gezeigt wurde (Busmann 2009).

Die Transkription der beiden *gltA*-Transkripte wird also voneinander unabhängig kontrolliert. Ein wahrscheinlicher Grund für diese Kohlenstoffquellenabhängige Regulation über ist die

Lokalisation zu Beginn des Citrat- und Glyoxylatzyklus. Dennoch konnten bislang nur geringe Unterschiede der *gltA*-Expression bzw CS-Aktivität bei Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen festgestellt werden. Der Grund für die vielfachen regulatorischen Mechanismen könnte ein präzises Reagieren auf die physiologischen Bedürfnisse der Zelle sein.

Die Deletion des Promotors P1 in ATCC13032 Δ P160 resultierte bei Wachstum mit Glucose in 15 % der spezifischen CS-Aktivität des Wildtyps. Der Northernblot des Stammes zeigte, dass auch die Expression von P2 gegenüber dem WT deutlich verringert ist. Untersuchungen mit Programmen zur Vorhersage sekundärer RNA-Strukturen zeigten, dass der 5'-Bereich der gebildeten Transkripte Strukturen mit sehr geringen Standardenergien aufweist, was für eine erhöhte Stabilität der Transkripte sorgen könnte. Zudem konnte zusätzlich vor dem ORF von *gltA* eine Haarnadelstruktur vorhergesagt werden, die möglicherweise ebenfalls zur Stabilität der *gltA*-Transkripte beiträgt. Diese Strukturen sind in ATCC13032 Δ P160 deletiert, wodurch ein stabilisierender Effekt unterbleiben würde.

4.2 Promotoraustausch der Citratsynthase

Der gemessene *in vivo* Fluss über die CS entspricht in *C. glutamicum* ATCC13032 etwa 93 % (mol mol^{-1}) der Glucoseaufnahmerate (Marx 1997). Die Glucoseaufnahmerate beträgt für *C. glutamicum* ATCC13032 4-4,5 $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Wendisch 2000), die spezifische CS-Aktivität im zellfreien Extrakt von *C. glutamicum* ATCC13032 beträgt etwa 1 $\mu\text{mol mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{min}^{-1}$. Da die BTM zu 50 % aus Protein besteht, ergibt sich 0,5 $\mu\text{mol mg}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1}$ bzw 0,5 $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1}$ und umgerechnet in Stunden 30 $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$. Somit ist die Gesamtaktivität der CS einer Zelle etwa 7-fach größer als rechnerisch für den bestimmten Fluss nötig ist. Dies ist allerdings nur dann gegeben, wenn die internen Substratkonzentrationen entsprechend hoch sind. Für Oxalacetat beträgt der K_M 1,5 μM , für Acetyl-CoA 51 μM (Eikmanns 1994). Aufgrund seiner Instabilität gibt es zu internen Konzentrationen des Oxalacetat nur Schätzungen, die von 1-2 μM ausgehen. Die interne Konzentration des Acetyl-CoA bei Wachstum mit Glucose konnte sowohl aus den eigenen Daten als auch aus Literaturangaben auf etwa 24 μM bzw. 30 μM (Wendisch 1997) bestimmt werden. Die interne Konzentration des Acetyl-CoA beträgt also nur ein Viertel der für die CS notwendigen, um mit v_{Max} arbeiten zu können. Neben den zuvor benannten Möglichkeiten der Flussregulation auf transkriptioneller Ebene ist also der Fluss auch durch die Konzentration dieser beiden Metabolite regulierbar.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der CS auf die L-Lysinbildung und das Wachstum in *C. glutamicum* systematisch zu untersuchen. Hierzu wurden die beiden Promotoren von *gltA* gegen 9 *dapA*-Promotoren geringerer Expression ersetzt. Ausgehend von der zuvor

erläuterten Betrachtung und Literaturangaben (Radmacher 2007) war es zunächst nicht überraschend, dass die Verringerung der spezifischen CS-Aktivität in den Lysinproduzenten DM1800 und DM1933 auf ein Drittel der Ausgangsaktivität nur sehr geringe Auswirkungen auf Wachstum und Lysinausbeute zeigte. Von diesem kritischen Punkt an zeigte jede weitere Verringerung der spezifischen CS-Aktivität eine reziprok lineare Korrelation zur Lysinausbeute und eine lineare Korrelation zum Wachstum. Diese Korrelation ist unabhängig vom Stammhintergrund, jedoch in DM1933 nicht so ausgeprägt wie in DM1800.

So konnte im Stamm mit der geringsten spezifischen CS-Aktivität DM1800'C5 (6 % des Referenzstammes) die Lysinausbeute ($\text{g}_{\text{LysHCl}} \text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$) um 88 % von 0,17 auf 0,32 gesteigert werden. Die Wachstumsrate von DM1800'C5 verringerte sich dabei um 60 %. Für den Stamm DM1933'C7, der 10 % der spezifischen CS-Aktivität des Referenzstammes zeigte, konnte die Lysinausbeute ($\text{g}_{\text{LysHCl}} \text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$) von etwa 0,35 auf etwa 0,50 um 40 % gesteigert werden, wobei sich die Wachstumsrate in etwa halbierte. Dabei ist die Lysinausbeute von DM1933'C7 mit $19,61 \text{ g L}^{-1}$ LysHCl aus 40 g L^{-1} Glucose die höchste bislang publizierte. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die CS direkt als Schalter zwischen Wachstum und Lysinausbeute in entsprechenden Stämmen genutzt werden kann. Dies war bereits im stöchiometrischen Modell sehr deutlich geworden, dennoch war es überraschend, dass der geringere Fluss über die CS direkt zu einer gesteigerten Lysinausbeute führt, ohne dass dabei weitere Nebenprodukte entstehen. Dies bedeutet auch, dass die Stoffflüsse in der Zelle an diese Situation angepasst werden.

4.3 Globale Auswirkungen der Citratsynthasereduktion

Zur weiteren Charakterisierung der Stämme mit abgestufter Citratsynthaseaktivität wurden die globalen Konsequenzen untersucht. Hierzu wurden in genomweiten Expressionsanalysen die Transkriptome der Stämme DM1800'A16, DM1800'A14, DM1800'L1 und DM1800'C7 mit dem Referenzstamm DM1800' verglichen. Zudem wurden die internen Metabolitkonzentrationen des Zentralstoffwechsels sowie die der Aminosäuren dieser fünf Stämme bestimmt. In Abbildung 4.1 ist ein Teil dieser Ergebnisse zusammengestellt. Es fiel zunächst auf, dass sich viele Gene als reguliert erwiesen, die üblicherweise bei der Verstoffwechslung von Acetat bzw. Äthanol notwendig sind. Die höchsten Expressionsunterschiede wiesen dabei die Gene *aceA* und *aceB* auf, die für die Enzyme Isocitratlyase und Malatsynthase des Glyoxylatzyklus codieren. Zusätzlich waren die Gene *adhA*, *pta*, *ackA* und das der Aldehyddehydrogenase deutlich reguliert. Alle genannten Gene zeigten sich stärker exprimiert, je geringer die spezifische CS-Aktivität des entsprechenden Stammes war. Trotz des schwachen Phänotyps von DM1800'A16 mit 32 %

CS-Aktivität bei Wachstum und Lysinausbeute sind hier bereits signifikante Änderungen in der Expression dieser Gene zu beobachten. Ihre Expression wird durch die Regulatoren RamA und RamB reguliert (Arndt 2008, Cramer 2006, Gerstmeir 2004).

