

**Nutzung heterologer Transporter zur
Steigerung der L-Threonin-Bildung mit
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural – Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Ramon Pascal Diesveld

aus Kleve

September 2008

Aus dem Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrum Jülich GmbH

Referent: Univ. - Professor Dr. rer. nat. Hermann Sahn
Institut für Biotechnologie 1
Forschungszentrum Jülich GmbH

Korreferent: Univ. - Professor Dr. rer. nat. Lutz Schmitt
Institut für Biochemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

I. Abstract	1
II. Zusammenfassung	2
III. Einleitung	3
IV. Material und Methoden	8
1. Chemikalien und Enzyme	8
2. Bakterienstämme und Plasmide.....	8
3. Oligonukleotide	11
4. Nährmedien	11
4.1. Medienzusätze	11
5. Kultivierung der Bakterien	12
5.1. Stammhaltung	12
6. Molekularbiologische Methoden	12
6.1. Isolierung von DNA	12
6.2. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	13
6.3. Restriktion	13
6.4. 5'-Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA	13
6.5. Ligation	14
6.6. Agarose-Gelelektrophorese	14
6.6.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	14
6.6.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	14
6.7. Transformationstechniken	17
6.7.1. Transformation von <i>E. coli</i>	17
6.7.2. Transformation von <i>C. glutamicum</i>	17
6.8. Polymerasekettenreaktion	16
6.8.1. Crossover-PCR	17
6.8.2. Gerichtete Mutagenese des Gens <i>ilvA</i>	17
6.9. Ortsgerichtete Mutagenese – Das pK19 <i>mobsacB</i> -System	18
6.10. Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse	18
7. mRNA-Quantifizierung mittels <i>RealTime</i> RT-PCR	19
7.1. Isolierung bakterieller Gesamt-RNA	19

7.2. Synthese der cDNA	19
7.3. <i>RealTime</i> PCR	20
7.4. Auswertung der Quantifizierung	21
8. Globale Transkriptomanalyse	23
8.1. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	23
8.2. DNA-Chip-Technologie	24
8.3. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips	25
8.4. DNA-Chip-Hybridisierung	26
8.5. Fluoreszenz-Messung von DNA-Chips	26
8.6. Auswertung von DNA-Chips	27
8.7. Oligonukleotid-basierende DNA-Chips	28
9. Chromatographische Methoden	28
9.1. Bestimmung organischer Säuren mittels HPLC	28
9.2. Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC	28
10. Enzymatische Analysen	30
10.1. Enzymatisch-photometrische Glukose-Bestimmung	30
10.2. Bestimmung der Threonindehydratase-Aktivität	31
11. Protein-biochemische Analysen	31
11.1. Expressionskulturen	31
11.2. Zellaufschluss	32
11.3. Proteinkonzentrations-Bestimmung	32
11.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
11.5. Western-Blot-Analyse	33
12. Exportratenbestimmung im Peptid-System	34
V. Ergebnisse	35
1. Suche nach Aminosäure-Transportern mittels globaler Transkriptomanalyse	35
1.1. Wachstum und Genexpressionen bei Zugabe ausgewählter Aminosäuren	35
2. Nutzung von Exportern aus <i>E. coli</i> in <i>C. glutamicum</i>	44
2.1. Auswahl von Kandidaten zur L-Threonin-Produktion	44
2.2. Überprüfung ausgewählter Transporter	45
2.3. Produktbildung mit <i>C. glutamicum</i> DM1800-T	50
2.4. Bestimmung zellinterner Konzentrationen und Exportraten	53

2.5. Transkriptquantifizierung unter Produktbildungsbedingungen.....	60
2.6. Auswirkungen von pEKEx2 <i>rhtC hom thrB</i> auf die L-Threonin-Akkumulation	62
2.7. Einführung chromosomaler Mutation in <i>ilvA</i> (Threonin-Dehydratase)	64
2.8. Produktbildung und Produktbildungsraten mit den konstruierten Stämmen .	66
2.9. Flussanalysen und chromosomale Mutationen in den Genen <i>gltA</i> und <i>pyc</i>	71
3. Überproduktion des Transporters RhtC aus <i>E. coli</i> und der Decaprenyl-Transferase UbiA aus <i>M. tuberculosis</i>	78
3.1. Überproduktion der Proteine RhtC und UbiA mit <i>E. coli</i>	79
3.2. Überproduktion der Proteine RhtC und UbiA in einem <i>in vitro</i> System	83
VI. Diskussion	85
1. Globale Transkriptomanalyse zur Identifizierung von Transportern	85
2. Nutzung heterologer Threonin-Exporter aus <i>E. coli</i> in <i>C. glutamicum</i>	86
VII. Literaturverzeichnis	92
VIII. Anhang	102

Abkürzungen

A	Adenin
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenin-5'-Triphosphat
BCA	Bicinchonin-Säure (<i>Bicinchononic acid</i>)
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	BHI mit Sorbitol
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin; Kohlenstoff
C-/Terminus	Carboxyterminus von Peptiden
Carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
CP	<i>crossing point</i>
d	Schichtdicke der Küvette
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FBR	<i>Feedback resistant</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung [m/s ²]
G	Guanin
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- b-D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobase(n)
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
LED	Licht emittierende Diode
m	Meter
M	Molarität [mol/l]
Mr	relative molare Masse
mcs	Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
N-Terminus	Aminoterminus von Peptiden
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
orf	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNase	Ribonuklease
U _{pm}	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
RTase	reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
sp.	Spezies
SSC	Saline Sodium Citrat
t	Zeit
T	Thymin
t/a	Tonnen pro Jahr
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofolat
T _m	Schmelztemperatur der DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheiten (<i>Units</i>) [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
W	Watt
WT	Wildtyp

I. Abstract

Transporters take part in the most essential processes of the cell due to their function in substrate and product transport. In biotechnological applications export is often the limiting step. The main objective of this thesis was to analyze transport processes in *Corynebacterium glutamicum* and to overcome export limitations in L-threonine production by the use of heterologous transporters.

Although the amino acids L-aspartate, L-serine and L-threonine are co-consumed together with glucose, transcriptome analysis did not reveal any distinct indication of increased expression of the amino acid importers involved in the uptake. However, a hitherto unknown transcriptional regulation of the genes *glyA* and *serA* encoding for serine hydroxymethyltransferase and 3-phosphoglycerate dehydrogenase by L-serine was discovered.

Of the four analyzed transporters RhtA, RhtB, RhtC and YeaS from *Escherichia coli* the two transporters RhtA and RhtC could effectively catalyze the export of L-threonine in *C. glutamicum*. Whereas the use of peptides without expression of RhtC led to the accumulation of up to 140 mM of cell-internal L-threonine, the cell-internal concentration was reduced to a maximum of 10 mM due to RhtC-mediated export. Under these conditions a maximal export rate of $8.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ was determined for RhtC and of $5.8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ for RhtA. Moreover, it was shown that RhtA also exports L-serine in addition to L-threonine.

In addition to the export, increased L-threonine accumulations were achieved in the strain background of *C. glutamicum* DM1800 pEC-T18 *hom*^{fb} *thrB thrE* pEKEx2 *rhtC*. Inactivation of the threonine dehydratase resulted in a rise of 20%, increased transcription of the pyruvate carboxylase by 5% and reduced citrate synthase activity by 15%. The maximal export rate obtained was $13.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ and the maximal accumulation of L-threonine was 66 mM with a yield of 0.3 mol L-threonine per mol glucose. This is a 900% increase compared to the strain present at the beginning of this thesis. Due to the product spectrum and the internal concentration it can therefore be assumed that by using the heterologous transporter RhtC the export of L-threonine is no longer limiting.

II. Zusammenfassung

Auf Grund ihrer Funktion des Substrat- und Produkt-Transports sind Transporter an den elementarsten Prozessen der Zelle beteiligt. Bei biotechnologischen Anwendungen ist häufig der Export der limitierende Schritt. Ziel dieser Arbeit war es, Transportprozesse bei *Corynebacterium glutamicum* zu untersuchen und durch Nutzung heterologer Transporter gezielt die Exportlimitierung bei der L-Threonin-Produktion zu beseitigen. Zusätzlich zur zellulären Synthese von Aminosäuren sind auch Transportprozesse für die mikrobielle Aminosäurebildung relevant. Insbesondere erfordert massive Aminosäuresynthese eine entsprechend hohe Exportleistung der Zelle. Neben dem Einsatz globaler Transkriptomanalysen war es das herausragende Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob durch Nutzung heterologer Transporter die Exportlimitierung bei der L-Threonin-Produktion mit *Corynebacterium glutamicum* beseitigt werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass L-Aspartat, L-Serin und L-Threonin zusammen mit Glukose aufgenommen werden. Durch globale Transkriptomanalysen wurde aber kein eindeutiger Hinweis auf die an der Aufnahme beteiligten Transporter erhalten. Dagegen wurde eine bisher unbekannte transkriptionelle Regulation der Gene *glyA* und *serA* durch L-Serin entdeckt.

Von den vier untersuchten Exportern RhtA, RhtB, RhtC und YeaS aus *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass RhtA und RhtC effektiv in *Corynebacterium glutamicum* den L-Threonin Export katalysieren. Während im Ausgangsstamm zellintern bis zu 140 mM L-Threonin akkumulieren, wird durch den RhtC bedingten Export die zellinterne Konzentration auf 10 mM erniedrigt. Für RhtC konnte eine Exportrate von $8,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ und für RhtA eine von $5,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ bestimmt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RhtA neben L-Threonin auch L-Serin exportieren kann.

Zusätzlich zum Export wurde durch *Metabolic Engineering* des Stoffwechsels eine gesteigerte L-Threoninbildung im Stammhintergrund *Corynebacterium glutamicum* DM1800 pEC-T18 *hom^{thr} thrB thrE* pEKEx2 *rhtC* erreicht: Inaktivierung der Threonin-Dehydratase führte zu einer Steigerung von 20%, verstärkte Transkription der Pyruvat-Carboxylase um 5% und Reduktion der Citrat-Synthase Aktivität um 15%. Die maximal erreichte Exportrate war $13,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ und die maximale extrazelluläre Akkumulation betrug 66 mM L-Threonin mit einer Ausbeute von 0,3 mol pro mol Glukose. Gegenüber dem anfangs vorliegenden Stamm beträgt die Steigerung 900%. Aufgrund des Produktspektrums, sowie der internen Konzentrationen, ist davon auszugehen, dass der Export von L-Threonin durch Nutzung des heterologen Transporters RhtC in *Corynebacterium glutamicum* nun nicht mehr limitierend ist.

III. Einleitung

Auf Grund der starken Nachfrage in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie zählen L-Aminosäuren mit zu den wichtigsten biotechnologisch hergestellten Produkten. Dabei sind die drei Aminosäuren mit dem mengenmäßig größten Marktanteil L-Glutamat mit 1.800.000 Tonnen (Nakamura et al., 2007), L-Lysin mit 850.000 Tonnen und L-Threonin mit 70.000 Tonnen pro Jahr bei jährlichen Steigerungsraten von 5-7% (Leuchtenberger et al., 2005), während 850.000 Tonnen L-Methionin pro Jahr noch durch chemische Synthese gewonnen werden (Demain et al., 2000, Eggeling et al., 2001). Während L-Glutamat und L-Lysin mit modifizierten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden findet die Produktion von L-Threonin mit *Escherichia coli* statt. Auf Grund der von *E. coli* sekretierten Enterotoxine muss dieser Organismus von den produzierten Aminosäuren zur Verfütterung von L-Threonin jedoch abgetrennt werden (Rieping et al., 2006). Im Gegensatz dazu müssen *C. glutamicum* Zellen nur inaktiviert und können zusammen mit der produzierten Aminosäure als Futtermittelzusatz verwendet werden (Rieping et al., 2006). Dies stellt einen erheblichen Vorteil bei der Produktion auf Grund wegfallender Aufreinigungsschritte dar.

Sowohl *C. glutamicum* als auch seine Subspezies *flavum* und *lactofermentum* gehören zu den bedeutendsten Eubakterien in der weißen Biotechnologie (Eggeling und Sahm 1999). *C. glutamicum* wurde 1957 als *Micrococcus glutamicus* von Kinoshita et al. aus Bodenproben isoliert (1957). Es ist ein Gram-positives, nicht-Sporenbildendes, unbewegliches, Biotin-auxotrophes Eubakterium aus der Gruppe der Mykol-haltigen Actinomyceten und ist mit den Gattungen *Mycobacterium* und *Nocardia* eng verwandt (Pascual et al., 1995, Stackebrandt et al., 1997). Die keulenförmige Morphologie (coryneform) und die Eigenschaft bei Biotin-Mangel L-Glutamat auszuschcheiden waren namensgebende Aspekte (Kinoshita et al., 1957). Der einzigartige Zellwandaufbau ist eine Besonderheit der *Corynebacterianae*. Obwohl sie zu den Gram-positiven Bakterien zählen, wird die Zellwand auf Grund der gebildeten Mykolsäuren von einer zweiten Lipidschicht umgeben (Minnikin et al., 1978). Frühzeitig wurde der isolierte *C. glutamicum* Stamm durch molekular-genetische Methoden zur verbesserten Aminosäure-Produktion verändert (Katsumata et al., 1984, Ozaki et al., 1984, Santamaria et al., 1984). Durch den ständigen Wettbewerb ist die Weiterentwicklung vorhandener Stämme zur Steigerung der Produktivität unerlässlich. Dabei findet bislang hauptsächlich eine Fokussierung auf die Modifizierung der jeweiligen Aminosäure-Biosynthese mit dem Ziel der Überproduktion statt.

Während die Kenntnis über derartige, genetische Veränderungen des Zentralstoffwechsels und der anschließenden Synthesewege verschiedener Aminosäuren bereits gut untersucht sind, ist dies nicht der Fall für den Export von Aminosäuren. Als einer der ersten Aminosäure-Exporter wurde der L-Lysin-Transporter LysE aus *C. glutamicum* molekular untersucht (Vrljic et al., 1996). Die außerordentliche Bedeutung des Exports in biotechnologischen Prozessen konnte anhand des L-Lysin-Transports veranschaulicht werden, da die Deletion des für den L-Lysin-Exporter kodierenden Gens *lysE* zur vollständigen Exportinhibierung in *C. glutamicum* führt (Bellmann et al., 2001). Daher beruht die Möglichkeit L-Lysin mit *C. glutamicum* zu produzieren auch auf der Anwesenheit dieses Transporters. Weitere Exporter, die neben LysE aus *C. glutamicum* identifiziert wurden, sind ThrE (Simic et al., 2001) und BrnFE (Kennerknecht et al., 2002). ThrE exportiert L-Threonin und L-Serin (Simic et al., 2001), wogegen BrnFE L-Isoleucin, L-Leucin, L-Valin (Kennerknecht et al., 2002) und auch L-Methionin exportiert (Trötschel et al., 2005).

Die drei Transporter LysE, BrnFE und ThrE repräsentieren jeweils Modellproteine neuartiger Proteinfamilien (Vrljic et al., 1999, Yen et al., 2002). Sogar fünf paraloge, strukturell verwandte Transporter zu LysE sind in *E. coli* gefunden worden (Aleshin et al., 1999, Vrljic et al., 1999), darunter der Transporter RhtB, der am Export von L-Homoserin und Homoserinlaktat beteiligt ist, und RhtC, der L-Threonin transportiert. Des Weiteren katalysiert der paraloge Transporter YeaS den Export von L-Leucin (Kutukova et al., 2005) und YfiK denjenigen von O-Acetylserin und L-Cystein (Franke et al., 2003). Darüber hinaus wurden drei am Aminosäure-Export in *E. coli* beteiligten Transporter, die Mitglieder der *Major Facilitator Superfamily* (MFS) sind, gefunden. Der Exporter RhtA katalysiert den L-Threonin-Transport (Livshits et al., 2003), der Exporter YdeD den L-Cystein-Export (Dassler et al., 2000) und YddG den Export aromatischer Aminosäuren (Doroshenko et al., 2007). Allerdings sind Exporter wegen experimentellen Schwierigkeiten häufig nur relativ schlecht charakterisiert. So ist z.B. bei einigen Exportern aus *E. coli* nur bekannt, dass sie Resistenz gegen die extrazellulär dargebotene Aminosäure erhöhen (Zakateva et al., 1999, Livshits et al., 2003), was auf Export schließen lässt, oder dass sie den Gesamtertrag an Produkt erhöhen (Kruse et al., 2002, Lee et al., 2007).

Neben Exportern sind auch einige Importer aus *C. glutamicum* identifiziert worden. Unter anderem der ABC-Transporter GluABCD, der die L-Glutamataufnahme katalysiert (Kronemeyer et al., 1995) oder AroP, der für die Aufnahme aromatischer Aminosäuren verantwortlich ist (Wehrmann et al., 1995). Die Untersuchung von Aufnahmesystemen ist

interessant, da im Falle der L-Tryptophan-Bildung mit *C. glutamicum* gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierung des L-Tryptophanaufnahme-Systems den Gesamtertrag an L-Tryptophan erhöhte (Ikeda et al., 1994).

Da mit *C. glutamicum* außerordentlich erfolgreich L-Glutamat und L-Lysin produziert wird, sind bereits Versuche unternommen worden die herausragenden Kenntnisse des Stoffwechsels auch für die L-Threonin-Produktion zu nutzen (Simic et al., 2002). Obwohl die L-Threonin-Synthese die ersten Schritte mit der L-Lysin-Synthese gemeinsam hat, ist eine effiziente L-Threonin-Bildung mit *C. glutamicum* nicht ohne Weiteres möglich. Ausgehend von der L-Lysin-Biosynthese setzt die L-Threonin-Biosynthese an dem Verzweigungsknoten des L-Aspartat-Semialdehyds an und führt den Stoffwechselfluss durch die drei Enzymreaktionen der Homoserin-Dehydrogenase (*hom*), der Homoserin-Kinase (*thrB*) und der Threonin-Synthase (*thrC*) zu L-Threonin fort. Eine Studie, in der die Folge der graduellen Kopienzahl-Steigerung der Gene *hom* und *thrB* in einem L-Lysin-Produktionsstamm untersucht wurde, führte zu der Erkenntnis, dass bereits drei zusätzliche Kopien dieser Gene die extrazelluläre L-Threonin-Konzentration zwar moderat ansteigen lässt, gleichzeitig aber die intrazelluläre Konzentration drastisch erhöht ist (Reinscheid et al., 1994). Dies weist darauf hin, dass ein wesentlicher Unterschied zwischen der L-Lysin- und L-Threonin-Produktion mit *C. glutamicum* die unterschiedliche Exportkapazität der zwei Aminosäuren ist (Abbildung 1). Wie die molekularbiologischen Untersuchungen ergeben haben, wird die Expression des L-Lysin Exporters LysE strikt durch den Regulator LysG reguliert (Bellmann 2001). Ohne erhöhte intrazelluläre L-Lysin-Konzentration, wie es beim Wachstum von *C. glutamicum* in Minimalmedium der Fall ist, wird *lysE* nicht exprimiert. Bei erhöhter Konzentration wie sie z.B. durch Anwesenheit L-Lysin-haltiger Peptide, auf Komplexmedium oder auch in Produktionsstämmen vorliegt, interagiert L-Lysin mit dem Regulatorprotein LysG, und dieser Komplex induziert die Transkription von *lysE* (Bellmann et al., 2001). Dieses natürliche System verhindert, dass es zu toxischen, intrazellulären L-Lysin-Konzentrationen in *C. glutamicum* kommt und ist so effektiv, dass eine Limitation des L-Lysin-Exports in Produktionsstämmen nicht bekannt ist. Dies ist beim L-Threonin-Export nicht der Fall. Der L-Threonin-Exporter ThrE exportiert nachweislich L-Threonin, sowie auch L-Serin (Simic 2001), doch könnte die natürliche Funktion auch eine andere als der L-Threonin Export sein. Anders als für *lysE* gibt es keinen spezifischen Regulator für *thrE*. Darüber hinaus besitzt ThrE noch eine zusätzliche Domäne unbekannter Funktion, die untypisch für Transporter ist (Yen et al., 2002). Des Weiteren ist trotz Überexpression von *thrE* und verstärkter L-Threonin-Synthese nur eine mäßig verstärkte extrazelluläre L-Threonin-Akkumulation zu

beobachten (Simic et al., 2001). Es gelang bisher noch nicht eine vollständige Umlenkung des Metabolitflusses in *C. glutamicum* von L-Lysin zu L-Threonin zu erreichen, da zusätzlich zu L-Lysin auch immer das L-Threonin-Abbauprodukt Glycin extrazellulär gefunden wurde (Nakamori et al., 1987). Auch dies deutet auf intrazellulären Anstau von L-Threonin hin, sodass die eigentliche Barriere zur Erzeugung eines effizienten L-Threonin produzierenden *C. glutamicum* Stammes der Export darzustellen scheint (Eggeling und Sahl 2003, Eggeling et al., 2006).

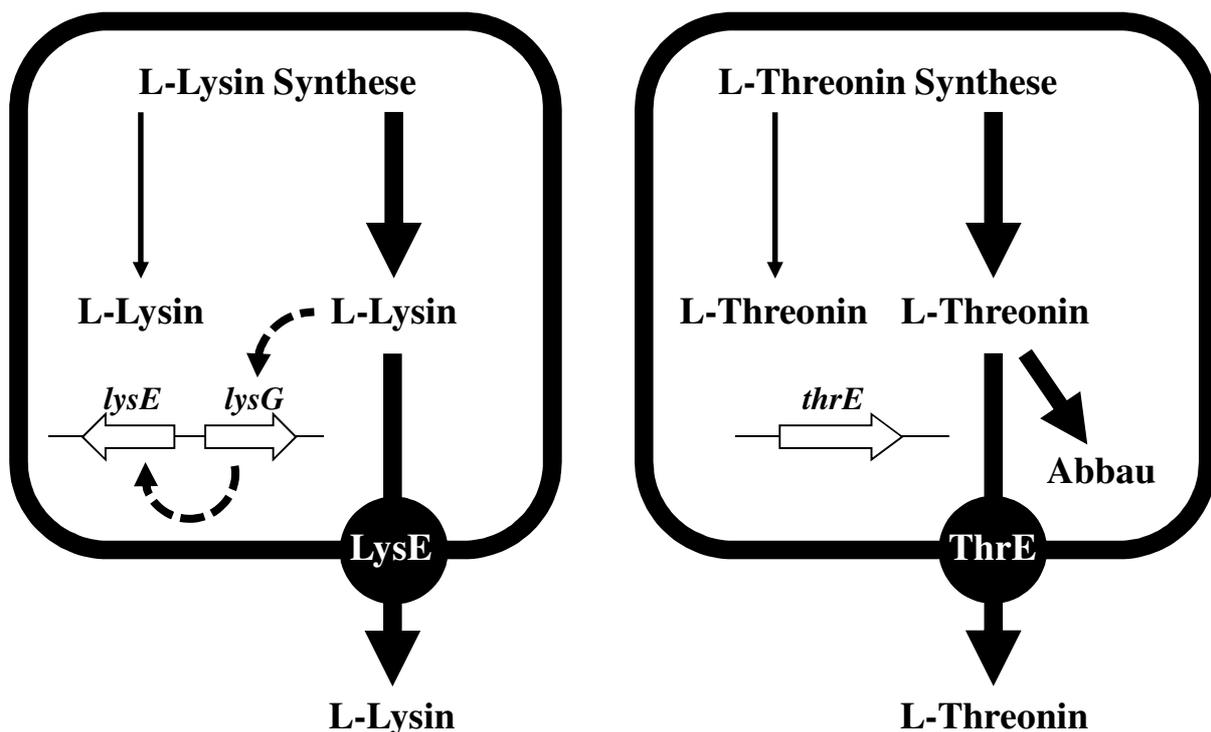


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Unterschieds zwischen der L-Lysin- und L-Threonin-Produktion mit *C. glutamicum*. Der linke Pfeil in der jeweiligen Zelle stellt die Situation der Aminosäuresynthese im Wildtyp und der rechte Pfeil die verstärkte Synthese durch Überexpression der beteiligten Gene und Aufhebung der Feedback-Regulation im Produktionsstamm dar. Während durch verstärkte L-Lysin-Synthese auch die Expression des Transporters LysE auf Grund regulatorischer Effekte ansteigt (gestrichelte Pfeile) und es zu keiner Exportlimitation kommt, führt die verstärkte L-Threonin-Synthese nicht zur verstärkten Bildung von ThrE. Daher kommt es zum zellinternen Abbau von L-Threonin.

Zusammengenommen deutet all dies darauf hin, dass der L-Threonin-Export der Hauptansatzpunkt ist, um aus *C. glutamicum* einen effizienten L-Threonin-Produzenten zu erzeugen. Generell könnten Exportlimitierungen der Kernpunkt der Entwicklung zukünftiger Produktionsprozesse für neuartige Metabolite sein. Ziel dieser Arbeit war es deswegen, Transportprozesse in *C. glutamicum* detaillierter zu untersuchen, wobei das Hauptaugenmerk auf die Beseitigung bestehender Exportlimitierungen in *C. glutamicum* durch Nutzung

heterologer Transporter aus *E. coli* gelegt wurde. Dabei wurde untersucht inwiefern die L-Threonin-Produktion durch Nutzung heterologer Transporter gesteigert werden kann.

IV. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Enzyme der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), Bachem Biochemica AG (Heidelberg) und Difco Laboratories (Detroit, USA) verwendet.

2. Bakterienstämme und Plasmide

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

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Merkmale	Referenz / Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5 α MCR	<i>endA1 supE44 thi-1 λ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 ϕ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Grant et al., 1990
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Davanloo et al., 1984;
<i>Escherichia coli</i> C41(DE3)	abstammend von <i>E. c.</i> BL21(DE3); entstanden aus ungerichteter Mutagenese	Miroux und Walker, 1996
<i>Escherichia coli</i> C43(DE3)	abstammend von <i>E. c.</i> C43(DE3); entstanden aus ungerichteter Mutagenese	Miroux und Walker, 1996
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtypisolat	Abe et al., 1967
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800	<i>pyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I}	Georgi et al., 2005
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-T	<i>C. g.</i> DM1800 pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> <i>thrE</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-96	<i>C. g.</i> DM1800 <i>pyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I} <i>ilvA</i> ^{G96D}	Fürst, 2007
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-96-T	<i>C. g.</i> DM1800-96 pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> <i>thrE</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-416	<i>C. g.</i> DM1800 <i>pyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I} <i>ilvA</i> ^{S416D}	Fürst, 2007
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-416-T	<i>C. g.</i> DM1800-416 pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> <i>thrE</i>	diese Arbeit

Tab. 1(ff): In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Merkmale	Referenz / Herkunft
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-CS	DM1800 mit 160 bp Deletion im <i>gltA</i> Promotorbereich; <i>pyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I} Δ 160 <i>PgltA</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-CS-T	<i>C. g.</i> DM1800 CS pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-PC	DM1800 mit Austausch des Promotors von <i>pyc</i> durch den Promotor von <i>glyA</i> ; <i>Ppyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I}	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1800-PC-T	<i>C. g.</i> DM1800 PC pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730	<i>pyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I} <i>hom</i> ^{V59A} Δ <i>pck</i>	Georgi et al., 2005
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730-T	<i>C. g.</i> DM1730 pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red}	<i>pyc</i> ^{P458S} 2x <i>lysC</i> ^{T311I} <i>hom</i> ^{V59A} Δ <i>pck mgo</i> ^{red}	B. Bathe, Evonik
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red} -T	<i>C. g.</i> DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red} pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i>	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red} -CS	DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red} mit 160 bp Deletion im <i>gltA</i> Promotorbereich, <i>pyc</i> ^{P458S} 2x <i>lysC</i> ^{T311I} <i>hom</i> ^{V59A} Δ <i>pck mgo</i> ^{red}	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red} -CS-T	<i>C. g.</i> DM1730 2x <i>lysC mgo</i> ^{red} CS pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i>	diese Arbeit

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pEKEx2	Expressionsvektor, Kan ^R , oriV <i>E. c.</i> , oriV <i>C. g.</i> , P _{tac} , <i>laqI</i> ^{q1}	Eikmanns et al., 1991
pEKEx2 <i>rhtA</i>	pEKEx2 mit <i>rhtA</i> aus <i>E. coli</i>	Tietze, 2004
pEKEx2 <i>rhtB</i>	pEKEx2 mit <i>rhtB</i> aus <i>E. coli</i>	Tietze, 2004
pEKEx2 <i>rhtC</i>	pEKEx2 mit <i>rhtC</i> aus <i>E. coli</i>	Tietze, 2004
pEKEx2 <i>yeaS</i>	pEKEx2 mit <i>yeaS</i> aus <i>E. coli</i>	Tietze, 2004
pUC18	Amp ^R , Klonierungsvektor	Norrandner et al., 1983
pUC18 <i>ilvA</i>	Amp ^R , <i>ilvA</i> aus <i>C. g.</i> ATCC 13032	Fürst, 2007
pUC18 P _{pyc}	Amp ^R , mit P _{pyc} nach Crossover-PCR zur Klonierung in pK19 <i>mobsacB</i>	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor, Kan ^R , oriV _{<i>E.c.</i>} , oriT, <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Schäfer et al., 1994
pK19 <i>mobsacB ilvA</i> ^{G96D}	Vektor zum Austausch von <i>ilvA</i> durch <i>ilvA</i> ^{G96D}	Fürst, 2007
pK19 <i>mobsacB ilvA</i> ^{S416D}	Vektor zum Austausch von <i>ilvA</i> durch <i>ilvA</i> ^{S416D}	Fürst, 2007
pK19 <i>mobsacB</i> P _{pyc}	Vektor zum Austausch des <i>pyc</i> Promotors durch den <i>glyA</i> Promotor	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> P _{glTA} Δ160	Vektor zur Deletion von 160 bp des <i>glTA</i> Promotors	Radmacher et al., 2007
pEK <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i>	Kan ^R , <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> aus <i>C. g.</i> DM368-3	Eikmans et al., 1991
pEC-T18 <i>mob2 thrE</i>	Tet ^R , <i>thrE</i> aus <i>C. g.</i> ATCC 13032	Simic et al., 2001
pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i>	Tet ^R , pEC-T18 <i>mob2 thrE</i> mit <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> Fragment aus pEK <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i>	diese Arbeit
pET-52b(+)	Amp ^R , P _{T7} , <i>laqI</i> , StrepII-Tag N-terminal, HIS-Tag C-terminal, HRV 3C- und Thrombin-Schnittstelle	Novagen
pET-52b(+) <i>rhtC</i>	pET-52b(+) mit <i>rhtC</i> aus <i>E. c.</i>	diese Arbeit
pET-52b(+) <i>lysE</i> ^{Mt}	pET-52b(+) mit <i>lysE</i> aus <i>M. tuberculosis</i> , Codon-Usage an <i>E. c.</i> angepasst	diese Arbeit
pET-52b(+) <i>ubiA</i> ^{Mt}	pET-52b(+) mit <i>ubiA</i> aus <i>M. tuberculosis</i> , Codon-Usage an <i>E. c.</i> angepasst	diese Arbeit
pRc-Exp1I	Derivat von pET22b(+) (Novagen), oriV <i>E. c.</i> , oriV <i>R.c.</i> Replikon von <i>Rhodobacter capsulatus</i> integriert	AG Tom Drepper
pRc-Exp1I <i>rhtC</i>	pRc-Exp1, <i>rhtC</i> aus <i>E. c.</i>	diese Arbeit
pRc-Exp1I <i>lysE</i> ^{Mt}	pRc-Exp1, <i>lysE</i> aus <i>M. tuberculosis</i> , Codon-Usage an <i>E. c.</i> angepasst	diese Arbeit
pRc-Exp1I <i>ubiA</i> ^{Mt}	pRc-Exp1, <i>ubiA</i> aus <i>M. tuberculosis</i> , Codon-Usage an <i>E. c.</i> angepasst	diese Arbeit
pEKEx2 <i>rhtC hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i>	pEKEx2 <i>rhtC</i> , <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> über PCR auf pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i> , downstream von <i>rhtC</i> kloniert	diese Arbeit
pEKEx2 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB rhtC</i>	pEKEx2 <i>rhtC</i> , <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB</i> aus pEC-T18 <i>hom</i> ^{fbr} <i>thrB thrE</i> mit <i>SmaI</i> Restriktion präpariert	diese Arbeit

Die Restriktionskarten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Anhang VIII. aufgeführt.

3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die von Operon Biotechnologies, Inc. bezogen wurden und bei DNA-Sequenzierungen, Polymerasekettenreaktionen (PCR) und *RealTime* PCR eingesetzt wurden, sind im Anhang VIII aufgeführt.

4. Nährmedien

E. coli-Stämme wurden in Luria-Bertani-Medium (LB) kultiviert (Sambrook et al., 1989). Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in SOC-Komplexmedium inkubiert (Miller und Nickoloff, 1995).

Die Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen in Vollmedium erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI, Difco Laboratories, Detroit, USA). Als Minimalmedium wurde CGXII-Medium genutzt (Keilhauer et al., 1993), dem 4% Glukose (222 mM) zugesetzt wurde. Die Spurensalze wurden erst nach dem Autoklavieren dem Medium zugefügt. Nach Elektroporation wurden die Zellen in BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) regeneriert und auf BHIS (52 g/l BHI-Agar, 91 g/l Sorbitol)-Platten ausgestrichen. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 1,5 % (w/v) Agar (Difco) zugesetzt.