Die Effektoren dieser Regulatoren sind leider bislang nicht identifiziert. Für *C. glutamicum* konnte bereits gezeigt werden, dass bei Wachstum mit Acetat die interne Konzentration an Acetyl-CoA von $24 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ um das 6-fache auf $145 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ansteigen kann (Wendisch 1997). In dieser Arbeit war ein deutlicher Anstieg der Acetyl-CoA-Konzentration zu beobachten, je geringer die CS-Aktivität eines Stammes war. Dabei ist die Bildung von Acetat der Stämme DM1800' und DM1800'C7 trotz dieser deutlichen Expressionsveränderungen vergleichbar. Dies spricht dafür, dass interne Konzentrationen von Acetyl-CoA, Acetylphosphat oder Acetat selbst Effektoren für diese Regulation sind. Die Deletion der Gene *aceA* und *aceB* in DM1800' und DM1800'C7 zeigte allerdings nur geringe Unterschiede in Wachstum und Lysinbildung der Stämme. Zudem ist der Fluss über die beiden Genprodukte auf enzymatischer Ebene *in vitro* stark durch die Metabolite 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat, PEP, Fructose-1,6-bisphosphat und Succinat inhibiert (Reinscheid 1994a, Reinscheid 1994b). Da einige dieser Metabolite deutlich höher konzentriert in den Stämmen mit geringer CS-Aktivität vorlagen, ist ein hoher Fluss über den Glyoxylatzyklus ebenfalls unwahrscheinlich. Zur Acetat-abhängigen Antwort der Stämme mit geringen CS-Aktivitäten gehört auch das Malatenzym (*malE*, *mez*), das *in vitro* vor allem die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat katalysiert (V. Wendisch pers. Mitteilung). Gegenüber Glucose ist es bei Wachstum mit Acetat über die Regulatoren RamA und RamB herunterreguliert (Gerstmeir 2003). Dafür wird jedoch *pck* bei Wachstum mit Acetat in seiner Expression verstärkt gebildet. Überraschenderweise ist dies in den Stämmen mit reduzierter CS-Aktivität nicht der Fall; hier ist *pck* wie *malE* herunterreguliert. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Konzentrationen der meisten Metabolite der Glycolyse in den Stämmen mit reduzierter CS-Aktivität deutlich erhöht waren. Es ist wahrscheinlich, dass neben dem regulatorischen „Acetateffekt“ ein weiterer, übergeordneter Effekt der *pck*-Regulation existiert, der möglicherweise auf diesen Konzentrationsanstieg bei PEP oder auch Pyruvat reagiert. Das Pyruvat selbst konnte nicht gemessen werden; da aber in DM1800'C7 sowohl das PEP als auch die Aminosäuren Alanin und Valin deutlich in ihren Konzentrationen gegenüber dem Referenzstamm erhöht waren, ist dies für Pyruvat sehr wahrscheinlich. Die Deletion von *pck* erhöht die Lysinausbeute (Riedel 2001); so führte die Deletion in DM1800' zu einer deutlichen Steigerung der Lysinausbeute von 12 %. Die Deletion von *pck* in DM1800'C7 (10 % CS) zeigte allerdings nicht diesen positiven Effekt. Die 3,3-fach verringerte Expression von *pck* in diesem Stamm scheint hierzu bereits auszureichen. Neben *pck* verhält sich auch das Operon aus *sucC* und *sucD* der Succinyl-CoA-Synthetase konträr als bei Wachstum mit Acetat gezeigt, bei dem es verstärkt exprimiert wurde. Dies zeigt

ebenfalls, dass komplexere Regulationsmechanismen zum Tragen kommen, die nicht ausschließlich auf einer Acetat-abhängigen Antwort beruhen.

Die Verringerung der CS-Aktivität verringerte die internen Konzentrationen von Citrat, 2-Oxoglutarat (AKG) und Prolin, nicht aber von Glutamat und Glutamin. Zusätzlich sind die Gene der Argininbiosynthese *argD* und *argF* in DM1800'C7 geringer exprimiert als im Referenzstamm, wobei sich die Expression der Gene *argA*, *argB*, *argC*, *argE* nur knapp oberhalb der 2-fach regulierten Grenze rangierte. Arginin selbst konnte nicht gemessen werden. Da viele Reaktionen in der Zelle von Glutamat oder Glutamin abhängig sind, ist es wahrscheinlich, dass die Konzentrationen dieser Metabolite auf einem hohen Niveau gehalten werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Wachstumslimitierung der CS-Stämme auf dem mangelnden Fluss über die CS und dem Mangel der Aminosäuren der Glutamatfamilie zur Bildung von Biomasse beruht.

Für die meisten Metabolite der Glycolyse war ein deutlicher Konzentrationsanstieg durch Verringerung der CS-Aktivität zu beobachten. Dabei waren keine Unterschiede in der Expression zu beobachten. Der Fluss der Glycolyse ist aber vor allem auf enzymatischer Ebene, hauptsächlich durch die Konzentration von ATP reguliert (Sekine 2001, Wada 2008).

Die Konzentration von Aspartat nimmt mit der Verringerung der CS-Aktivität der Stämme zu. Gleiches gilt für Homoserin, Threonin und bei Betrachtung von DM1800'C7 gegen den Referenzstamm für Methionin. Dies ist zunächst ein Anzeichen dafür, dass es durch die Limitierung der CS-Aktivität zu einem erhöhten Fluss in Richtung Aspartat und der daraus gebildeten Metabolite kommt. Die Konzentration des Lysins konnte zwar bestimmt werden, ist aber durch die sehr hohen externen Lysinkonzentrationen mit einem sehr großen Fehler behaftet. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die internen Lysinkonzentrationen erhöht sind, da auch die Expression des Lysinexporters gegenüber dem Referenzstamm erhöht ist. Die Expression des Exportergens ist abhängig von der internen Lysinkonzentration (Bellmann 2001). Die Biosynthese der Reduktionsäquivalente NAD^+ und NADP^+ speist sich in *C. glutamicum* ebenfalls aus Aspartat. Ihre Konzentrationen steigen mit verringerter CS-Aktivität der Stämme. Zusätzlich zeigten auch die Gene zu ihrer Biosynthese *nadA* und *nadC* deutlich verringerte Expressionen was für einen Feedback-Mechanismus spricht wie er auch in anderen Organismen gezeigt wurde (Holley 1985). Die deutlich erhöhten Aspartatkonzentrationen sind aber ebenso ein Hinweis auf die Limitierung der Biosynthesewege des Lysin.