4.1. Medienzusätze

Zur Selektion und zur Haltung von Stämmen, die Plasmide enthalten, wurden die in Tabelle 3 angegebenen Antibiotika-Konzentrationen eingesetzt. Bei Vorliegen einer Ampicillin-Resistenz wurde das strukturverwandte Carbenicillin eingesetzt, was zu einer verringerten Bildung von Satellitenkolonien führte.

Tab.3: In dieser Arbeitverwendete Antibiotika-Konzentrationen und deren Stammlösungen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	Stammlösung
Carbenicillin	50 µg/ml	25 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	50 µg/ml	25 bzw. 15 µg/ml	50 mg/ml in 50 % Ethanol
Tetracyclin	30 µg/ml	5 µg/ml	5 mg/ml in H ₂ O

5. Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese enthielten 50 ml Voll- oder CgXII-Minimalmedium. Für Plasmidisolationen im kleineren Maßstab wurden die Zellen in 5 ml LB-Vollmedium über Nacht im Reagenzglas angezogen. Kulturen in Reagenzgläsern wurden unter Schütteln bei einer Geschwindigkeit von 170 Upm, alle anderen Kulturen bei einer Geschwindigkeit von 120 Upm in einem ISF4-W-Schüttelschrank (Kühner, Schweiz) inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug 37°C für *E. coli* und 30°C für *C. glutamicum*, wobei die relative Luftfeuchtigkeit auf 80 % eingestellt wurde.

Zur RNA-Präparation und Bestimmung der Aminosäure-Akkumulation wurden die Zellen über Nacht auf Komplexmedium kultiviert und dann in eine Minimalmedium-Hauptkultur übertragen. Dazu wurden die Zellen 10 min bei 4500 Upm und 4°C abzentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0R, Hereaus GmbH & Co. KG, Hanau), mit 50 ml kalter, steriler 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in Minimalmedium überführt, wobei eine anfängliche Zelldichte von OD = 1 eingestellt wurde. Die Messungen der optischen Dichte erfolgte in einem Pharmacia Biotech ultrospec 3300 pro-Spectrophotometer (Amersham, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm.

5.1. Stammhaltung

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden die Stämme in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-/BHI-Komplexmedium für 8-14 h bei 170 Upm und entsprechenden Temperaturen kultiviert. Anschließend wurden 500 µl Kultur zusammen mit 500 µl sterilem Glycerin (80 %) in sterilen 1,5 ml-Cryogenic-Vials (Nalge Company, USA) überführt und bei -70°C gelagert. Für jeden Stamm wurden zwei parallele Dauerkulturen angelegt.

6. Molekularbiologische Methoden

6.1. Isolierung von DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen (Hilden) oder der *NucleoBond Kit* der Firma Macherey & Nagel (Düren) verwendet. Das Prinzip dieser Kits beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen nach Birnboim und Doly (1979). Um Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* zu isolieren, wurde die modifizierte Form nach Schwarzer und Pühler (1991) verwendet. Auf Grund der besonders stabilen Zellwand von *C. glutamicum* ist zur effektiven Lyse der Bakterienzellen eine vorhergehende Behandlung der Zellen mit Lysozym (15 mg/mL) erforderlich. Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte mit dem *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen, Hilden).

6.2. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Die Extinktionsmessung einer wässrigen Nukleinsäurelösung erfolgte am ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA), dabei wurden folgende Umrechnungsfaktoren verwendet (Sambrook, 1989):

Doppelstrang-DNA: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

Einzelstrang-DNA und RNA: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$.

Der Quotient E_{260}/E_{280} , der ein Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA ist, sollte für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen.

6.3. Restriktion

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Produktinformationen für die einzelnen Enzyme (Fermentas International Inc. (Burlington, Kanada), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und New England Bioabs (Ipswich, USA). Die notwendigen Pufferbedingungen wurden durch Zusatz von 1/10 Volumenanteilen 10-fach konzentriertem Restriktionspuffer eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der erforderlichen Menge an Enzym gestartet. Es wurden Ansätze mit einem Volumen von insgesamt 25 μl (analytische Restriktion) oder 50-100 μl (präparative Restriktion) und 1-10 U Enzym hergestellt. Die Reaktionsansätze wurden mindestens 2 h bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mit 1/6 Volumenanteilen Gel-Ladepuffer (Promega, Mannheim) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

6.4. 5'-Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA

Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Dies verhindert die Rezirkularisierung des Vektors in einem Ligationsansatz, da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann (Sambrook, 1989). Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Zur Dephosphorylierung der 5'-Stränge wurde das Plasmid mit 1 U alkalischer Phosphatase (*Shrimp alkaline phosphatase*, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 30-45 min bei 37°C inkubiert.

6.5. Ligation

Ligationen wurden bei Raumtemperatur mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die verwendete Vektor-DNA wurde in einem Mengenverhältnis von 1:2 bis 1:5 (Vektor : Insert) mit Insert-DNA versetzt, nachdem die DNA-Konzentration beider Fragmente mit dem ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) bestimmt wurde.

6.6. Agarose-Gelelektrophorese

6.6.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Die Agaroselösung wurde durch kurzes Aufkochen des Ultra-Pure Agarosepulvers (Gibco-BRL, Life Technologies, Karlsruhe) in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) hergestellt, der auch als Laufpuffer verwendet wurde. Es wurden 0,8%ige, 1%ige und 2%ige (w/v) Agarose-Gele, je nach aufzutrennender Größe verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x-Ladepuffer versetzt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 17-120 Volt in einer Horizon-Gelkammer von Gibco BRL (Life Technologies, Karlsruhe) mit einem Heinzinger LNG 175-06-Spannungsgeber (Heinzinger electronic, Rosenheim). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel 10 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/l) gefärbt. Ethidiumbromid ist ein bei Anregung mit UV-Licht fluoreszierender Farbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in doppelsträngige DNA interkaliert. Zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz wurde das Gel 20 min in H₂O inkubiert und danach unter UV-Licht mit einem ImageMaster®VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) photographiert.

6.6.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Reinheit isolierter RNA wurde unter Anderem durch Elektrophorese in 6%igen Formaldehyd-Agarosegelen untersucht. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Dazu wurde eine Agaroselösung aus 0,25 g Agarose, 5 ml 5x MOPS, 15,75 ml DEPC-H₂O aufgekocht, anschließend 4,25 ml Formaldehyd zugegeben und nach Abkühlen auf etwa 60°C in eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Die RNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5x Ladepuffer (50 % Formamid, 20 % Formaldehyd, 20 % 5x MOPS, 10 % Farbstoff, 0,7 % Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)) versetzt, 10 min bei 95°C und 5 min auf Eis inkubiert.

Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS (40 mM MOPS, 10 mM Essigsäure, 2 mM EDTA in DEPC-Wasser gelöst, pH 7). Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mit einem ImageMaster®VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) fotografiert.

6.7. Transformationstechniken

6.7.1. Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden die Zellen mit Rubidium- und Caesiumchlorid behandelt. Dazu wurden die Zellen in 50 ml SOB- oder LB-Medium angezogen und nach Erreichen einer OD von ca. 0,15 geerntet. Die weitere Durchführung erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983, 1985). Zur Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock (90 s, 42°C) zur Induktion der DNA-Aufnahme in die Zelle. Danach wurden die Zellen zur Regeneration für 45 min bei 37°C in 800 µl LB-Medium inkubiert. Diese Inkubation unter leichtem Schütteln ermöglichte sowohl die Regeneration der Zellen als auch die Ausprägung der Resistenz vor dem Ausplattieren auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten, welche bei 37°C inkubiert wurden.

6.7.2. Transformation von *C. glutamicum*

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch et al., 2002). Dazu wurden 50 ml BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbitol) mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Vorkultur in 100 ml BHIS-Medium überimpft und bis zu einer OD von 1,75 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10 min, 4500 Upm, 4°C). Die Zellen wurden nachfolgend zweimal mit 50 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10 % Glycerin, pH 7.5) und zwei weitere Male mit 50 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert, Aliquots von 150 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 150 µl Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Der Ansatz wurde mit 0,8 ml 10%igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation wurde dann bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem Gene PulserTM (Biorad, München) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 4 ml BHIS-

Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 6 min bei 46 °C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert vermutlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, so dass bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schäfer et al., 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 60 min bei 30 °C unter Schütteln regeneriert, bevor die Zellsuspension auf Antibiotika-haltigen BHIS-Agarplatten ausplattiert wurde.

6.8. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde zur in vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona, 1987) sowie zur Kontrolle von Klonierungen und cDNA-Synthesen eingesetzt. Während für die Amplifizierung weiter verwendeter DNA-Fragmente die KOD Polymerase (Novagen, San Diego, USA) auf Grund der Effizienz und geringen Fehlerrate genutzt wurde, ist die Taq Polymerase in Kontroll-PCRs eingesetzt worden.

Dazu wurden jeweils zwei, den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierende Oligonukleotide eingesetzt, die bei Eurofins Operon MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen wurden. Das PCR-Programm bestand aus einem sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung bei 94 °C, Oligonukleotidanlagerung (*Annealing*) bei 55-66 °C und Verlängerung (Elongation) der Oligonukleotide mittels DNA-Polymerase bei 72 °C. Dies ermöglicht eine exponentielle Amplifizierung des durch die Oligonukleotide begrenzten DNA-Fragmentes. Zur Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler (Biozym Diagnostik, Oldendorf) verwendet. Als Matrizen-DNA wurde üblicherweise genomische DNA aus durch Hitzebehandlung aufgeschlossenen Bakterienzellen oder Plasmid-DNA verwendet. Zur Nutzung genomischer DNA als Template wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und die Suspension für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Die optimale Anlagerungstemperatur (T_a) für die PCR wurde entweder vom Hersteller der Oligonukleotide angegeben oder aus der Basenzusammensetzung berechnet (Sambrook et al., 1989), wobei nur der Bereich des Oligonukleotides berücksichtigt wurde, der bereits im ersten Zyklus an die DNA-Matrize anlagert ($T_a = (4x [G+C] + 2x [A+T]) - 5$). Die Elongationszeit wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert, wobei routinemäßig 1 min pro 1000 Basen berechnet wurde. Es wurden jeweils 30-35 Zyklen durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ein Aliquot jedes Ansatzes entnommen und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Wurden die amplifizierten DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt, wurden

sie mit Hilfe des *QIAex Kit* (Qiagen, Hilden) oder des *NucleoBond Kit* (Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt.

6.8.1. Cross-over-PCR

Zum Austausch des nativen Promotors von dem Gen *pyc*, das für die Pyruvat-Carboxylase kodiert, durch den *glyA* Promotor wurden zwei etwa 500 bp große Fragmente, die den 5'- und den 3'-flankierenden Bereiche des *pyc* Promotors enthalten, und der *glyA* Promotor mit speziellen Oligonukleotiden amplifiziert. Dabei enthielten die äußeren Oligonukleotide der flankierenden Bereiche Restriktionsschnittstellen zur späteren Klonierung und die inneren Oligonukleotide jeweils homologe Sequenzen zu dem amplifizierten *glyA* Promotor für die anschließende zweiphasige Crossover-PCR (VIII. Tabelle 15).

In der ersten Crossover-PCR wurden jeweils die beiden ~500 bp großen Fragmente der ersten PCR zusammen mit dem amplifizierten *glyA* Promotor als Matrize eingesetzt und mit den flankierenden Oligonukleotiden der beiden Fragmente aus der ersten PCR zu einem Fusionsprodukt amplifiziert. Die beiden generierten Fragmente, der 5'-flankierende Bereich mit *glyA* Promotor und der *glyA* Promotor mit dem 3'-flankierenden Bereich wurden in einer weiteren Crossover-PCR als Matrize eingesetzt und mit den äußeren Oligonukleotiden der flankierenden Bereiche amplifiziert. Das in der PCR amplifizierte Fragment wurde aufgereinigt, in den Vektor pUC18 kloniert und im Folgenden sequenziert.

6.8.2. Gerichtete Mutagenese des Gens *ilvA*

Der gerichtete Basenpaaraustausch im Gen *ilvA*, das für die Threonin-Dehydratase kodiert, wurde mittels PCR generiert. Dazu wurde ein spezifisches, komplementäres Oligonukleotidpaar benutzt, das den Basenpaaraustausch in ihrer Sequenz beinhaltete, und der Vektor pUC18 *ilvA* als DNA-Matrize eingesetzt. Da die Polymerase nicht über Ligase-Eigenschaften verfügt, lag in den neu generierten Plasmiden ein Bruch im DNA-Strang vor. Nach Beendigung PCR-Reaktion waren sowohl der Ausgangsvektor als auch der Vektor pUC18 mit dem mutierten Gen *ilvA* im Ansatz vorhanden. Durch die anschließende enzymatische Reaktion mit *DpnI* über 1 h bei 37°C wurde die DNA des Ausgangsvektors pUC18 *ilvA* abgebaut, da dieses Restriktionsenzym selektiv methylierte oder hemimethylierte DNA spaltet. Da die Basenpaare der mittels PCR generierten Plasmide keine Methylgruppen enthalten, wurden diese nicht durch *DpnI* gespaltet. Nach der einstündigen Inkubation wurden *E. coli* Zellen durch den Ansatz transformiert. Der Bruch in dem DNA-Strang der transformierten Plasmide wurde durch die *E. coli* Zellen geschlossen.

6.9. Ortsgerichtete Mutagenese - Das pK19*mobsacB*-Systems

Von *C. glutamicum* wurden Mutanten nach der von Schäfer et al. (1994) beschriebenen Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* konstruiert. Nach Klonierung und Sequenzierung der generierten Fragmente zum Promotor- oder Genaustausch (Material und Methoden 6.8.1) in den Vektor pK19*mobsacB*, wurden die Plasmide mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert und auf BHIS-Agarplatten mit 15 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Da der Vektor pK19*mobsacB* in *C. glutamicum* nicht repliziert wird, wurden Kanamycin-resistente Klone, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert wurde, selektioniert. Im Anschluss wurden Kanamycin-resistente Klone über Nacht in 5 ml BHI-Medium ohne Antibiotikum inkubiert um ein zweites Rekombinationsereignis zu induzieren. Jeweils 100 µl von 1:100 - 1:10.000-Verdünnungen der Kulturen wurden auf BHIS-Agarplatten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des Plasmids pK19*mobsacB* kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in die Monosaccharide Fructose und Glukose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan polymerisiert. Da gezeigt werden konnte, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose lethal für *C. glutamicum* ist (Jäger et al., 1992), sollten bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein. Dieses zweite Rekombinationsereignis führt entweder zur Wiederherstellung der genetischen Wildtyp-Situation oder zur Etablierung der erzielten, chromosomalen Mutation. Die nach dem zweiten Rekombinationsereignis erhaltenen Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden analysiert.

6.10. Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzierung klonierter DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger et al. (1977). Die durch QIAprep Spin Miniprep Kit oder Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isolierte hochreine DNA wurde mit den in Tabelle 3 angegebenen Oligonukleotiden bei der Firma Agowa (Berlin) sequenziert.

Zum Bearbeiten erhaltener Sequenzen, Erstellen von Vektorkarten sowie zur Analyse von offenen Leserahmen wurde das Programm Clone Manager für Windows (Version 7, Scientific & Educational Software) genutzt. Um anhand von Genomsequenzen zu erfahren, welche Stoffwechselwege in bestimmten Bakterien möglich sind, wurde die Datenbank *KEGG, Metabolic pathways* verwendet (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Eine weitere Datenbank, die zur Untersuchung von Ähnlichkeiten auf DNA- und Proteinebene, Funktionen von Proteinen und Stoffwechselwegen eingesetzt wurde, war die *ERGO database*

(<http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO/>) von *Integrated Genomics*. Darüber hinaus wurde die *FZ Juelich – IBT Microarray database* zur Analyse generierter und vorhandener Microarray Daten genutzt (<http://ibt022/cgi-bin/jmd.cgi>).

7. mRNA-Quantifizierung mittels *RealTime* RT-PCR

7.1. Isolierung bakterieller Gesamt-RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde 1 ml der Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase (OD = 10) geerntet (13.000 Upm, 4°C, 15 sek.). Das Zellpellet wurde dann entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert (Berstein et al., 2002; Khodursky et al., 2003). Frisch abzentrifugierte oder gefrorene Pellets wurden mechanisch mit dem Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen und mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) weiterverarbeitet (Lange et al., 2003).

Die RNA wird in Gegenwart von Ethanol und einer speziellen, hochkonzentrierten Salzpuffer-Lösung (RNeasy, Qiagen) an eine Silica-Gel-Membran adsorbiert, die selektiv einzelsträngige RNA-Moleküle ab einer Größe von 200 Basen bindet. Nach Herstellerangaben wurde die adsorbierte RNA mit 30 U RNase freier DNase I (*RNAse-Free DNase Set*, Qiagen, Hilden) auf der Säulchenmembran für 15 min inkubiert. Danach folgten zwei weitere Waschschrte bevor die RNA mit 50 µl RNase freiem Wasser vom Säulchen eluiert wurde.

Die RNA-Konzentration sowie die Reinheit (E260/E280 ~ 1,8-2,2) der isolierten RNA-Lösungen wurden photometrisch bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Mittels denaturierender Formamid-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) wurden die RNA-Konzentration und die Reinheit der RNA zusätzlich überprüft. Die Lagerung präparierter RNA erfolgte bei -20 °C.

7.2. Synthese der cDNA

Die Synthese der cDNA erfolgte ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, die durch reverse Transkription mit den in Tabelle 3 angegebenen Oligonukleotiden und reverser Transkriptase (*Omniscript Reverse Transkriptase*, Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde vor der Synthese für 5 min bei 68 °C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der vorbereitete Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden und reverser Transkriptase zugegeben. Die Synthese erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die synthetisierte cDNA wurde ohne weitere Aufreinigung als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt.

7.3. *RealTime* PCR

Die *Real-time* PCR wurde mit dem *LightCycler 1.0* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Als Reagenzien dienten die Bestandteile *Quantitect SYBR Green I Kit* (Qiagen, Hilden). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Invitrogen, Karlsruhe) bindet doppelsträngige DNA und hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 521 nm. Bei der Messung erfolgte eine Anregung der in speziellen Kapillaren (*LightCycler Capillaries*, Roche Diagnostics, Mannheim) vorliegenden Proben durch eine blaue Licht emittierende Diode (LED) mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem Kanal F1 bei einer Wellenlänge von 530 nm. In Tabelle 4 ist der Ablauf der *RealTime* PCR sowie der Schmelzkurve aufgelistet.

Tab. 4: Ablauf der *RealTime* PCR. Nach Vorinkubation erfolgt die Amplifikation in 50 PCR-Zyklen. Das Produkt wird im Anschluss anhand der Schmelzkurve analysiert.

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	Fluoreszenz-Detektion
Vorinkubation		95°C	15 min	1	-
Amplifikation	Denaturierung	95°C	10 s	50	-
	Annealing	Oligonukleotid-abhängig	20 s		-
	Synthese	72°C	Produkt [bp] /25s		-
	Messung	72-86°C	0 s		Einfach
Schmelzkurve	Denaturierung	95°C	0 s	1	-
	Annealing	65°C	15 s		-
	Aufschmelzen der DNA	95°C Temperatur- Erhöhung = 0,1°C/s	0 s		Kontinuierlich
Kühlung		40°C	30 s		-

7.4. Auswertung der Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung der Transkripte erfolgte anhand von externen Standards (Abbildung 2). Bei den externen Standards handelte es sich um DNA-Fragmente, die für jedes untersuchte Gen sowie die Referenzgene amplifiziert wurden. Alternativ kann auch Plasmid-DNA als Standard genutzt werden. Zusätzlich wurden Referenzgene zur Normierung in die Analyse aufgenommen, wodurch eine relative Quantifizierung durchgeführt werden konnte.

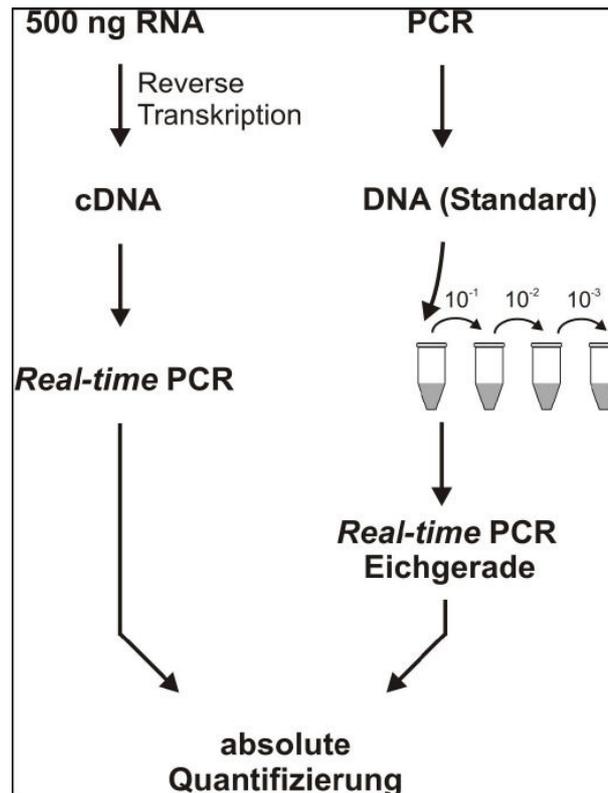


Abbildung 2: Ablauf der absoluten Quantifizierung. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA Menge des in der *Realtime* PCR untersuchten Gens mit Hilfe von externen Standards bestimmt. Mittels der durch PCR hergestellten Standard-DNA bekannter Konzentration wurde eine Eichgerade angefertigt, an der die cDNA-Konzentration der Probe abgelesen wurde.

Mittels der Standard-DNA, deren Konzentration nach photometrischer Bestimmung bekannt war, wurde eine Eichgerade angefertigt, anhand derer die Probenkonzentration abgelesen werden konnte. Die Abbildung 3 dient der Veranschaulichung dieser Vorgehensweise.

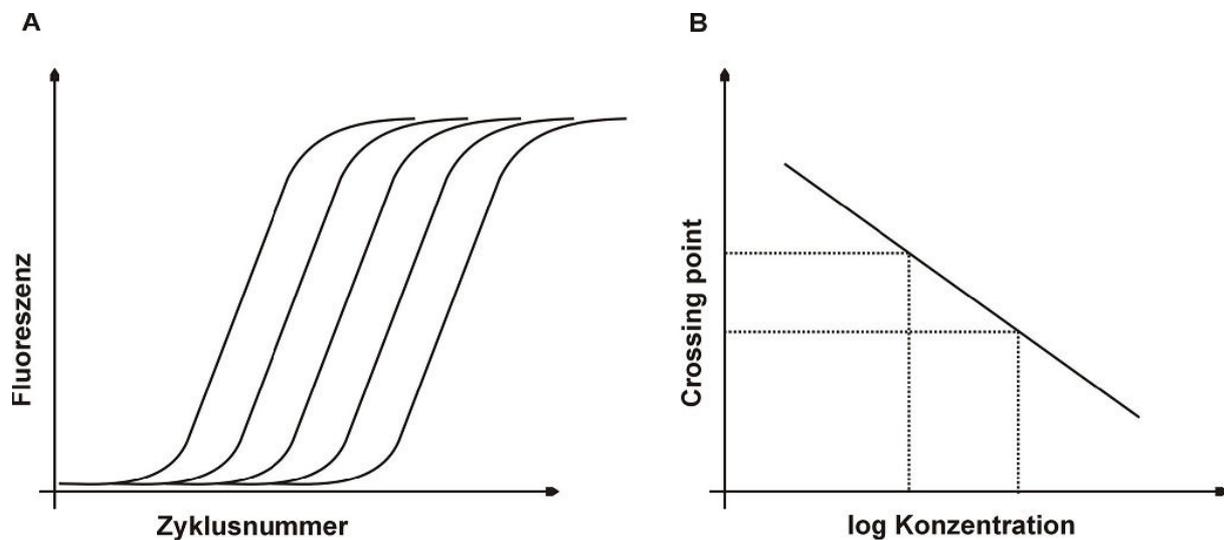


Abbildung 3: A) Erstellung der Eichgerade mit DNA-Standards, die als eine Reihe von 10er Verdünnungen als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt werden. Die Kurven zeigen die Fluoreszenzzunahme der einzelnen Proben während der *Real-time* PCR. B) Durch Auftragung der Crossing points der einzelnen Proben, welche von der LightCycler-Software ermittelt werden, gegen den Logarithmus der Standardkonzentration wird eine Eichgerade erstellt.

Eine typische PCR Amplifikationskurve, wie in Abbildung 3A dargestellt, lässt sich in drei Segmente unterteilen: 1) Die frühe Hintergrundphase: In dieser Phase wird nur die Hintergrund-Fluoreszenz gemessen, da die Konzentration des amplifizierten PCR-Produkts noch zu gering ist. 2) Die exponentielle Phase, in der das PCR-Produkt akkumuliert, die Fluoreszenz des Produkts exponentiell zunimmt und die Hintergrundfluoreszenz übersteigt bis schließlich ein Plateau erreicht wird. 3) Die Plateau Phase. In dieser Phase fällt die Effizienz der PCR und es kommt zu keiner weiteren Amplifikation, daher bleibt das Fluoreszenzsignal konstant.

Die Fluoreszenzzunahme kann mittels der LightCycler-Software durch zwei verschiedene Methoden berechnet werden. In dieser Arbeit wurden die *Crossing points* (CP), die Punkte an denen die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, unter Zuhilfenahme der *Second derivative maximum* Methode bestimmt. Bei dieser Methode wird die während der *Realtime* PCR aufgenommene Kurve der Fluoreszenzzunahme als Funktion beschrieben. Dem bestimmten CP-Wert einer Probe entspricht nun die Zyklusnummer, welche dem Maximum der zweiten Ableitung dieser Funktion als X-Wert zugeordnet werden kann. Wie Abbildung 4 zeigt, liegt der CP-Wert am Beginn der logarithmischen Phase der PCR, in der die

Fluoreszenz exponentiell ansteigt. Über die CP-Werte kann nun die Quantifizierung erfolgen, indem in der Eichgerade die dem CP-Wert entsprechende Konzentration abgelesen wird.

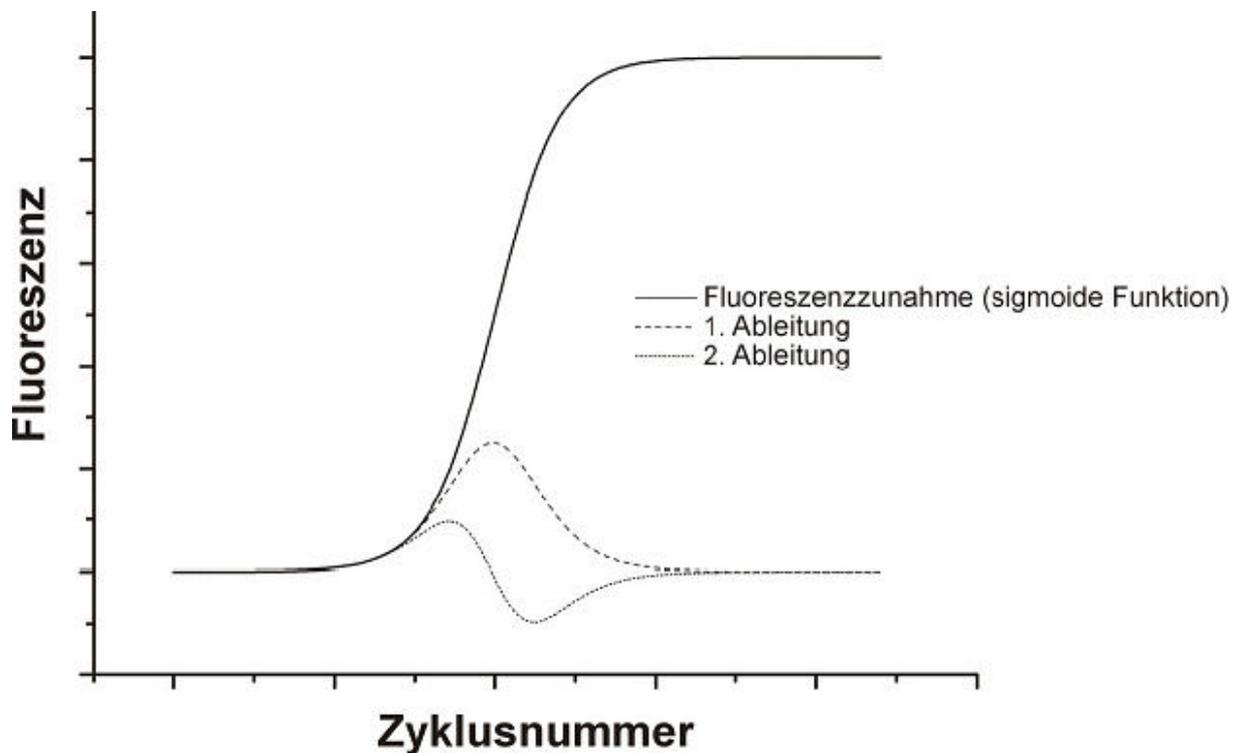


Abbildung 4: Die *Crossing-Point*-Werte wurden nach der *Second derivative maximum* Methode ermittelt. Die Kurve der während der *Realtime* PCR gemessenen Fluoreszenzzunahme entspricht einer sigmoiden Funktion. Die Zyklusnummer, welche dem X-Wert des Maximums der zweiten Ableitung dieser Funktion entspricht, wird der zugehörigen Probe als *Crossing-Point*-Wert zugeordnet.

Parallel zu den Proben wurden die zwei verwendeten Referenzgene *ddh* (*meso*-Diaminopimelatdehydrogenase) und *gyrA* (DNA-Gyrase, Untereinheit A) zur Normierung amplifiziert, um so eventuelle Ungenauigkeiten durch abweichende PCR-Effizienzen oder Template-Konzentrationen zu berücksichtigen. Als Referenzgene werden konstitutiv exprimierte Gene genutzt, die auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gleiche Expressionsstärken aufweisen. Darüber hinaus sollten sich die Transkriptionsstärken der untersuchten Gene und des Referenzgen nicht zu stark unterscheiden.

8. Globale Transkriptomanalysen

8.1. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden in gleichen Konzentrationen von der zu vergleichenden RNA synthetisiert (Wendisch et al., 2001). Die cDNA-Sonden wurden aus präparierter RNA mittels reverser Transkriptase

(Invitrogen, Groningen) und Zufalls-Hexamer-Oligonukleotiden synthetisiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max.}} 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max.}} 570 \text{ nm}$, grün, Amersham, Freiburg) oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max.}} 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max.}} 670 \text{ nm}$, rot, Amersham, Freiburg) verwendet. Jeweils 20-25 μg RNA wurden in einem 15 μl Ansatz mit 500 ng Zufalls-Hexanukleotid-Oligonukleotiden (GE Healthcare, Freiburg) für 10 min bei 65°C inkubiert. Nachdem Abkühlen der Proben auf Eis (2 min), wurde die reverse Transkription durchgeführt. Der Ansatz (30 μl) enthielt 3 μl Cy3-dUTP (1 mM) oder Cy5-dUTP (1 mM), 6 μl 1. Strang Puffer (End-Konz. 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0,6 μl Nukleotidmix (End-Konz. 500 pM dATP, dGTP, dCTP, 200 pM dTTP; Invitrogen, Groningen) und 2 μl Superscript-II Reverse Transcriptase (End-Konz. 400 U; Life Technologies Inc., Rockville, MD; Wendisch et al., 2001). Nach der Synthese (110 min, 42°C) wurde die RNA durch Zusatz von 10 μl NaOH (0,1 N) hydrolysiert (10 min, 70°C) und mit 10 μl HCl (0,1 N) neutralisiert. Um nichteingebaute Nukleotide abzutrennen wurde der Ansatz (50 μl) mit H₂O auf 500 μl aufgefüllt und mittels Ultrazentrifugationseinheiten (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach) eingengt. Die Cy3- und Cy5-markierten Sonden wurden vereinigt, wieder mit H₂O auf 500 μl aufgefüllt und erneut bis auf ein Volumen von 14,5 μl eingengt. Die so erhaltene Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNA der zu vergleichenden RNA-Proben wurde sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

8.2. DNA-Chip-Technologie

Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Chip-Technologie zur Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster und das verwendete Robotersystem zur Herstellung von DNA-Chips beruht auf dem an der Stanford University entwickelten Systems (Shalon et al., 1996) und wurde am Institut für Biotechnologie durch Prof. Dr. V. F. Wendisch und Dr. T. Polen etabliert (Lehnen et al., 2002; Polen, 2002; Wendisch et al., 2001). Dabei wurden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert (Shalon et al., 1996; Zimmer et al., 2000). Detaillierte Informationen sind zusätzlich im Internet unter MGuide, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide> einzusehen. Auf die Chips wurden 3530 PCR-Produkte (ca. 300-500 bp) von 3567 putativen *C. glutamicum*-Genen aufgebracht. *C. glutamicum* ATCC 13032 diente als Matrize für die Amplifizierung der Genfragmente mittels PCR. Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma Gene Scan AG (Freiburg) synthetisiert. Für die spätere Immobilisierung der DNA auf dem Chip wurden die DNA-Chip-Glasobjektträger zunächst mit Poly-L-Lysin beschichtet (Shalon et al., 1996; Zimmer et al., 2000). Die Auftragung der PCR-Produkte (150-300 ng/ μl) erfolgte mit

einem computergesteuerten Robotersystem auf eine Fläche von 2 cm x 2 cm auf einen Objektträger. Dabei wurden etwa 0,1-1,0 nl PCR-Produkt pro Spot aufgetragen. Die Spots hatten einen Durchmesser von etwa 60-120 µm. Neben den PCR-Produkten der amplifizierten *C. glutamicum*-Gene wurden zusätzlich Hybridisierungskontrollen (Lambda-DNA, PCR-Produkt eines *E. coli*-Gens und genomische DNA von *E. coli*) auf den Chip aufgebracht. Für die Datennormalisierung wurde genomische *C. glutamicum* DNA an verschiedenen Stellen auf dem Chip angeordnet.