Der sehr deutliche Anstieg des Aspartat spricht für einen Engpass in der Lysinbiosynthese, der wie in DM1933 durch die Verdoppelung der Lysinbiosynthese und des Lysinexporters zu weiteren Verbesserungen der Lysinausbeute führt. In seiner Doktorarbeit konnte Ramon Diesveld durch die Verringerung der CS-Aktivität zeigen, dass sich dies ebenso positiv auf die Threoninproduktion auswirkt (R. Diesveld, Dissertation).

ebenso ein Ziel zur Optimierung der Biosynthese dieser Produkte sein kann. Außerdem könnten Produkte, zu deren Biosynthese Acetyl-CoA benötigt wird, ebenso von verringerter CS-Aktivität in der Zelle profitieren.

4.4 Extrazelluläre Flüsse und Kohlenstoffbilanzen

Der Vergleich der Kohlenstoffbilanz der beiden Stämme DM1800' und DM1800'C7 (10 % CS) zeigte, dass über die exponentielle Wachstumsphase der Anteil des gebildeten CO₂ aus Glucose mit etwa 50 % identisch ist. Unterschiede bestehen jedoch in der Ausbeute an Biomasse und Lysin. Die Berechnungen im Modell hatten gezeigt, dass ein verringerter Fluss über den TCA sowohl zu einer Steigerung der Lysinausbeute als auch zu einer Verringerung der CO₂-Bildung führen sollte. Dennoch konnte diese Betrachtung die Hinweise aus den Wachstumsexperimenten im Schüttelkolben bestätigen, dass die CS einem Schalter zwischen Bildung von Biomasse und Lysin entspricht. Bei der Bestimmung der extrazellulären Raten zeigte sich, dass die Verringerung der CS-Aktivität um 90 % in DM1800'C7 keinen Einfluss auf die Glucoseaufnahme des Stammes zeigte. Wie bereits aus den Kohlenstoffbilanzen ersichtlich, veränderte sich auch die CO₂ Produktion nicht, während die Lysinbildungsrate um 86 % stieg. Die differentielle Ausbeute ($\text{mol}_{\text{Lys}} \text{mol}_{\text{Glc}}^{-1}$) ist dabei in DM1800' 7 % und in DM1800'C7 13 %. Dabei steigt die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses trotz verringertem Wachstum von DM1800'C7 gegenüber dem Referenzstamm um 35 %. Der Vergleich mit dem Modell zeigte eine gute Deckung der Raten für den Stamm DM1800', für DM1800'C7 war jedoch eine deutliche Diskrepanz zu beobachten. Bei einer Wachstumsrate von $0,28 \text{ h}^{-1}$ und einer Glucoseaufnahme von $4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sollte - ein optimaler Fluss vorausgesetzt - eine differentielle Ausbeute ($\text{mol}_{\text{Lys}} \text{mol}_{\text{Glc}}^{-1}$) 21 % ($0,84 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) betragen. Gleichzeitig sollte die CO₂-Bildungsrate von $11 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf etwa $9,5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ verringert sein, was im Experiment jedoch nicht der Fall war; hier blieb sie für beide Stämme gleich. Aus diesem Unterschied erklärt sich auch der Unterschied des Modells zum Experiment. Betrachtet man nun die möglichen Stoffflussverteilungen für die experimentell ermittelten extrazellulären Raten, und begrenzt man ferner den Fluss über den TCA auf das geringste Maß, das eine Lösung zulässt, ergibt sich daraus, dass der Fluss über die CS 9 % der Glucoseaufnahme beträgt und der Fluss über den PPP 250 % der Glucoseaufnahme beträgt. Bei optimalem Wachstum ergab sich im Modell ein CS-Fluss von 92 % der Glucoseaufnahme; in DM1800'C7 sind nur 10 % der spezifischen CS-Aktivität des Referenzstammes nachweisbar. Der Fluss von 250 % im PPP ist notwendig, um die Bildung von CO₂ zu erklären. Das dabei entstehende NADPH wird nur zum Teil für die Lysinbildung eingesetzt. Ein großer Teil fließt laut Modell in die Prolinbiosynthese über die gamma-Glutamylphosphatreduktase (ProA) und die Prolinoxidase

(ProC). Das Prolin wiederum fließt zurück über PutA zu Glutamat, wobei die entstehenden Elektronen auf NAD^+ und Menachinon übertragen werden. Es ist fraglich, ob dies *in vivo* geschieht. Dennoch böte dies eine Möglichkeit für *C. glutamicum*, dem anders als *E. coli* keine Transhydrogenase zur Verfügung steht, Elektronen aus NADPH in die Atmungskette und NADH zu überführen. Der wahrscheinlichste Grund für die Diskrepanz von Experiment zu Modellierung ist, dass das Modell nicht alle Vorgänge *in vivo* berücksichtigen kann, und dass Annahmen bezüglich Protonen und Energiebilanzen, die getroffen wurden, wahrscheinlich nicht mit den realen, sich verändernden Gegebenheiten übereinstimmen. Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass der Fluss des TCA schon deshalb verringert ist, weil der Fluss der Lysinbiosynthese so deutlich erhöht ist. Daraus ergibt sich, dass für die Menge an gebildetem CO_2 nur der PPP als Quelle in Frage kommt. Sollte sich erweisen, dass die Verringerung des TCA-Flusses zu einer solchen Verstärkung des PPP-Flusses führt, könnte dies auch für die Produktion von Metaboliten aus dem PPP, wie Histidin, interessant sein.

4.5 Supplementation der CS-Mutanten

Es war erwartet worden, dass das verringerte Wachstum der Stämme mit verringerter CS-Aktivität durch die Aufnahme der Metabolite Citrat, Glutamat und Arginin verbessert werden könnte. Allerdings zeigte nur die Zugabe von Prolin einen deutlichen positiven Effekt auf die Wachstumsrate der Stämme DM1800'C7 (10 % CS) und DM1800'C5 (6 % CS). Die Eigenschaft als Osmoprotektant in *C. glutamicum*, verbunden mit insgesamt drei bekannten Aufnahmesystemen für Prolin, vermochten zunächst die Verbesserung des Wachstums zu erklären. Da jedoch auch die Lysinbildung bei Zugabe von Prolin verbessert war, wurde der Effekt näher charakterisiert. Im Vergleich zu Betain als reines Osmoprotektant fiel auf, dass ein Teil des verbesserten Wachstums, das mit Prolin zu beobachten war, auf eine Verbesserung der Osmoregulation zurückgeführt werden konnte. Auch bei Zugabe von Betain verbesserten sich die Wachstumsraten der Stämme DM1800'C7 und DM1800'C5, wenn auch geringer als bei Zugabe von Prolin. Betain kann jedoch im Gegensatz zu Prolin durch *C. glutamicum* nicht weiter verstoffwechselt werden. Der Effekt muss also durch die Funktion des Betain als Osmoprotektant erklärt werden. Bei Zugabe von Betain zeigte sich keine Veränderung der Lysinbildung.