8.3. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Bevor die hergestellten DNA-Chips in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden, erfolgte eine chemische Nachbehandlung (Wendisch et al., 2001). Diese diente einerseits der Blockierung von Nukleinsäure-bindenden ε-Aminogruppen freier Seitenketten von Poly-L-Lysin, an Stellen, an denen keine DNA aufgetragen wurde, und andererseits zur Immobilisierung der DNA. Zur Erzeugung hybridisierungsfähiger, einzelsträngiger DNA aus der doppelsträngigen DNA erfolgte eine thermische Nachbehandlung. Für eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Spot-Fläche, wurden die DNA-Chips im ersten Schritt der Nachbehandlung durch Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (Sigma, Deisenhofen) über der Oberfläche einer 1 x SSC-Lösung inkubiert (100 ml, 15 min). Während der Inkubation (15 min) verteilen sich infolge der Brown'schen Molekularbewegung die DNA-Moleküle, deren negativ geladene Phosphatreste noch nicht ausreichend durch die positiv geladenen Aminogruppen der Poly-L-Lysin-Seitenketten fixiert wurden. Zur Fixierung der DNA Moleküle auf der Oberfläche erfolgte nach dem Rehydratisieren eine Blitztrocknung für 5 s bei 100°C (Shalon et al., 1996). Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (650 µJ, UV-Stratalinker, Stratagene) erneut auf den Objektträger immobilisiert. Zum Blockieren der freien Poly-L-Lysin beschichteten Oberfläche, die nicht mit DNA bedeckt war, erfolgte eine 25-minütige Inkubation in Methyl-2-Pyrrolidinon-Lösung (0,2 M Bernsteinsäure-Anhydrid, 50 mM Na-Borat). Dabei reagieren die ε-Aminogruppen der freien Seitenketten des Poly-L-Lysins mit Bernsteinsäure-Anhydrid (Shalon et al., 1996). Unmittelbar danach wurden die DNA-Chips für 2 min bei 95°C im Wasserbad zum Denaturieren der DNA-Doppelstränge inkubiert. Um eine anschließende Renaturierung der DNA-Doppelstränge zu verhindern, wurden die Chips in eiskaltem Ethanol inkubiert (2 min, 95 % Ethanol, 4°C) und auf diese Weise die DNA-Einzelstränge fixiert. Danach erfolgte zur Trocknung eine Zentrifugation (5 min, 50 g). Die trockene Lagerung der nachbehandelten DNA-Chips bis zu ihrer Verwendung erfolgte im Exikator (Shalon et al., 1996).

8.4. DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Die vereinigten und aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden wurden dazu in 20 µl Hybridisierungspuffer (20 µg Poly-A; 3 x SSC; 25 mM HEPES pH 7,0, 0,23 % (v/v) SDS) für 2 min bei 100°C denaturiert und anschließend für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Zimmer et al., 2000). Poly-A (Sigma, Deisenhofen) diente als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz und die Endkonzentration von 3 x SSC sicherte stringente Hybridisierungsbedingungen (Zimmer et al., 2000). Vor der Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA (2 cm x 2cm) ein Spezialdeckgläschen gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung über der DNA-Chip-Fläche sicherzustellen (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA). Zur Gewährleistung einer ausreichend hohen Feuchtigkeit in der Kammer wurden mehrfach kleine Tropfen 3 x SSC-Lösung am Rand des DNA-Chips aufgetragen, dann die vorbereitete Probenlösung unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer wasserdichten Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., York Haven, USA) 5-16 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (Zimmer et al., 2000). Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte DNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen der DNA-Chips für je 5 min in 1 x SSC/0,03 % (w/v) SDS und danach in 0,05 x SSC bei Raumtemperatur (Zimmer et al., 2000). Durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip Oberfläche bestimmt.

8.5. Fluoreszenz-Messung von DNA-Chips

Um die mRNA-Spiegel zu bestimmen, wurde die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Da das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots 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 et al., 1996). Zum Messen der ortsaufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenePix 4000 A *laser scanner* (Axon Inc., USA) verwendet. Die DNA-Chip-Oberfläche (10 x 10 µm Raster) wurde zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppe von Cy3- und Cy5-dUTP mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen bestrahlt, je eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und Cy5-dUTP (635 nm), und die daraufhin emittierte Fluoreszenz wurde mit lichtempfindlichen Kathoden bei 570 nm (Cy3-Fluoreszenz) und bei 670 nm (Cy5-Fluoreszenz) registriert. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz in elektrischen

Strom um, der weiter verstärkt wird. Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Software 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 (GenePix Pro 3.0 Software). Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die GenePix Array List (erstellt von G. Sindelar und C. Lange, AG Dr. Wendisch) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen bzw. zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen (genomische *C. glutamicum*-DNA, λ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *E. coli*).

8.6. Auswertung von DNA-Chips

Die Berechnung des Verhältnisses von Signal zu Hintergrund für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten Signalintensitätspot-Probe / Signalintensitätspot-Hintergrund. Wenn das Signal/Hintergrund-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky et al., 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 et al., 1998). Die Normalisierung erfolgte für jeden DNA-Chip über die genomische DNA von *C. glutamicum*. Anhand des Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisses, das bei Hybridisierung der Sonden mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* gemessen wurde und gleich 1 sein sollte (Eisen et al., 1998), wurden die einzelnen Spots normiert. Es wurde ein Korrekturfaktor ermittelt, der bei Multiplikation mit dem experimentellen Ergebnis ein Verhältnis von 1 für die chromosomale DNA ergab und die Verhältnisse aller genspezifischen Spots wurden anschließend mit diesem Faktor multipliziert (Khodursky et al., 2000). Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren 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). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky et al., 2000). Veränderte relative mRNA Spiegel von Genen mit p-Werten $>0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant verändert gegenüber der genomischen DNA betrachtet. Ein p-Wert von 0,05 bedeutet, dass

die ermittelten relativen RNA-Level sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von den zu vergleichenden mRNA-Leveln unterscheiden.

8.7. Oligonukleotid-basierende DNA-Chips

Oligonukleotid-basierende Microarray Analysen wurde in Bielefeld in der Gruppe von Dr. J. Kalinowski mit freundlicher Unterstützung von Dr. Andrea Hüser nach dem Protokoll von Hüser et al. durchgeführt (2003).

9. Chromatographische Methoden

9.1. Bestimmung organischer Säuren mittels HPLC

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 6 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.

9.2. Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt 1-ml-Proben entnommen und die Zellen sedimentiert (10 min, 13000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (10 min, 13000 Upm, 4°C) und anschließend untersucht. Die Aminosäure-Analyse des Überstandes erfolgte unter Verwendung eines Agilent Technologies 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einer LiChrospher 100 RP 18EC 125 x 4 mm Trennsäule (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) mit 5 µm Partikelgröße und einer 40 x 4 mm Vorsäule. Die Aminosäure-Bestimmung erfolgte mittels *reversed phase*-HPLC nach Derivatisierung der Probe mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) (Lindroth und Mopper, 1979). Dies erfolgte durch eine automatisierte Derivatisierung, bei der 1 µl der zu analysierenden Probe mit 20 µl OPA/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt und eine Minute bei RT im Probenraum inkubiert wurde. Die Derivatisierung beruht auf der Reaktion der primären Aminogruppe mit OPA und 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium, wobei ein fluoreszierendes 1-

Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht (Jones und Gilligan, 1983). Die Substanzen wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität mit einer Flussrate von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ bei 40 °C mit einem Gradienten (Abbildung 5) aus $0,1 \text{ M}$ Natriumacetat ($\text{pH } 7,2$) als polarer Phase und Methanol als unpolare Phase eluiert.

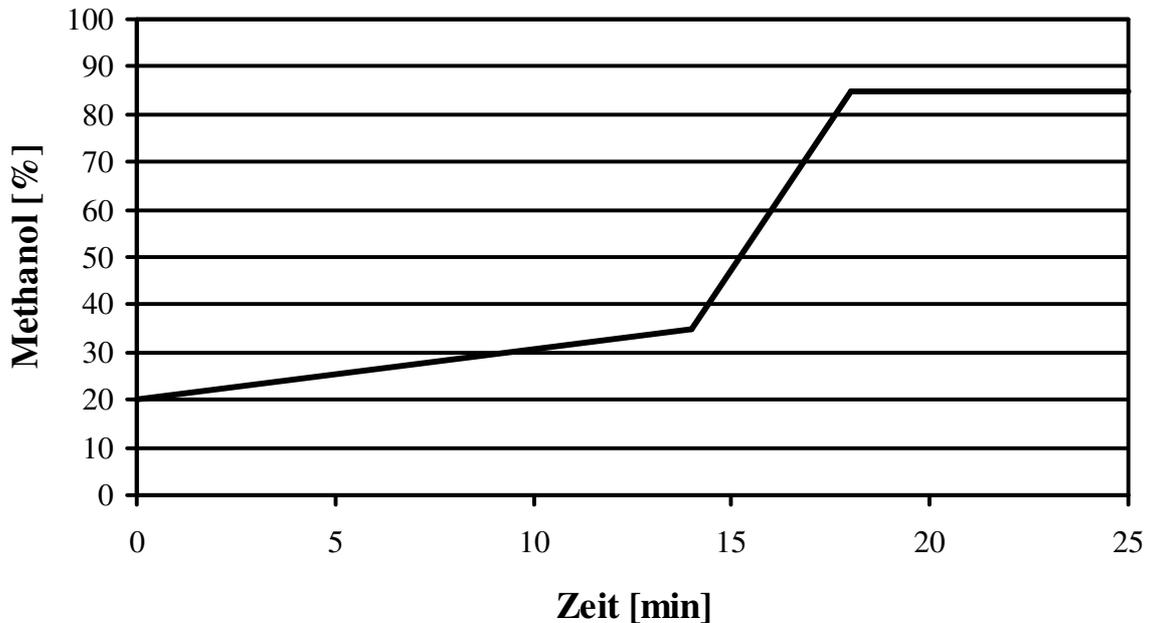


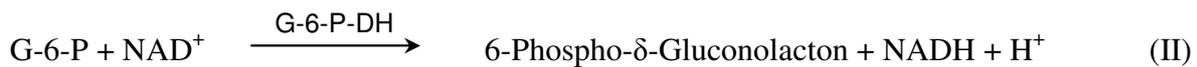
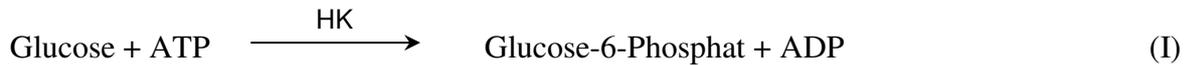
Abbildung 5: Anteil des prozentualen Methanolgehaltes im Laufmittel zur Auftrennung von Aminosäuren.

Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Excitation bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Identifizierung von Aminosäuren erfolgte anhand ihrer Retentionszeit. Die Aminosäure-Konzentration in der analysierten Probe wurde über Vergleich der erhaltenen Peakfläche mit denen aus parallel untersuchten Standards der entsprechenden Aminosäuren bestimmt. Zusätzlich wurde Asparagin als interner Standard genutzt um die erhaltenen Aminosäure-Konzentrationen zu normieren.

10. Enzymatische Analysen

10.1. Enzymatisch-photometrische Glukose – Bestimmung

D-Glucose wurde nach einer Methode von Bergmeyer et al. (1974) enzymatisch mit Hexokinase (HK) und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) bestimmt. Dieser Test beruht auf den in Gleichungen (I) und (II) dargestellten Reaktionen.



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent und wurde aufgrund der Absorption bei 340 nm (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340} = 6,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt. Für den Test wurden Mikrotiterplatten für 96 Proben (Wellplates, VWR International, Wien, Österreich) verwendet. Es wurden jeweils 40 μl Probe bzw. Glukose-Standards unterschiedlicher Konzentrationen (0,1- 2,5 mM) in die Probenvertiefungen pipettiert (jeweils Doppelbestimmungen) und 260 μl der Reaktionslösung (siehe unten) zugesetzt. Danach erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Heidolph Polymax 1040). Anschließend wurde die Extinktion bei 340 nm mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (ThermoMax microplate reader, MWG) bestimmt. Die Umrechnung der gemessenen Extinktionen in die Glukosekonzentration erfolgte anhand einer durch Proben mit definierten Glukose-Konzentrationen erstellten Kalibriergeraden.

50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6,8:

Tris		12,1 g
Maleinsäure		11,6 g
NaOH (konz.)		pH 6,8 einstellen
bidest. H ₂ O	ad	1000 ml

100 mM Magnesiumchlorid-Lösung:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O		1,017 g
Tris-Maleat-Puffer	ad	50 ml

NAD/ATP-Mix (24 Ansätze):

ATP		367,5 mg
NAD		477,0 mg
MgCl ₂ -Lsg.		25,0 ml
Tris-Maleat-Puffer	ad	600 ml

Enzym-Lösung.

Hexokinase (3000 U/ml)	55 μ l
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1000 U/ml)	55 μ l
bidest. H ₂ O	4290 μ l

Reaktionslösung:

Probe	40 μ l
Enzym-Lsg. mit NAD/ATP-Mix	260 μ l

10.2. Bestimmung der Threonindehydratase-Aktivität

Die Aktivität der Threonin-Dehydratase (TDH) wurde photometrisch bestimmt (McGee und Doudoroff, 1954). Das in der Reaktion entstandene α -Ketobutyrat reagiert bei Zugabe von Semicarbazid zu Semicarbazon, das photometrisch bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen wurde. Der Reaktionsansatz (80 μ l TDH1 [1 M Kaliumphosphat pH 8,2], 80 μ l TDH2 [10 mM Pyridoxalphosphat], 40 μ l TDH3 [0,8 mM L-Threonin], x μ l Rohextrakt und 600-x μ l H₂O) wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Nach 0 min, 15 min und 30 min wurde 200 μ l Ansatz in vorgelegte 20 μ l 36 % TCA zur Beendigung der Reaktion gegeben. Im Anschluss wurden die Proben mit 1 ml Semicarbazid-Lösung versetzt. Nach 15 min Derivatisierung bei 30°C entstand durch Reaktion des Semicarbazids mit dem α -Ketobutyrat das photometrisch nachweisbare Semicarbazon (McGee & Doudoroff, 1954). Zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundreaktion wurden die Proben nach Zugabe von 3 ml H₂O für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Zur Berechnung der in den Proben gemessenen Konzentrationen wurde eine Eichreihe mit 0 μ mol bis 1,5 μ mol α -Ketobutyrat erstellt.

11. Protein-biochemische Analysen**11.1. Expressionskulturen**

100 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin bzw. 100 μ g/ml Ampicillin wurde mit 1 ml einer ÜN-Kultur des *E. coli*-Stammes (BL21(DE3) bzw. C43(DE3)) mit dem gewünschten Expressionsplasmid angeimpft. Die Kulturen wurden zunächst bei 37°C und 140 Upm inkubiert, bis sie eine OD von ca. 1,0 erreicht hatten. Die Expression des Zielgens wurde durch Zusatz von 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Danach wurden die Zellen bei 20 °C und 130 Upm 3 bis 4 Stunden weiter inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 6000 Upm, Hereaus Megafuge 1.0R, Hereaus GmbH & Co. KG, Hanau). Die sedimentierten Zellen wurden einmal in 50 ml Aufschlusspuffer (TN15 für pET-Derivate) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor

Induktion sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden danach wurde die OD bestimmt sowie 150- μ l-Proben entnommen und abzentrifugiert um den Verlauf der Proteinbildung zu dokumentieren. Die sedimentierten Zellen wurden in (OD x 30) μ l 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20°C gelagert.

11.2. Zellaufschluss

Zellen wurden in 1 ml Aufschlusspuffer TNI5 resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gelagert. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall mit einem Ultraschallprozessor (UP 200 S, Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Amplitude 60 %, Cycle 0,6) in sechs Intervallen, bestehend aus 45 s Ultraschall und 15 s Pause. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 Upm, 4°C , 15 min). Die in dem Überstand befindlichen Proteine wurden mittels Ultrazentrifugation (60 min, 4°C , 50.000 Upm, Beckman TI 70.1 Rotor; Beckman Coulter GmbH, Krefeld) in cytosolische und membrangebundene Proteine separiert. Die cytosolischen Proteine im Überstand wurden abgenommen und bei -20°C gelagert. Die im Sediment enthaltenen Membranproteine wurden in 200 μ l TNI5, 1 % Triton X-100 aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

11.3. Proteinkonzentrations-Bestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA(Bicinchonin-Säure)-Test (Smith et al., 1985) bestimmt. Hierbei wurden 50 μ l Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) versetzt, 30 min bei 56°C inkubiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 500 pro Visible Spectrophotometer, GE Healthcare). Als Standard für die Eichkurve wurde Rinder-Serumalbumin verwendet.

11.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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, wobei zur Probenvorbereitung ein sechsfach konzentrierter Ladepuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 6 % DTT (Dithiothreitol), 30 % (v/v) Glycerin, pH 6,8) verwendet wurde, in dem die Proben für 30 min bei 42°C denaturiert wurden. MOPS-haltiger (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) SDS-Laufpuffer (50 mM MOPS; 50 mM Tris; 3,5 mM SDS; 1 mM EDTA) wurde zur Auftrennung bei einer maximalen Spannung von 200 V eingesetzt. Zur Abschätzung des jeweiligen

Molekulargewichts wurde der vorgefärbte Standard Precision Plus ProteinTM Standard Dual Color (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet. Die Proteine wurden mit Hilfe eines kolloidalen Coomassie-Farbstoffes (GelCode[®] Blue Stain Reagent, Pierce Chemical Company, Rockford, USA) für eine Stunde angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch einstündiges Waschen mit H₂O entfernt. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele in Cellophan (Laboratory Plast Utensils, Hellerup, Dänemark) eingelegt und getrocknet. Absorptionsspektren von Proteinen wurden in einem Wellenlängen-bereich von 200 nm – 800 nm mit einem Jasco V-560 UV/VIS Spektrophotometer (Jasco GmbH, Groß-Umstadt) aufgenommen.

11.5. Western-Blot-Analyse

Zur Detektion von Proteinen mittels spezifischen Antikörpern wurden diese aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen durch Elektroblothing für 30 min - 1 h bei 100 V in Trans-BlotTM Kammern (Biorad) 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 MgCl₂) 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 die Proteinbanden ausreichend sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 %iger TCA-Lösung gestoppt.

12. Exportratenbestimmung im Peptid-System

Zur Bestimmung von Exportraten und -spezifitäten untersuchter Transporter wurden *C. glutamicum* Zellen in Anwesenheit von Peptiden inkubiert und die Akkumulation von Aminosäuren gemessen (Vrljic et al., 1996). Die Vorkultivierung der Zellen erfolgte in 50 ml

BHI bei 30°C über einen Zeitraum von 12-16 h. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C, 4.500 rpm abzentrifugiert und mit kalter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in CgXII-Minimalmedium resuspendiert und zur Adaption an das Peptid in 50 ml CgXII, 4 % Glukose, und Peptid (1,5 mM Ala-Thr-Dipeptid [L-Alanin L-Threonin] oder 1 mM Thr-Tripeptid [L-Threonin L-Threonin L-Threonin]; Bachem, Bubendorf, Schweiz) mit eine OD = 2,5 überführt und für 2 h bei 30°C kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit kalter 0,9 % NaC-Lösung gewaschen und in 10 ml CgXII, 4% Glukose, plus Peptid (1,5 mM Thr-Dipeptid bzw. 1 mM Thr-Tripeptid) in 10 ml Glasgefäßen mit kleinem Magneten auf einer Magnetrührerplatte (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim) in einem auf 30°C temperierten Wasserbad über einen Zeitraum von 2 h inkubiert. In Zeitabständen von 15 min wurden zweimal 100 µl Probe in vorbereitete, gekühlte Beckman-Vials (Beckman Coulter GmbH, Krefeld), die 20 µl 20 % HClO₄, 65 µl Silikonöl (Dichte=1,04 g/cm³) enthielten, gegeben und 30 s abzentrifugiert (Beckman Microfuge E). Die Zentrifugation führte zu einer dreiphasigen Auftrennung. Die obere Phase enthielt das Kultivierungsmedium mit den exkretierten Aminosäuren, die mittlere Phase bestand aus dem trennenden Silikonöl und in der unteren Phase waren die Zellen in der Perchlorsäure lokalisiert. Die obere Phase wurde abgenommen, bei -20°C gelagert und mittels HPLC analysiert. Die untere Phase wurde von der mittleren getrennt und 45 µl H₂O und 10 µl Silikonöl (Dichte = 1,07 g/cm³) zugegeben. Die Lösung wurde gemischt und für 5 min im Ultraschallbad behandelt (Bransonic, Danbury, USA). Nach Zugabe von 25 µl 5 M KOH, 1 M Triethanolamin wurde die Probe 30 min auf Eis gelagert und im Anschluss zentrifugiert (30 min, 4°C, 13.000 Upm). Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert und mittels HPLC analysiert.

V. Ergebnisse

1. Suche nach Aminosäure-Transportern mittels globaler Transkriptomanalyse

Niedermolekulare Stoffe, wie Zucker, Peptide oder Aminosäuren müssen über Membranproteine in oder aus der Zelle transportiert werden. Es war von Interesse solche Systeme zu identifizieren. Dazu wurde zunächst das Wachstum von *Corynebacterium glutamicum* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Die Zugabe verschiedener Aminosäuren in das Medium und die Untersuchung ihrer Verstoffwechslung sollte der Entdeckung bislang unbekannter Aminosäure-Importer dienen, und Sauerstoff-Limitierung, bzw. Zugabe organischer Säuren der Identifizierung von Metabolit-Transportern des Citratzyklus. Für Produktionsprozesse ist auch die Identifizierung von Importern interessant, da die Deletion dieser Transporter die Wiederaufnahme des Produkts verhindert und somit zu insgesamt besserer Produktbildung beitragen kann (Ikeda et al., 1994). Es sollte deswegen untersucht werden, ob durch Transkriptionsanalysen Zugang zu Transportern erlangt werden kann.

1.1. Wachstum und Genexpressionen bei Zugabe ausgewählter Aminosäuren

C. glutamicum wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Aminosäuren in Minimalmedium CgXII kultiviert. Dies diente der Untersuchung ob das Wachstum der Zellen beeinflusst ist oder sogar die jeweilige Aminosäure verstoffwechselt wird, da beides Kriterien für anschließende Transkriptomanalysen waren. Abweichende Wachstumsraten hätten primär transkriptionelle Veränderungen am Wachstum beteiligter Gene zur Folge was die Identifizierung spezifischer Genexpressionen erschweren könnte. Idealerweise sollte die Verstoffwechslung der Aminosäuren erfolgen, um die Wahrscheinlichkeit der Expression des Aufnahmesystems zu erhöhen, und somit eine Identifizierung mittels Microarray-Analyse zu ermöglichen. Daher wurde *C. glutamicum* in Medium kultiviert, dem jeweils 50 mM L-Alanin, L-Aspartat, Glycin, L-Serin oder L-Threonin zugegeben wurde, wobei L-Aspartat auch in der Konzentration von 10 und 25 mM mit einbezogen wurden (Abbildung 6).

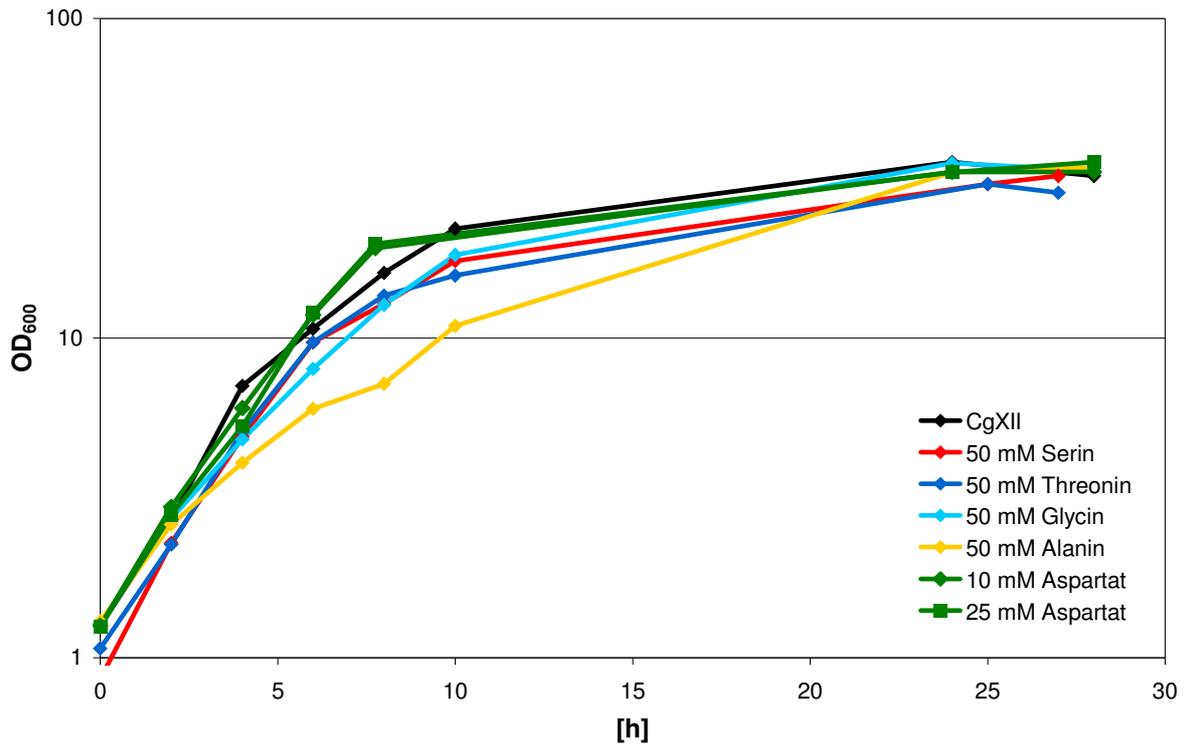


Abbildung 6: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose bei Zugabe verschiedener Aminosäuren in den angegebenen Konzentrationen (s. Legende).

Abgesehen von der Zugabe von 50 mM L-Alanin wuchs *C. glutamicum* unter Zugabe der Aminosäuren mit einer maximalen Wachstumsrate von $\mu=0,27 \text{ h}^{-1}$. Während die Zugabe von 50 mM L-Alanin in einer Reduktion der Wachstumsrate auf $\mu=0,21 \text{ h}^{-1}$ führte, inhibierte die Zugabe von 50 mM L-Aspartat das Wachstum auf Grund von pH-Veränderungen vollkommen (Daten nicht gezeigt).

Die Verstoffwechslung der zugegebenen Aminosäuren während der Kultivierung ist in Abbildung 7 gezeigt. Abgesehen von Glycin werden alle zugegebenen Aminosäuren mit Glukose co-verstoffwechselt. Während L-Aspartat und L-Serin stark verstoffwechselt wurden, konnte für L-Alanin und L-Threonin nur ein leichter Verbrauch nachgewiesen werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Aminosäuren nah dem Zentralstoffwechsel effizienter verstoffwechselt werden als weiter entfernte (Krämer 2004).

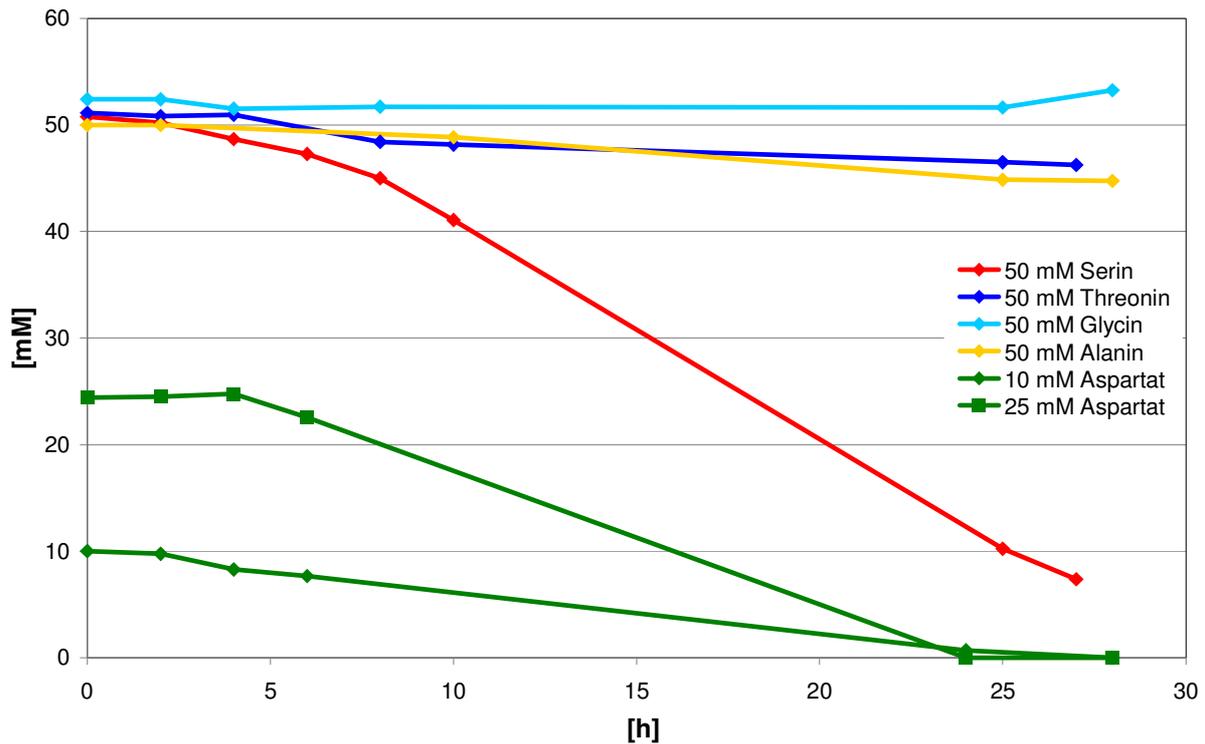


Abbildung 7: Aminosäure-Verstoffwechslung durch *C. glutamicum* ATCC 13032 in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose bei Zugabe verschiedener Aminosäuren in den angegebenen Konzentrationen (s. Legende).

Zur Identifizierung der jeweiligen Aminosäure-Importer mittels Microarray Analyse wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, die in Anwesenheit von 10 mM L-Aspartat, 50 mM L-Serin bzw. 50 mM L-Threonin inkubiert wurden. Von diesen Zellen sowie den Referenz-Zellen, die ohne Zugabe von Aminosäuren inkubiert wurden, ist die RNA präpariert und die Transkriptome mittels DNA-Chips verglichen worden. Die DNA-Chip-Analysen basierten auf zwei von einander unabhängigen Wachstumsexperimenten und jeweils acht technischen Replikaten für jedes Gen, die auf jeden Microarray gespottet waren.

Tabelle 5: Globale Transkriptomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 Zellen, die mit bzw. ohne Zugabe von 50 mM L-Serin kultiviert wurden. Aufgelistet sind Gene deren unterschiedliches mRNA-Verhältnis (CgXII + L-Serin / CgXII) signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) verändert ist.

NCgl	Gen	Genprodukt	Ratio
NCgl0986	<i>ssuI</i>	<i>NAD(P)H-dependent FMN reductase</i>	4,65
NCgl1214	<i>lysE</i>	<i>Putative secondary lysine efflux exporter, L-lysine exporter (LysE) family</i>	3,01
NCgl0245	<i>leuA</i>	<i>2-Isopropylmalate synthase</i>	2,45
NCgl2899		<i>Conserved hypothetical protein</i>	2,23
NCgl0120	<i>cysR</i>	<i>Transcriptional activator of assimilatory sulfate reduction, ROK-family</i>	2,02
NCgl2719	<i>fpr2</i>	<i>Ferredoxin--NADP(+) reductase</i>	2
NCgl2160		<i>Putative membrane protein</i>	1,56
NCgl1235	<i>serA</i>	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>	0,53
NCgl2787		<i>Putative flavin-containing monooxygenase</i>	0,48
NCgl2698		<i>Aldehyde dehydrogenase (NAD(+))</i>	0,39
NCgl2877		<i>Putative transcriptional regulator, PadR-family</i>	0,36
NCgl2709	<i>adhA</i>	<i>Alcohol dehydrogenase</i>	0,33

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass bei Zugabe von L-Serin zwei Gene, die für Membranproteine kodieren, eine erhöhte Transkription aufwiesen, *lysE* und *NCgl 2160* (Tabelle 5). Trotz der erhöhten Transkription des Gens *lysE* ist es ausgeschlossen, dass der L-Lysin-Exporter an der L-Serin-Aufnahme beteiligt war. Des Weiteren war nicht davon auszugehen, dass das Gen *NCgl 2160* für einen L-Serin-Importer kodiert, da zum einen die Transkription nur sehr gering erhöht war und für das Protein nach dem Vorhersageprogramm TMHMM nur zwei Transmembranhelices vorausgesagt wurden, was gegen einen Aminosäure-Transporter sprach.

Interessanterweise zeigte das erste der drei Serin-Biosynthesegene *serA* eine geringere Transkription, obwohl keine transkriptionelle Regulation der Gene des L-Serin-Synthesewegs bekannt ist. Bisher konnte bezüglich *serA* nur gezeigt werden, dass dessen Genprodukt einer Feedback Hemmung durch L-Serin unterliegt (Peters-Wendisch et al., 2002).