Es zeigte sich, dass die Verbesserung des Wachstums auch durch die Rate an aufgenommenem Prolin erklärbar ist. Dabei fiel jedoch auf, dass die Prolinsupplementation zusätzlich einen deutlichen positiven Effekt auf die Glucoseaufnahmerate zeigt. Die Ermittlung der Glucoseaufnahmerate von DM1800'C7 in 4 Kultivierungen ergab $4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Bei Wachstum mit 5 mM Prolin im Medium stieg sie auf $5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, was einer

Zunahme von 25 % entspricht. Ebenso stieg die Lysinbildungsrate von $0,54 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,69 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ um 28 %, wodurch sich die differentielle Ausbeute leicht von 13 % auf 14 % verbesserte. Durch die gesteigerte Glucoseaufnahmerate und das verbesserte Wachstum verkürzt sich der Gesamtprozess und somit verbessert sich die die Raum-Zeit-Ausbeute um 15 %.

Weitere Versuche, den Effekt von Prolin auf die bessere Versorgung der Atmungskette mit Elektronen durch Supplementation mit Pyruvat und D-Lactat einzugrenzen, brachten keine positiven Ergebnisse. Der Versuch, durch das Modell die Prolinzugabe zu simulieren, ergab auch hier eine erhöhte Wachstumsrate. Die Glucoseaufnahmerate wird dabei zunächst festgelegt. Erhöht man sie auf die experimentell festgestellte, wird auch eine leicht erhöhte Lysinbildung simuliert. Dieser Zusammenhang ergibt sich, wie zuvor erläutert, aus dem Zyklus zwischen Glutamat und Prolin und den hier verschobenen Elektronen. Ob dies *in vivo* der Fall ist, könnte wahrscheinlich durch die Deletion von *putA* geklärt werden. Zunächst klingt es nicht Interessant, für die Optimierung der Lysinproduktion das deutlich teurere Prolin einzusetzen. Durch den Effekt, den es zumindest auf die Stämme mit verringerter CS-Aktivität zeigt, würden jedoch möglicherweise auch die Prozesskosten durch den verringerten zeitlichen Aufwand sinken können. Industrielle Prozesse sind aber meist Betriebsgeheimnisse; somit ist es nicht möglich, den Wert dieser Beobachtung abzuschätzen.

Der Effekt des Prolin insgesamt lässt sich nicht auf einen Faktor eingrenzen. Es muss also von einem synergistischen Effekt ausgegangen werden. Prolin trägt zu einer verbesserten Osmoregulation bei und wird ebenso als Baustein der Biomasse benötigt. Ob der dritte Effekt als Elektronenlieferant ebenso zum Tragen kommt, konnte nicht bewiesen werden. Dennoch spart die Prolinzugabe zwei NADPH in dessen Biosynthese.

4.6 Expression der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Verstärkung der Expression von *zwf* (G6PDH) zeigte in DM1800' keine signifikante Verbesserung der Lysinbildung. In den Stämmen DM1800'A14 (24 % CS) und DM1800'C7 (10 % CS) war jedoch eine Steigerung der Lysinbildung messbar. Gegenüber dem Kontrollstamm mit Leerplasmid war die Lysinbildung in DM1800'A14 um 45 % und in DM1800'C7 um 60 % gesteigert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein erhöhter Fluss im PPP positive, wenn auch deutlich geringere, Auswirkungen auf die Lysinbildung zeigt (Becker 2007). Die Erkenntnisse aus den vorangegangenen Versuchen zeigen, dass durch Verringerung der CS-Aktivität der Fluss im PPP bereits deutlich erhöht sein muss.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die noch einmal gesteigerte Menge an verfügbarem NADPH die Lysinbildung durch die Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte fördert, und

somit der beobachtete Engpass der Lysinbiosynthese verringert wurde. Zusätzlich wurde ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Stämme bei Induktion der *zwf*-Expression beobachtet, wodurch die Lysinbildung erst nach 60 Stunden abgeschlossen war. Dieses verlangsamte Wachstum wird sich ebenso positiv auf die Lysinbildung ausgewirkt haben.

5. Literaturverzeichnis

1. **Abe, S., K. Takayama, and S. Kinoshita.** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol* **16**:279-301.
2. **Aevarsson, A., K. Seger, S. Turley, J. R. Sokatch, and W. G. Hol.** 1999. Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nat Struct Biol* **6**:785-92.
3. **Arie, J. P., N. Sassoon, and J. M. Betton.** 2001. Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**:199-210.
4. **Arndt, A., M. Auchter, T. Ishige, V. F. Wendisch, and B. J. Eikmanns.** 2008. Ethanol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**:222-33.
5. **Auchter, M., A. Arndt, and B. J. Eikmanns.** 2009. Dual transcriptional control of the acetaldehyde dehydrogenase gene *ald* of *Corynebacterium glutamicum* by RamA and RamB. *J Biotechnol* **140**:84-91.
6. **Becker, J., C. Klopprogge, A. Herold, O. Zelder, C. J. Bolten, and C. Wittmann.** 2007. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*--over expression and modification of G6P dehydrogenase. *J Biotechnol* **132**:99-109.
7. **Bellmann, A., M. Vrljic, M. Patek, H. Sahm, R. Kramer, and L. Eggeling.** 2001. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter *LysE* of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **147**:1765-74.
8. **Bensadoun, A., and D. Weinstein.** 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**:241-50.
9. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**:293-300.
10. **Bettenbrock, K., T. Sauter, K. Jahreis, A. Kremling, J. W. Lengeler, and E. D. Gilles.** 2007. Correlation between growth rates, *EIIACrr* phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **189**:6891-900.
11. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-62.
12. **Blombach, B., S. Hans, B. Bathe, and B. J. Eikmanns.** 2009. Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **75**:419-27.

13. **Blombach, B., M. E. Schreiner, J. Holatko, T. Bartek, M. Oldiges, and B. J. Eikmanns.** 2007a. L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **73**:2079-84.
14. **Blombach, B., M. E. Schreiner, M. Moch, M. Oldiges, and B. J. Eikmanns.** 2007b. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:615-23.
15. **Borodina, I., P. Krabben, and J. Nielsen.** 2005. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res* **15**:820-9.
16. **Bott, M.** 2007. Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends Microbiol* **15**:417-25.
17. **Bott, M., and A. Niebisch.** 2003. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:129-53.
18. **Bussmann, M., D. Emer, S. Hasenbein, S. Degraf, B. J. Eikmanns, and M. Bott.** 2009. Transcriptional control of the succinate dehydrogenase operon *sdhCAB* of *Corynebacterium glutamicum* by the cAMP-dependent regulator *GlxR* and the LuxR-type regulator *RamA*. *J Biotechnol* **143**:173-82.
19. **Chapman, A. G., L. Fall, and D. E. Atkinson.** 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J Bacteriol* **108**:1072-86.
20. **Claes, W. A., A. Puhler, and J. Kalinowski.** 2002. Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *Journal of Bacteriology* **184**:2728-2739.
21. **Coello, N.** 1992. Physiological aspects of L-lysine production: effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*:259-262.
22. **Cramer, A., M. Aucher, J. Frunzke, M. Bott, and B. J. Eikmanns.** 2007. *RamB*, the transcriptional regulator of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*, is subject to regulation by *RamA* and *RamB*. *J Bacteriol* **189**:1145-9.
23. **Cramer, A., R. Gerstmeir, S. Schaffer, M. Bott, and B. J. Eikmanns.** 2006. Identification of *RamA*, a novel LuxR-type transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **188**:2554-67.
24. **Cremer, J., C. Treptow, L. Eggeling, and H. Sahm.** 1988. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Gen Microbiol* **134**:3221-9.
25. **Danson, M. J., and P. D. Weitzman.** 1973. Functional groups in the activity and regulation of *Escherichia coli* citrate synthase. *Biochem J* **135**:513-24.
26. **Dunican, L. K., and E. Shirvnan.** 1989. High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Biotechnology*:1067-7.

27. **Eggeling, L., and B. Michael.** 2005. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press Taylor and Francis Group.
28. **Eggeling, L., S. Oberle, and H. Sahm.** 1998. Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**:24-30.
29. **Eikmanns, B. J., N. Thum-Schmitz, L. Eggeling, K. U. Ludtke, and H. Sahm.** 1994. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140** (Pt 8):1817-28.
30. **Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein.** 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14863-8.
31. **Emer, D., A. Krug, B. J. Eikmanns, and M. Bott.** 2009. Complex expression control of the *Corynebacterium glutamicum* aconitase gene: identification of RamA as a third transcriptional regulator besides AcnR and RipA. *J Biotechnol* **140**:92-8.
32. **Feist, A. M., J. C. Scholten, B. O. Palsson, F. J. Brockman, and T. Ideker.** 2006. Modeling methanogenesis with a genome-scale metabolic reconstruction of *Methanosarcina barkeri*. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0004.
33. **Forster, J., I. Famili, P. Fu, B. O. Palsson, and J. Nielsen.** 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res* **13**:244-53.
34. **Frunzke, J., V. Engels, S. Hasenbein, C. Gatgens, and M. Bott.** 2008. Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol Microbiol* **67**:305-22.
35. **Gande, R., K. J. Gibson, A. K. Brown, K. Krumbach, L. G. Dover, H. Sahm, S. Shioyama, T. Oikawa, G. S. Besra, and L. Eggeling.** 2004. Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacteriaceae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **279**:44847-57.
36. **Georgi, T., D. Rittmann, and V. F. Wendisch.** 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng* **7**:291-301.
37. **Gerstmeir, R., A. Cramer, P. Dangel, S. Schaffer, and B. J. Eikmanns.** 2004. RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **186**:2798-809.
38. **Gerstmeir, R., V. F. Wendisch, S. Schnicke, H. Ruan, M. Farwick, D. Reinscheid, and B. J. Eikmanns.** 2003. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:99-122.

39. **Gibson, K. J., L. Eggeling, W. N. Maughan, K. Krumbach, S. S. Gurcha, J. Nigou, G. Puzo, H. Sahm, and G. S. Besra.** 2003. Disruption of Cg-Ppm1, a polyprenyl monophosphomannose synthase, and the generation of lipoglycan-less mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **278**:40842-50.
40. **Han, S. O., M. Inui, and H. Yukawa.** 2008a. Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *Microbiology* **154**:3073-83.
41. **Han, S. O., M. Inui, and H. Yukawa.** 2008b. Transcription of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in tricarboxylic acid cycle and glyoxylate cycle. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**:264-76.
42. **Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA cloning* Glover, D.M. (Ed.). IRL Press, Oxford;pp. 109-136.
43. **Hayashi, M., H. Mizoguchi, N. Shiraishi, M. Obayashi, S. Nakagawa, J. Imai, S. Watanabe, T. Ota, and M. Ikeda.** 2002. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:1337-44.
44. **Heinemann, M., A. Kummel, R. Ruinatscha, and S. Panke.** 2005. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Staphylococcus aureus* metabolic network. *Biotechnol Bioeng* **92**:850-64.
45. **Higa, A. I., E. Massarini, and J. J. Cazzulo.** 1976. [Regulation of citrate synthase in bacteria: Comparison of the action of various effectors on the enzymes of *Rhodospirillum rubrum* and *Bacillus stearothermophilus*]. *Rev Asoc Argent Microbiol* **8**:74-81.
46. **Holley, E. A., M. P. Spector, and J. W. Foster.** 1985. Regulation of NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: expression of nad-lac gene fusions and identification of a nad regulatory locus. *J Gen Microbiol* **131**:2759-70.
47. **Ideno, A., T. Yoshida, T. Iida, M. Furutani, and T. Maruyama.** 2001. FK506-binding protein of the hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* sp. KS-1, a cold-shock-inducible peptidyl-prolyl cis-trans isomerase with activities to trap and refold denatured proteins. *Biochem J* **357**:465-71.
48. **Jetten, M. S., and A. J. Sinskey.** 1995. Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**:221-7.
49. **Jin, S., and A. L. Sonenshein.** 1994a. Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* **176**:4669-79.
50. **Jin, S., and A. L. Sonenshein.** 1994b. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* **176**:4680-90.

51. **Jones, B. N., and J. P. Gilligan.** 1983. o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr* **266**:471-82.
52. **Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Kramer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfefferle, A. Puhler, D. A. Rey, C. Ruckert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegrabe, and A. Tauch.** 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**:5-25.
53. **Kalinowski, J., J. Cremer, B. Bachmann, L. Eggeling, H. Sahm, and A. Puhler.** 1991. Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **5**:1197-204.
54. **Katsumata, R., A. Ozaki, T. Oka, and A. Furuya.** 1984. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J Bacteriol* **159**:306-11.
55. **Keilhauer, C., L. Eggeling, and H. Sahm.** 1993. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**:5595-603.
56. **Khodursky, A. B., B. J. Peter, N. R. Cozzarelli, D. Botstein, P. O. Brown, and C. Yanofsky.** 2000. DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12170-5.
57. **Kim, H. J., T. H. Kim, Y. Kim, and H. S. Lee.** 2004. Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **186**:3453-60.
58. **Kinoshita, S., S. Udaka, and M. Shimono.** 1957. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**:193-205.
59. **Kircher, M., and W. Leuchtenberger.** 1998. Aminosäuren - ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie in unserer Zeit* **28**:281-293.
60. **Kjeldsen, K. R., and J. Nielsen.** 2009. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol Bioeng* **102**:583-97.
61. **Kohl, T. A., and A. Tauch.** 2009. The *GlxR* regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *J Biotechnol* **143**:239-46.
62. **Kramer, R., C. Lambert, C. Hoischen, and H. Ebbighausen.** 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur J Biochem* **194**:929-35.

-
63. **Kuhn, J., and S. Binder.** 2002. RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res* **30**:439-46.
64. **Kurek, I., F. Pirkl, E. Fischer, J. Buchner, and A. Breiman.** 2002. Wheat FKBP73 functions in vitro as a molecular chaperone independently of its peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity. *Planta* **215**:119-26.
65. **Lechevalier, M. P., A. C. Horan, and H. Lechevalier.** 1971. Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria. *J Bacteriol* **105**:313-8.
66. **Lee, K. H., J. H. Park, T. Y. Kim, H. U. Kim, and S. Y. Lee.** 2007. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol* **3**:149.
67. **Leuchtenberger, W., K. Huthmacher, and K. Drauz.** 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**:1-8.
68. **Leyval, D., D. Uy, S. Delaunay, J. L. Goergen, and J. M. Engasser.** 2003. Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:241-52.
69. **Liebl, W., A. Bayerl, B. Schein, U. Stillner, and K. H. Schleifer.** 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett* **53**:299-303.
70. **Liebl, W., M. Ehrmann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1991. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol* **41**:255-60.
71. **Lindroth, P., and K. and Mopper.** 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.*:1167-1174.
72. **Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church.** 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: Application to open reading frame characterization. *Journal of Bacteriology* **179**:6228-6237.
73. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75.
74. **Luo, B., K. Groenke, R. Takors, C. Wandrey, and M. Oldiges.** 2007. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1147**:153-64.