Bei Zugabe von L-Threonin in das Medium zur Identifizierung eines L-Threonin-Importers zeigten Gene von zwei Membranproteinen eine erhöhte Transkription, ein Gencluster eines unbekanntes ABC-Transporters (*NCgl 1033 – NCgl 1035*) und *NCgl 0014* (Tabelle 6)

Tabelle 6: Globale Transkriptomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 Zellen, die mit bzw. ohne Zugabe von 50 mM L-Threonin kultiviert wurden. Aufgelistet sind Gene deren unterschiedliches mRNA-Verhältnis (CgXII + L-Threonin / CgXII) signifikant (p-Wert $\leq 0,05$) verändert ist.

NCgl	Gen	Genprodukt	Ratio
NCgl0245	<i>leuA</i>	<i>2-Isopropylmalate synthase</i>	2,35
NCgl1253	<i>thiC</i>	<i>Thiamine biosynthesis protein ThiC</i>	2,15
NCgl1033		<i>Putative membrane protein</i>	2,1
NCgl0625	<i>metY</i>	<i>O-Acetylhomoserine sulfhydrylase</i>	2,03
NCgl1034		<i>ABC-type putative cobalt transporter, ATPase subunit</i>	1,99
NCgl0014		<i>Putative membrane protein</i>	1,81
NCgl1035		<i>ABC-type putative cobalt transporter, permease subunit</i>	1,73

Sowohl der Gencluster *NCgl 1033 – NCgl 1035* als auch das einzelne Membranprotein *NCgl 0014* wurden automatisch annotiert, wobei es keine Hinweise auf deren spezifische Funktion gab. Der Genlokus des Membranproteins *NCgl 0014* ist über mehrere Spezies wie z.B. *Brevibacterium linens* oder *Streptococcus mutans* konserviert und das Vorhersageprogramm TMHMM sagte zehn Transmembranhelices für das Protein voraus, was die Vermutung bestärkte, dass dieses Gen für einen möglichen Aminosäure-Transporter kodiert.

Da unter den ersten Versuchsbedingungen kein wahrscheinlicher Kandidat für den L-Serin-Import gefunden werden konnte und auch für L-Threonin nur zwei Membranproteine eine schwach erhöhte Transkription zeigten, wurde ein entsprechender Ansatz für L-Aspartat verworfen. Stattdessen wurde der Versuchsaufbau variiert indem das Transkriptom der Zellen nach einem Aminosäure-Puls untersucht wurde.

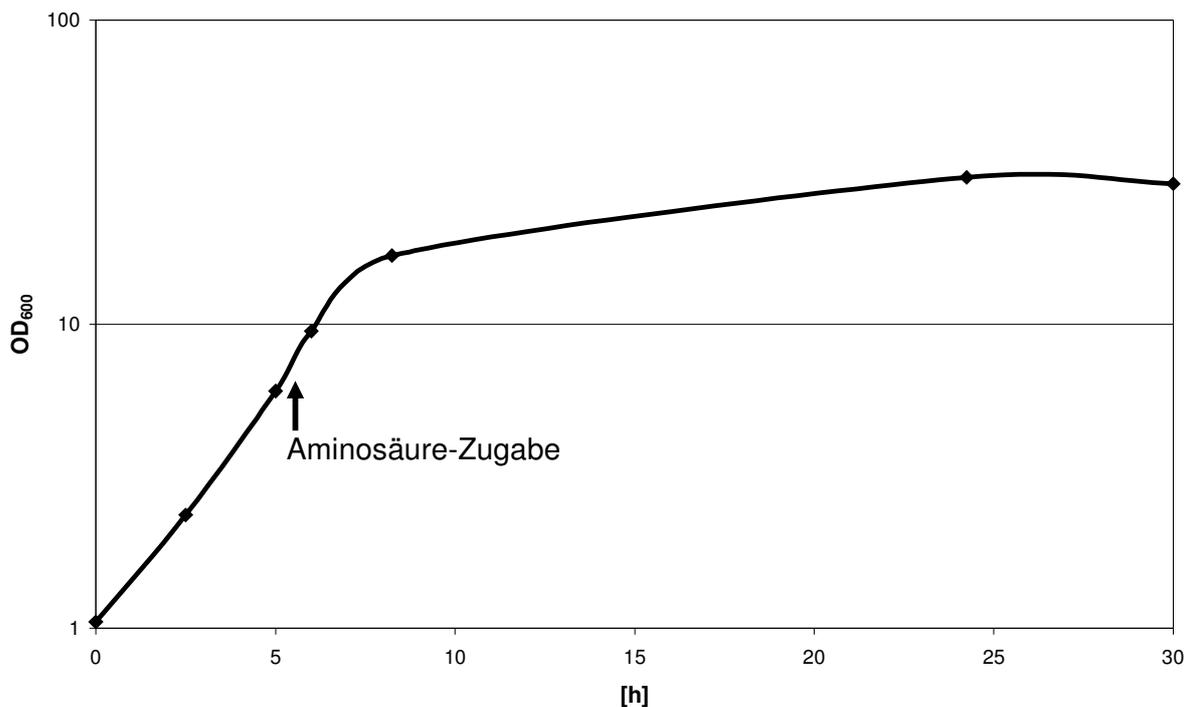


Abbildung 8: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose. Der Zeitpunkt der Zugabe verschiedener Aminosäuren ist markiert. Nach 6 Stunden wurde dem Medium jeweils 10 mM L-Aspartat, 50 mM L-Serin oder 50 mM L-Threonin zugegeben und anschließend die Zellen nach weiterer Inkubation für 5 Minuten und 30 Minuten zur RNA-Präparation entnommen.

Um dies zu erreichen wurde eine CGXII Vorkultur zum Beimpfen von zwei parallel angesetzten neuen CGXII Kulturen benutzt. Der einen Kultur wurde nach 6 h sterilfiltrierte Aminosäure zugegeben. Beide Kulturen wurden weiter inkubiert, und sowohl nach 5 Minuten als auch nach 30 Minuten den Kulturen 1 ml Zellen zur RNA Präparation entnommen (Abb. 8).

In Tabelle 7 sind Gene aufgeführt deren Transkription sich spezifisch durch die Zugabe von 10 mM L-Aspartat verändern haben. Kein Membranprotein zeigte in diesem Experiment eine verstärkte Transkription. Auffallend ist die deutlich verstärkte Expression der geclusterten Biosynthesegene von Arginin, was auf bisher unbekannte regulatorische Effekte schließen

lässt. Neben Genen der Nitrat-Reduktion und der Succinat-Dehydrogenase zeigten Gene des Glutamatimporters (*gluABC*), der unbekannte ABC-Transporters NCgl 0509 sowie der unbekannte ABC-Transporters NCgl 1915-NCgl 1918 einen verringerten mRNA Spiegel.

Tabelle 7: Globale Transkriptomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 Zellen, die mit bzw. ohne Zugabe von 10 mM L-Aspartat nach 6 Stunden kultiviert wurden. Aufgelistet sind Gene deren unterschiedliche mRNA-Verhältnis (CgXII + L-Aspartat / CgXII) signifikant ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) verändert ist und in mindestens zwei unterschiedlichen Experimenten identifiziert wurden.

NCgl	Gen	Annotation	5 min	30 min	6,75 h
NCgl1340	<i>argC</i>	<i>N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase</i>	3,29	2,41	
NCgl1341	<i>argJ</i>	<i>Glutamate N-acetyltransferase</i>	5,17	4,26	
NCgl1342	<i>argB</i>	<i>Acetylglutamate kinase</i>	6,68	6,36	
NCgl1343	<i>argD</i>	<i>Acetylornithine aminotransferase, AT class II</i>	6,06	6,59	1,68
NCgl1344	<i>argF</i>	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	3,76	4,41	
NCgl1345	<i>argR</i>	<i>Transcriptional repressor of arginine biosynthesis, ArgR-family</i>	2,75	2,23	
NCgl0359	<i>sdhCD</i>	<i>Succinate dehydrogenase, subunit CD</i>		0,49	
NCgl0360	<i>sdhA</i>	<i>Succinate dehydrogenase, subunit A</i>	0,58	0,31	
NCgl0361	<i>sdhB</i>	<i>Succinate dehydrogenase, subunit B</i>	0,44	0,4	0,64
NCgl0509		<i>Putative integral membrane protein</i>	0,66	0,5	
NCgl1139	<i>narI</i>	<i>Respiratory nitrate reductase 2, gamma chain</i>	0,28	0,33	
NCgl1140	<i>narJ</i>	<i>Respiratory nitrate reductase 2, delta chain</i>	0,36	0,32	
NCgl1141	<i>narH</i>	<i>Respiratory nitrate reductase 2, beta chain</i>	0,22	0,29	
NCgl1142	<i>narG</i>	<i>Respiratory nitrate reductase 2, alpha chain</i>	0,42	0,32	
NCgl1143	<i>narK</i>	<i>Putative nitrate/nitrite permease, MFS-type</i>		0,48	
NCgl1875	<i>gluA</i>	<i>ABC-type glutamate transporter, ATPase subunit</i>		0,64	0,44
NCgl1876	<i>gluB</i>	<i>ABC-type glutamate transporter, substrate-binding lipoprotein</i>		0,5	0,38
NCgl1877	<i>gluC</i>	<i>ABC-type glutamate transporter, permease subunit</i>	0,66	0,36	0,47
NCgl1915		<i>ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein</i>	0,44	0,24	0,16
NCgl1916		<i>ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, permease subunit</i>	0,5	0,33	0,23
NCgl1917		<i>ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, permease subunit</i>	0,37	0,19	0,31
NCgl1918		<i>ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, ATPase subunit</i>	0,24	0,25	0,3

Die durch Zugabe von L-Threonin in ihrer Transkription veränderten Gene sind in Tabelle 8 aufgelistet. Hauptsächlich zeigten Gene des Eisen- oder Schwefelstoffwechsels eine Veränderung der Transkription, wobei der Faktor bei allen Genen nur gering war. Die einzig starke Reaktion auf die Zugabe von L-Threonin zeigte das Gen *aceA*, das für das Glyoxylatzycclus-Enzym Isocitratlyase kodiert. Auch durch diesen variierten experimentellen Ansatz konnte kein Importer für L-Threonin identifiziert werden und die möglichen Kandidaten aus vorhergegangenen Experimenten wurden nicht bestätigt.

Tabelle 8: Globale Transkriptomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 Zellen, die mit bzw. ohne Zugabe von 50 mM L-Threonin nach 6 Stunden kultiviert wurden. Aufgelistet sind Gene deren unterschiedliche mRNA-Verhältnis (CgXII + L-Threonin / CgXII) signifikant ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) verändert ist und in mindestens zwei unterschiedlichen Experimenten identifiziert wurden.

NCgl	Gen	Annotation	5 min	30 min	6,75 h
NCgl1235	<i>serA</i>	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>		1,95	1,59
NCgl2248	<i>aceA</i>	<i>Isocitrate lyase</i>		5,06	1,75
NCgl0120	<i>cysR</i>	<i>Transcriptional activator of assimilatory sulfate reduction, ROK-family</i>	0,49	0,4	
NCgl0544		<i>Putative acetyltransferase, GNAT-family</i>		0,6	0,63
NCgl1541	<i>metK</i>	<i>Methionine adenosyltransferase</i>	0,66	0,37	
NCgl2353		<i>ABC-type putative dipeptide/oligopeptide transporter, substrate-binding lipoprotein</i>	0,56	0,63	
NCgl2439	<i>ftn</i>	<i>Ferritin-like protein</i>	0,52	0,54	
NCgl2717	<i>cysH</i>	<i>Adenosine phosphosulfate reductase</i>	0,51	0,36	
NCgl0610	<i>metQ</i>	<i>ABC-type methionine transporter, substrate-binding lipoprotein</i>	0,61	0,31	1,53
NCgl0625	<i>metY</i>	<i>O-Acetylhomoserine sulfhydrylase</i>	0,45	0,22	2,03
NCgl2718	<i>cysI</i>	<i>Ferredoxin-sulfite reductase</i>	0,34	0,36	1,79
NCgl2719	<i>fpr2</i>	<i>Ferredoxin--NADP(+) reductase</i>	0,23	0,39	1,96

Bei L-Serinzugabe zeigte sich, dass Gene des Eisen- und Schwefelstoffwechsels verstärkt transkribiert wurden (Tabelle 9). Da für die als Membranproteine annotierten Gene *NCgl 0549* und *NCgl 1481* nur drei bzw. eine Transmembranhelix vorhergesagt sind und die Expression nach 30 min verringert ist, kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Gene nicht für einen L-Serin-Importer kodieren. Somit konnte auch unter diesen Bedingungen kein putativer Importer für L-Serin gefunden werden.

Wie zuvor bei der längeren Kultivierung in Anwesenheit von L-Serin, zeigte sich aber, dass eine verringerte Transkription des ersten L-Serin Biosynthesegens *serA* auch im variierten Versuchsansatz erfolgt. Die durchgeführten Transkriptomanalysen weisen stark darauf hin,

dass neben der bekannten Feedback-Regulierung (Peters-Wendisch et al., 2002) auch eine transkriptionelle Regulation vorliegt. Darüber hinaus wurde auch eine schwach verringerte Transkription des für die Serinhydroxymethyltransferase kodierenden Gens *glyA* beobachtet. Somit zeigte sich erstmals, dass diese beiden Gene offensichtlich einer transkriptionellen Regulation unterliegen.

Tabelle 9: Globale Transkriptomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 Zellen, die mit bzw. ohne Zugabe von 50 mM L-Serin nach 6 Stunden kultiviert wurden. Aufgelistet sind Gene deren unterschiedliche mRNA-Verhältnis (CgXII + L-Serin / CgXII) signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) verändert ist und in mindestens zwei unterschiedlichen Experimenten identifiziert wurden.

NCgl	Gen	Annotation	5 min	30 min	6,75 h
NCgl0120	<i>cysR</i>	<i>Transcriptional activator of assimilatory sulfate reduction, ROK-family</i>	2,2		2,02
NCgl0776		<i>ABC-type putative iron-siderophore transporter, substrate-binding lipoprotein</i>	1,68	1,61	
NCgl1173	<i>ssuD1</i>	<i>FMNH2-dependent aliphatic sulfonate monooxygenase</i>	2,01		4,05
NCgl2719	<i>fpr2</i>	<i>Ferredoxin--NADP(+) reductase</i>	1,91		2
NCgl0113	<i>panB</i>	<i>3-Methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase</i>		0,46	0,61
NCgl0798		<i>Putative integral membrane protein</i>	0,54	0,61	
NCgl0799		<i>Putative Na⁺/solute symporter, solute:sodium symporter (SSS) family</i>	0,62	0,53	
NCgl0954	<i>glyA</i>	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	0,66	0,59	
NCgl1094	<i>metE</i>	<i>5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate—homocysteine</i>	0,41	0,39	0,6
NCgl1235	<i>serA</i>	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>	0,55	0,34	0,53
NCgl0549		<i>Putative membrane protein</i>	2,17	0,52	
NCgl1481		<i>Putative membrane protein</i>	2,06	0,48	

Trotz Zugabe von Aminosäuren und der nachgewiesenen Metabolisierung dieser Substanzen, sowie der RNA Präparierung zu verschiedenen Zeitpunkten konnte keine signifikante Expressionserhöhung festgestellt werden. Darüber hinaus war die Transkription der möglichen Kandidaten zum Teil widersprüchlich, sodass die Identifizierung eines spezifischen Aminosäure-Importers nicht weiter verfolgt wurde. Aus den erhaltenen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass die Möglichkeiten einen Importer mittels Microarrays zu identifizieren begrenzt sind. Ein vergleichbarer Ansatz ist weder für *C. glutamicum* noch für *E. coli* bekannt, da zumeist Aminosäure-Importers aus Mutanten, die durch ungerichtete Mutagenese entstanden waren, und anschließender Selektion identifiziert wurden.