75. **Marx, A., B. J. Eikmanns, H. Sahm, A. A. de Graaf, and L. Eggeling.** 1999. Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metab Eng* **1**:35-48.
76. **Marx, A., K. Striegel, A. A. de Graaf, H. Sahm, and L. Eggeling.** 1997. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol Bioeng* **56**:168-80.
77. **Menkel, E., G. Thierbach, L. Eggeling, and H. Sahm.** 1989. Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl Environ Microbiol* **55**:684-8.
78. **Moritz, B., K. Striegel, A. A. De Graaf, and H. Sahm.** 2000. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur J Biochem* **267**:3442-52.
79. **Muffler, A., S. Bettermann, M. Haushalter, A. Horlein, U. Neveling, M. Schramm, and O. Sorgenfrei.** 2002. Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J Biotechnol* **98**:255-68.
80. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. und Erlich.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**:Pt1:263-173.
81. **Nakamura, J., S. Hirano, H. Ito, and M. Wachi.** 2007. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol* **73**:4491-8.
82. **Nakayama, K., K. Araki, and H. Kase.** 1978. Microbial production of essential amino acid with *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Adv Exp Med Biol* **105**:649-61.
83. **O'Regan, M., G. Thierbach, B. Bachmann, D. Villeval, P. Lepage, J. F. Viret, and Y. Lemoine.** 1989. Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Gene* **77**:237-51.
84. **Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, and M. Ikeda.** 2002. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**:217-23.
85. **Oliveira, A. P., J. Nielsen, and J. Forster.** 2005. Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol* **5**:39.
86. **Ozaki, A., R. Katsumata, T. Oka, and A. Furuya.** 1984. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **196**:175-8.

87. **Park, S. J., J. McCabe, J. Turna, and R. P. Gunsalus.** 1994. Regulation of the citrate synthase (gltA) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the arcA gene product. *J Bacteriol* **176**:5086-92.
88. **Park, S. Y., M. W. Moon, B. Subhadra, and J. K. Lee.** 2010. Functional characterization of the glxR deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: involvement of GlxR in acetate metabolism and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett*.
89. **Park, Y. H., B. R. Lee, Y. J. Seok, and A. Peterkofsky.** 2006. In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**:6448-54.
90. **Pascual, C., P. A. Lawson, J. A. Farrow, M. N. Gimenez, and M. D. Collins.** 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **45**:724-8.
91. **Patek, M., B. J. Eikmanns, J. Patek, and H. Sahm.** 1996. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology* **142 (Pt 5)**:1297-309.
92. **Peter, H., A. Burkovski, and R. Kramer.** 1996. Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum* betP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol* **178**:5229-34.
93. **Peter, H., B. Weil, A. Burkovski, R. Kramer, and S. Morbach.** 1998. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* **180**:6005-12.
94. **Peters-Wendisch, P. G., B. Schiel, V. F. Wendisch, E. Katsoulidis, B. Mockel, H. Sahm, and B. J. Eikmanns.** 2001. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:295-300.
95. **Petersen, S., C. Mack, A. A. de Graaf, C. Riedel, B. J. Eikmanns, and H. Sahm.** 2001. Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanisms in vivo. *Metab Eng* **3**:344-61.
96. **Pirkl, F., E. Fischer, S. Modrow, and J. Buchner.** 2001. Localization of the chaperone domain of FKBP52. *J Biol Chem* **276**:37034-41.
97. **Polen, T., D. Schluesener, A. Poetsch, M. Bott, and V. F. Wendisch.** 2007. Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol Lett* **273**:109-19.
98. **Radmacher, E., and L. Eggeling.** 2007. The three tricarboxylate synthase activities of *Corynebacterium glutamicum* and increase of L-lysine synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:587-95.

99. **Reed, J. L., T. D. Vo, C. H. Schilling, and B. O. Palsson.** 2003. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol* **4**:R54.
100. **Reinscheid, D. J., B. J. Eikmanns, and H. Sahm.** 1994a. Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J Bacteriol* **176**:3474-83.
101. **Reinscheid, D. J., B. J. Eikmanns, and H. Sahm.** 1994b. Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* **140 (Pt 11)**:3099-108.
102. **Richaud, F., N. H. Phuc, M. Cassan, and J. C. Patte.** 1980. Regulation of aspartokinase III synthesis in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing lysC-lac fusions. *J Bacteriol* **143**:513-5.
103. **Riedel, C., D. Rittmann, P. Dangel, B. Mockel, S. Petersen, H. Sahm, and B. J. Eikmanns.** 2001. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:573-83.
104. **Rieping, M., and T. Hermann.** 2006. *Amino Acid Biosynthesis: Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, ed. *Microbiol Monogr*2006; 9. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
105. **Ronsch, H., R. Kramer, and S. Morbach.** 2003. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *J Biotechnol* **104**:87-97.
106. **Sahm, H., and L. Eggeling.** 1999. D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl Environ Microbiol* **65**:1973-9.
107. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. and Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a Laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
108. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
109. **Santamaria, R. I., J. A. Gil, and J. F. Martin.** 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J Bacteriol* **162**:463-7.
110. **Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler.** 1994. Small Mobilizable Multipurpose Cloning Vectors Derived from the *Escherichia-Coli* Plasmids Pk18 and Pk19 - Selection of Defined Deletions in the Chromosome of *Corynebacterium-Glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
111. **Schilling, C. H., M. W. Covert, I. Famili, G. M. Church, J. S. Edwards, and B. O. Palsson.** 2002. Genome-scale metabolic model of *Helicobacter pylori* 26695. *J Bacteriol* **184**:4582-93.

112. **Schilling, C. H., and B. O. Palsson.** 2000. Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genome-scale pathway analysis. *J Theor Biol* **203**:249-83.
113. **Schrumpf, B., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Puhler, L. Eggeling, and H. Sahm.** 1991. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **173**:4510-6.
114. **Sekine, H., T. Shimada, C. Hayashi, A. Ishiguro, F. Tomita, and A. Yokota.** 2001. H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**:534-40.
115. **Shalon, D., S. J. Smith, and P. O. Brown.** 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**:639-45.
116. **Shiio, I., H. Ozaki, and K. Ujigawa-Takeda.** 1982. Production of aspartic acid and lysine by citrate synthase Mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agricultural Biological Chemistry*:101-107.
117. **Shiio, I., H. Ozaki, and K. Ujigawa.** 1977. Regulation of citrate synthase in *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J Biochem* **82**:395-405.
118. **Shinfuku, Y., N. Sorpitiporn, M. Sono, C. Furusawa, T. Hirasawa, and H. Shimizu.** 2009. Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* **8**:43.
119. **Sonntag, K., L. Eggeling, A. A. De Graaf, and H. Sahm.** 1993. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* **213**:1325-31.
120. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-17.
121. **Szymkowiak, C., W. S. Kwan, Q. Su, T. J. Toner, A. R. Shaw, and R. Youil.** 2003. Rapid method for the characterization of 3' and 5' UTRs of influenza viruses. *J Virol Methods* **107**:15-20.
122. **Tauch, A., O. Kirchner, B. Loffler, S. Gotker, A. Puhler, and J. Kalinowski.** 2002. Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Current Microbiology* **45**:362-367.
123. **Teusink, B., A. Wiersma, D. Molenaar, C. Francke, W. M. de Vos, R. J. Siezen, and E. J. Smid.** 2006. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *J Biol Chem* **281**:40041-8.
124. **Thiele, B., K. Fullner, N. Stein, M. Oldiges, A. J. Kuhn, and D. Hofmann.** 2008. Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* **391**:2663-72.

125. **Thierbach, G., J. Kalinowski, B. Bachmann, and A. Puhler.** 1990. Cloning of a DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartokinase. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**:443-8.
126. **van Ooyen, J., D. Emer, M. Bussmann, M. Bott, B. J. Eikmanns, and a. L. Eggeling.** 2010. Citrate synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *gltA* transcripts which are controlled by RamA, RamB, and GlxR. *J Biotechnol*.
127. **Varela, C., E. Agosin, M. Baez, M. Klapa, and G. Stephanopoulos.** 2003. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:547-55.
128. **Vasicova, P., Z. Abrhamova, J. Nesvera, M. Patek, H. Sahm, and B. Eikmanns.** 1998. Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Techniques* **12**:743-746.
129. **Vasicova, P., M. Patek, J. Nesvera, H. Sahm, and B. Eikmanns.** 1999. Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* promoter. *J Bacteriol* **181**:6188-91.
130. **Vrljic, M., H. Sahm, and L. Eggeling.** 1996. A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **22**:815-26.
131. **Wada, M., N. Hijikata, R. Aoki, N. Takesue, and A. Yokota.** 2008. Enhanced valine production in *Corynebacterium glutamicum* with defective H⁺-ATPase and C-terminal truncated acetoxyacid synthase. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**:2959-65.
132. **Weitzman, P. D., and D. Jones.** 1968. Regulation of citrate synthase and microbial taxonomy. *Nature* **219**:270-2.
133. **Wendisch, V. F., A. A. de Graaf, H. Sahm, and B. J. Eikmanns.** 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**:3088-96.
134. **Wendisch, V. F., M. Spies, D. J. Reinscheid, S. Schnicke, H. Sahm, and B. J. Eikmanns.** 1997. Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch Microbiol* **168**:262-9.
135. **Wendisch, V. F., D. P. Zimmer, A. Khodursky, B. Peter, N. Cozzarelli, and S. Kustu.** 2001. Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal Biochem* **290**:205-13.
136. **Wilde, R. J., and J. R. Guest.** 1986. Transcript analysis of the citrate synthase and succinate dehydrogenase genes of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **132**:3239-51.

137. **Wolf, H., A. Pühler, and E. Neumann.** 1989. Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 283-289.
138. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.

Anhang

Liste der verwendeten Oligonukleotide

Deletion des *gltA* Promotorbereichs 160bp

<i>gltA</i> 5' in	CCCCTCGAGAAACATGCATAAGCCAATTCCTCCCAACAATCACG
<i>gltA</i> 5' out	CCCCCGGGGGGCGAACTATTGAAAACGCGGGGAT
<i>gltA</i> 3' in	TATGCATGTTTCTCGAGTGGGCCGAACAAATATGTTTCAAAGGGAT
<i>gltA</i> 3' out	TGCTCTAGATGAACTGGGACTTGAAGTCCTC

RLM-Race Analyse zur *gltA* UTR Analyse

<i>gltA</i> 3' p1	CCGTATTGTTTCGCAATCGGTTCG
<i>gltA</i> 3' p2	GCAGCTCGGTGCAGCAGGCAAC
<i>gltA</i> 5' p2	GAACTCGCCACCGGGGTAGTGC
<i>gltA</i> 5' p1	TCTCAGACAGCATCTTGCCAGG
<i>gltA</i> UTR RT	CGACTCGGTGGAGCCAGTGCTC
P <i>gltA</i> RT up	ATCACGTTGGTTACATCATTCCTCCGACC

Sequenzierung der Promotoren der Pet2 Plasmide

>pET2+	AAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACG
>pEt2-	GGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGC

Sequenzierung der P*gltA* Promotormutanten

>P <i>gltA</i> +	TAACGATCTGACCCAACAACATAACC
>P <i>gltA</i> -	ACTCGCCACCGGGGTAGTGCAGG

Northernblotanalysen

<i>gltA</i> Sonde	
<i>gltA</i> Sonde+	atgtttgaaaggatcgtggctac
<i>gltA</i> Sonde-	gaacggttgcttatcaagctgtgc
<i>fkf</i> Sonde	
ppcti+	ATGGAAAAGCCACAGATTGAGCTACC
ppcti-	TTATGCGCTGATCAAATCGATGATGAAC

Produkte zur Integration der *dapA*-Promotoren in pK19P*gltA*_B

P <i>dapA</i> for	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTATCACACCCAAGAGCTAAAAATTCA
P <i>dapA</i> rev	CCGCTCGAGCGGCTCCGGTCTTAGCTGTTAAACCT
Nachweis des Austauschs im Genom	
P <i>gltA</i> up	ATGAGTCCGAAGGTTGCTGCAT
P <i>gltA</i> down	TCGAGTGGGTTTCAGCTGGTCC

Produkte zur Deletion von *fkf*

ppcti-5'+	TCGGACACCGGTTTTACAAGAACTACG
ppcti-5'-	GACCGGTAGCTCAATCTGTGGCTTTTCC
ppcti-3'+Fus	GGAAAAGCCACAGATTGAGCTACCGGTCGTGTTTCATCATCGATTTGATCAGCGC
ppcti-3'-	CGTTTTGCGCGTTCGTGGCATTTTCGC
Nachweis der Deletion von <i>fkf</i>	
PPCTI-up	ACAAGGAAGACGGCGTCCGCCTCATGGGCT
PPCTI-down	GCAGGATCGCCGCTTCACGCTTGGGCCGCA

Nachweis der Deletion von prpC1, prpC2, pck, aceAB und odx

pck up	GGGTGGTGACAGTGCGGGCATGC
pck down	CCTTTGACGTGGTGTACTCCTCCAACG
aceB down	CCTGAAGGTGAGCTGTTGTTTGTAGC
aceA down	GCGTAGTAGCCGCCCTCTGGATCAAGTCC
odx up	GCGACGTGATTGATCTGAGCGGCGC
odx down	AAGGCTTCGCTCAGGTTTTCCGACAGCC
prpC1 up	ACAGACGTGATGGTTCGACGCA
prpC1 down	GCAGCGTGCATTCCCACCATC
prpC2 up	CGGGAGTGGAAGGCATCGACT
prpC2 down	CAAAACACCGAGGAGATTTTCTAC

Sequenzierung von AceF

AceELip+	ATGGCGTTCTCCGTAGAGATGCCCGAGC
AceELip-	CCAGAAGCGGACACAGTTGCGGATGC

Sequenzalignment der genutzten dapA Promotoren

A8 (wt)	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
A14	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
A16	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
A23	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
A25	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
B6	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
C5	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
C7	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
L1	1	atgcattggttctgcagttatcacaccaagagctaaaaattcatatagttaagacaacattttggctgt
A8 (wt)	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
A14	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
A16	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
A23	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
A25	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
B6	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
C5	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
C7	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
L1	71	aaaagacagccgtaaaaaacctcttgctcgtgtcaattgttcttatcggaatgtggcttggcgattgta
A8 (wt)	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtaaccttgaactc
A14	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtaaccttgaactc
A16	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
A23	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
A25	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
B6	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
C5	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
C7	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
L1	141	tgcaaaagtgttaggttttttgcggggttggttaacccccaaatgagggaagaaggtataattgaactc
A8 (wt)	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
A14	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
A16	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
A23	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
A25	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
B6	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
C5	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
C7	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag
L1	211	tatgagcacaggtttaacagctaagaccggagccgctcgag

Nebenprodukte der DM1800' CS-Stämme

Stamm	Zeit	ASP	GLU	GLY	ALA	VAL	Met	ILE	LEU	HIS	HSE
	[h]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_L1	20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C7	20		0,01	0,00	0,01	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C5	20	n.a.		n.a.	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_B6	20		0,01	0,00	0,01	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A25	20		0,02	0,00	0,01	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A23	20	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A16	20	0,01	0,02	n.a.	0,01	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A14	20	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	n.a.	n.a.	0,00	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A8	20		0,01	0,00	0,01	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2ΔPglA	20	0,01	n.a.	0,01	0,02	0,01	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2	20		0,02	0,00	0,03	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_L1	40	n.a.	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C7	40		0,02	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C5	40	0,01	0,01	0,01	0,06	0,01	n.a.	n.a.	0,00	0,02	n.a.
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_B6	40		0,01	0,03	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A25	40	n.a.	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A23	40	n.a.	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A16	40	n.a.	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A14	40	n.a.	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A8	40	n.a.	0,02	0,03	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
DM1800ΔprpC1ΔprpC2ΔPglA	40		0,03	0,04	0,01	0,02	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00
DM1800ΔprpC1ΔprpC2	40	n.a.	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00

Nebenprodukte der DM1800' CS-Stämme

Stamm	Zeit	Milchsäure	Trehalose	OD 660nm
	[h]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹]	
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_L1	20	1,2004	n.a.	14,68
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C7	20	0,6456	n.a.	7,39
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C5	20	n.a.	n.a.	0,98
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_B6	20	0,9104	n.a.	11,52
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A25	20	1,832	0,46	23,57
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A23	20	1,6251	0,72	17,98
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A16	20	2,669	0,7	26,72
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A14	20	1,4445	0,63	18,92
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A8	20	0,9475	n.a.	10,63
DM1800ΔprpC1ΔprpC2ΔPglA	20	1,2381	n.a.	8,50
DM1800ΔprpC1ΔprpC2	20	3,3858	0,83	29,44
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_L1	40	n.a.	0,57	24,11
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C7	40	n.a.	0,76	19,12
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_C5	40	1,5919	0,59	7,82
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_B6	40	n.a.	0,47	22,77
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A25	40	n.a.	n.a.	24,78
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A23	40	n.a.	0,04	23,98
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A16	40	n.a.	n.a.	27,16
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A14	40	n.a.	0,51	22,52
DM1800ΔprpC1ΔprpC2PglA_dapA_A8	40	n.a.	0,52	21,48
DM1800ΔprpC1ΔprpC2ΔPglA	40	n.a.	0,08	19,79
DM1800ΔprpC1ΔprpC2	40	n.a.	0,03	22,66

Nebenprodukte im Überstand der DM1800' CS-Stämme bei Transkriptomanalysen

Stamm	OD _{600nm}	Lysin	Milchsäure	Acetat	Ethanol
		[mMol]	[mMol]	[mMol]	[mMol]
DM1800'L1	9,3 ± 0,6	3,2 ± 0,2	6,5 ± 0,2	1,3 ± 0,4	0
DM1800'C7	9,8 ± 0,4	3,9 ± 0,3	5,3 ± 0,3	2,1 ± 0,5	0
DM1800'A16	9,6 ± 0,5	4,3 ± 0,3	5,2 ± 0,4	1,8 ± 0,6	0
DM1800'A14	10,6 ± 0,8	4,1 ± 0,2	6,1 ± 0,1	1,9 ± 0,7	0
DM1800'	9,9 ± 0,5	3,8 ± 0,5	6,4 ± 0,5	2,5 ± 0,4	0

Mittelwerte der 3 Kultivierungen (A14 4 Kultivierungen)

2. Kultivierung der DM1933' CS-Stämme

Stamm	Medium	Zeit	g/l		CS	μ	
		[h]	Lys*HCL	OD _{660nm}			Lys'/OD
DM1933	CGXII +2g/l CSL	40	11,19	40,19	0,28	100	0,28
DM1933'	CGXII +2g/l CSL	40	11,03	34,50	0,32	100	0,28
DM1933'A16	CGXII +2g/l CSL	40	12,15	35,20	0,35	32	0,24
DM1933'A25	CGXII +2g/l CSL	40	13,16	32,50	0,40	26	0,23
DM1933'A14	CGXII +2g/l CSL	40	12,86	34,77	0,37	24	0,23
DM1933'A23	CGXII +2g/l CSL	40	14,28	31,92	0,45	23	0,22
DM1933'L1	CGXII +2g/l CSL	40	14,28	34,95	0,41	16	0,19
DM1933'A8	CGXII +2g/l CSL	40	11,69	34,41	0,34	16	0,19
DM1933'B6	CGXII +2g/l CSL	40	6,82	15,70	0,43	13	0,19
DM1933'C7	CGXII +2g/l CSL	40	15,93	28,89	0,55	10	0,17
DM1933'C5	CGXII +2g/l CSL	40	8,59	7,44	1,15	6	0,08

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Bott bedanke ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens und die grossartigen Möglichkeiten und Arbeitsbedingungen des IBT-1.

Bei Herrn Prof. Dr. Sahm bedanke ich mich für die Übernahme des Korefferats und dem großen Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Eggeling sehr herzlich für die Überlassung des Themas, sowie Seine sehr gute und engagierte Betreuung, Hilfsbereitschaft und vor allem Geduld bedanken.

Bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die gute Labororganisation bedanken.

Allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie 1 und 2, sowie der Infrastruktur gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für Ihre Hilfe und Unterstützung während des gesamten Studiums.

Ich danke meiner Freundin Sylvi Kühne für Ihre Unterstützung und Geduld in den letzten Wochen dieser Diplomarbeit.

Die vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Außerdem habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 30.03.2010

Jan van Ooyen