2. Nutzung von Exportern aus *E. coli* in *C. glutamicum*

2.1 Auswahl von Kandidaten zur L-Threonin-Produktion

Mittels *Metabolic Engineering* des L-Threonin-Biosynthesewegs ist es nicht möglich aus *C. glutamicum* einen effektiven L-Threonin-Produzenten zu generieren, da vorhergegangene Experimente zeigten, dass sehr wahrscheinlich der Export dieser Aminosäure der limitierende Faktor für diesen Prozess ist (Reinscheid et al., 1994). Obwohl in *C. glutamicum* das ThrE Protein, das L-Threonin Efflux vermittelt, identifiziert wurde, kann die Export-Limitation durch Überexpression des entsprechenden Gens nicht aufgehoben werden (Simic et al., 2001). Zurzeit werden zur mikrobiellen L-Threonin-Produktion ausschließlich Stämme von *E. coli* genutzt, die momentan L-Threonin am effizientesten überproduzieren und ins Nährmedium ausscheiden (Rieping et al., 2006). Mittlerweile sind mehrere am L-Threonin-Efflux beteiligte Membranproteine aus *E. coli* bekannt und ihre Funktion teilweise in *E. coli* Stämmen nachgewiesen (Kruse et al., 2002). Daher wurden vier Exporter aus *E. coli* ausgewählt um ihre Funktionalität bezüglich des L-Threonin-Transports in *C. glutamicum* zu untersuchen (Tabelle 10), da zum einen keinesfalls gewährleistet ist, dass sie in die Membran eingebaut werden und zum anderen auch deren Spezifität in Untersuchungen mit *E. coli* nicht eindeutig ist. Die bekannten Eigenschaften der gewählten Transporter sind in Tabelle 10 aufgelistet und möglicherweise können *C. glutamicum*-Stämme bei Nutzung dieser Transporter bezüglich der L-Threonin-Akkumulation verbessert werden.

Tabelle 10: Überblick der heterologen Transporter aus *E. coli* deren Funktionalität in *C. glutamicum* bezüglich L-Threonin-Transport in dieser Arbeit untersucht wurde. Zusätzlich sind die Familien und die bekannten Eigenschaften der jeweiligen Transporter aufgelistet.

Gen	Familie	Merkmale		Referenz
		Resistenz	Export	
<i>rhtA</i>	MFS	L-Thr; L-Hom; L-Ser; Purine	L-Thr; L-Hom	Zakataeva et al., 2006
<i>rhtB</i>	RhtB	L-Thr; L-Hom; L-Homlac	L-Thr	Eggeling et al., 2003
<i>rhtC</i>	RhtB	L-Thr	L-Thr	Eggeling und Sahn 2003
<i>yeaS</i>	RhtB	L-Thr; L-Hom; L-Homlac	L-Cys; O-Acetylserine	Eggeling und Sahn 2003

Die in dieser Arbeit untersuchten Transporter RhtB, RhtC und YeaS sind paraloge Proteine der RhtB-Familie aus *E. coli* (Zakataeva et al., 1999) und RhtA ist Mitglied der *Major Facilitator Superfamily* (Saier et al., 1999). In *E. coli* wurde bereits nachgewiesen, dass die

Bildung der Proteine RhtA, RhtB und RhtC die L-Threonin Produktion steigert und die Bildung von YeaS die Resistenz von *E. coli* gegenüber L-Threonin deutlich erhöht.

2.2 Überprüfung ausgewählter Transporter

Um die L-Threonin-Exporteigenschaften der ausgewählten Transporter zu untersuchen war es notwendig einen *C. glutamicum* Stamm mit erhöhten, internen L-Threonin Konzentrationen auszuwählen, wie es bei Deregulation des L-Threonin-Biosynthesewegs der Fall ist.

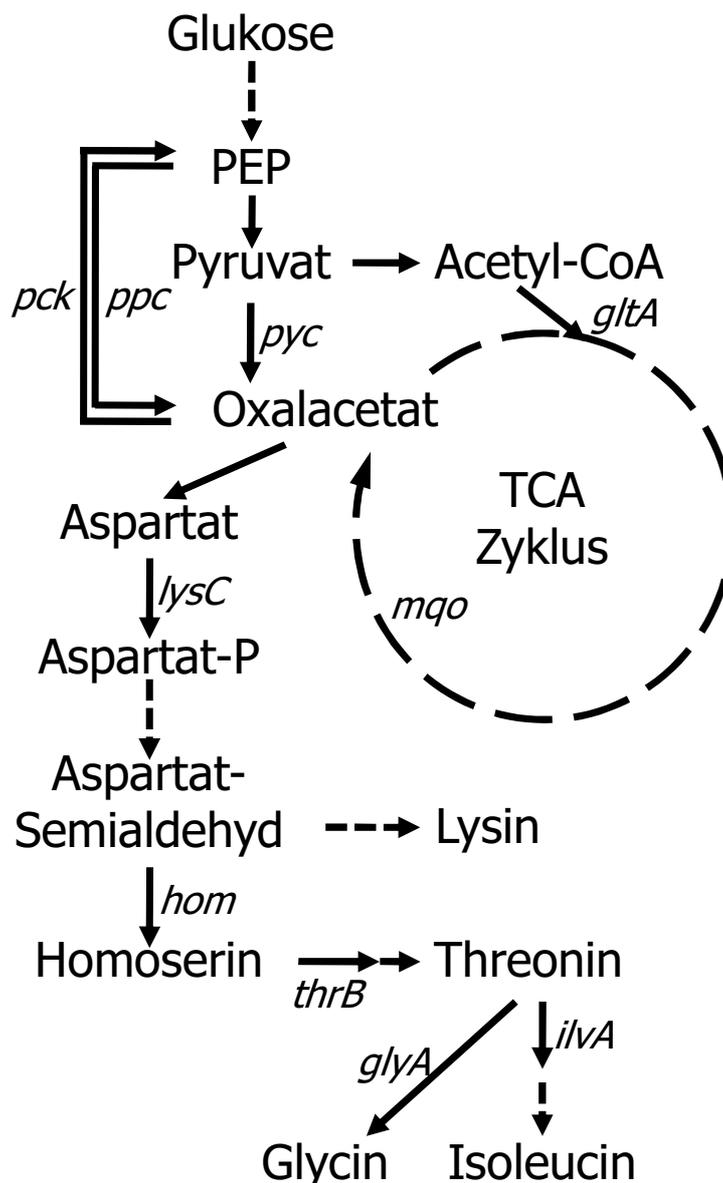


Abbildung 9: Schematische Übersicht des Stoffwechselwegs ausgehend von dem Substrat Glukose zu dem Produkt L-Threonin und dessen Abbauprodukte Glycin und L-Isoleucin. Zusätzlich sind Stoffwechsel-relevante Gene gezeigt, die für folgende Enzyme kodieren: *gltA* – Citrat-Synthase, *glyA* – Serinhydroxymethyltransferase, *hom* – Homoserin-Dehydrogenase, *ilvA* – Threonin-Dehydratase, *lysC* – Aspartat-Kinase, *mgo* – Malatquinon-Oxidoreduktase, *pck* – Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, *ppc* – Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, *pyc* – Pyruvat- Carboxylase, *thrB* – Homoserin-Kinase

Erste Untersuchungen fanden in dem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Stamm *C. glutamicum* DM368-3 statt. Die *Feedback*-Inhibierung der Aspartat-Kinase und der Homoserin-Dehydrogenase sind in diesem Stamm aufgehoben (Abbildung 9) und es wurde gezeigt, dass dieser Stamm L-Threonin ins Medium ausscheidet (Eikmanns et al., 1991). Mittels Transformation des Stammes durch die pEKEx2-Derivate mit den entsprechenden Transportern wurde dieser Kanamycin-resistent. Die erhaltenen Stämme wurden in Minimalmedium CgXII mit 4% Glukose kultiviert und die akkumulierten Aminosäuren nach 24 h und 48 h bestimmt (Abbildung 10). Der Kontrollstamm *C. glutamicum* DM368-3 pEKEx2 akkumulierte nach 24 h 5,2 mM L-Threonin, was bis auf 7,2 mM nach 48 h anstieg. Darüber hinaus wurde die L-Threonin-Vorstufe Homoserin und das Abbauprodukt Glycin im Überstand detektiert. Während die Homoserin-Konzentration im Verlauf der Kultivierung möglicherweise durch Wiederaufnahme geringer wurde, konnte Glycin in höherer Konzentration nachgewiesen werden. Dabei war die Glycin-Konzentration bei weitem höher als die L-Threonin-Konzentration. Da Glycin ein Abbauprodukt von L-Threonin ist, lässt dies auf starken, internen Abbau durch die Serinhydroxymethyltransferase schließen (Simic et al., 2002). Trotz der Expression von *rhtB* in *C. glutamicum* DM368-3 pEKEx2 *rhtB* war die Aminosäure-Akkumulation vergleichbar mit dem Kontrollstamm, obwohl bereits gezeigt wurde, dass RhtB L-Threonin effektiv in *E. coli* transportiert (Kruse et al., 2002). Dagegen führte die Expression von *yeaS* zu einer gesteigerten L-Threonin-Akkumulation und zu geringeren Glycin-Konzentrationen während der Kultivierung, was auf einen gesteigerten L-Threonin-Export schließen lässt. Darüber hinaus wurde auch Homoserin im Überstand gemessen was einhergeht mit der Beobachtung, dass die Überexpression von *yeaS* *E. coli* Resistenz gegen L-Threonin, L-Homoserin und L-Homoserinlaktat im Medium verleiht (Eggeling und Sahm 2003). Ein starker Anstieg der L-Threonin-Konzentration wurde durch Expression der für die heterologen Transporter kodierenden Gene *rhtA* und *rhtC* erzielt, die bis zu vierfach höher gegenüber dem Kontrollstamm war. Darüber hinaus wurden hohe Homoserin-Konzentrationen von bis zu 15,7 mM gemessen. Auch dies stimmt mit Beobachtungen überein, die zeigten, dass die Überexpression von *rhtA* in *E. coli* zu Homoserin-Resistenz führt (Livshits et al., 2003).

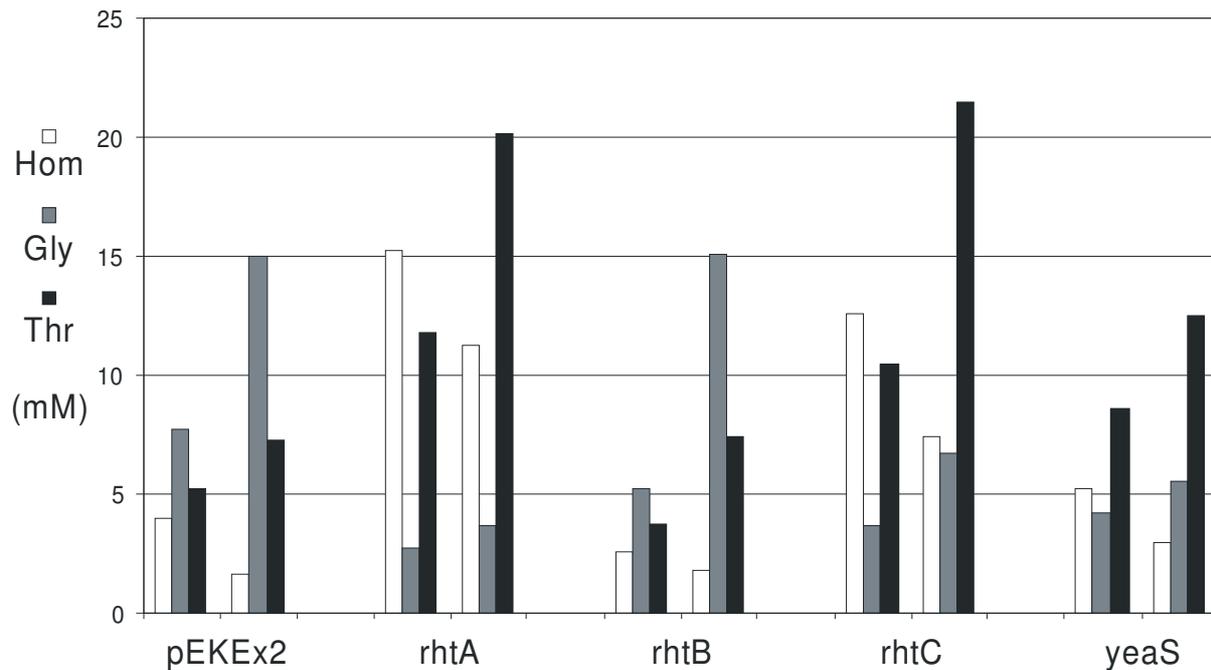


Abbildung 10: Aminosäure-Akkumulation nach 24 h und 48 h von *C. glutamicum* DM368-3 Stämmen, die zusätzlich die jeweiligen pEKEx2-kodierten Transporter exprimierten. Die Stämme wurden in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose, kultiviert. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem Leerplasmid pEKEx2 untersucht. Der jeweils linke Balkensatz gibt die Akkumulationen nach 24 h und der rechte nach 48 h an.

Zur Bestätigung der erhaltenen Daten wurden die ausgewählten Transporter in weiteren Stämmen untersucht, die aber durch ortsgerichtete Mutagenese entstanden und somit eindeutig definiert waren. *C. glutamicum* DM1730 ist ein Derivat des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC13032, der den Metabolitfluss verstärkt über L-Aspartat in Richtung L-Lysin leitet. Durch einen Aminosäureaustausch in der durch das Gen *pyc*^{P458S} kodierten Pyruvatcarboxylase findet die Reaktion von Pyruvat zu der L-Aspartat-Vorstufe Oxalacetat verstärkt statt (Abb. 9) (Georgi et al., 2005). Des Weiteren wird der Abbau von Oxalacetat durch Deletion des für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierenden Gens *pck* reduziert (Petersen et al., 2001). Durch gerichtete Mutagenese der Aspartatkinase wurde die *Feedback*-Inhibierung aufgehoben (Cremer et al., 1991), und der Stoffwechselfluss von L-Aspartat Semialdehyd in Richtung L-Methionin und L-Threonin durch Verringerung der Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität durch den Aminosäureaustausch in dem kodierenden Gen *hom*^{V59A} reduziert (Reinscheid et al., 1994). Die Transformation des Stammes durch das Plasmid pEC-T18 *hom*^{fbr} *thrB* *thrE* ermöglichte jedoch die weitere Umlenkung des Stoffwechselflusses von L-Aspartat-Semialdehyd zu L-Threonin durch Plasmid-kodierte Überexpression der *Feedback*-resistenten Homoserin-Dehydrogenase und der Homoserin-Kinase (Abb. 9). Des Weiteren wird auch der native Transporter *thrE* überexprimiert. Mit

diesem Gen konnte ein geringfügig verbesserter L-Threonin-Export erreicht werden (Simic et al., 2002). *C. glutamicum* Stämme, die durch das Plasmid pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* transformiert wurden, werden im Folgenden durch die Namensweiterung „-T“ gekennzeichnet. Die jeweiligen pEKEx2 Derivate mit den heterologen Transportern wurden durch Transformation in den Stamm eingefügt. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pEKEx2 verwendet.

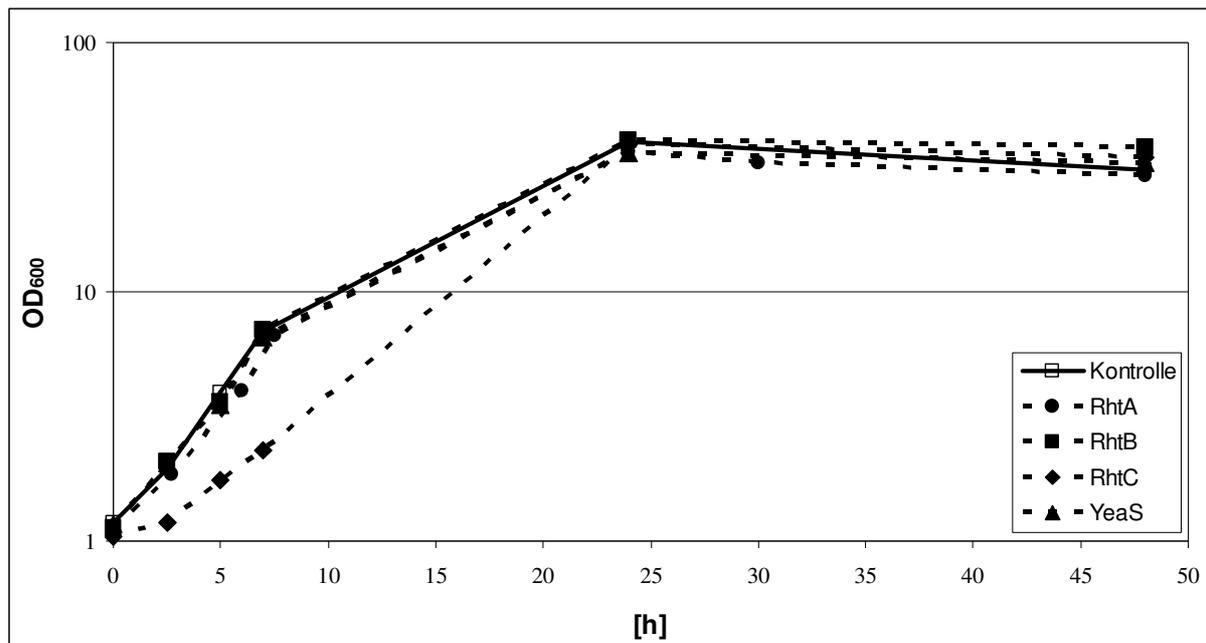


Abbildung 11: Wachstum von *C. glutamicum* DM1730–T, der zusätzlich die jeweiligen pEKEx2-kodierten Transporter exprimiert. Die Kultivierung fand in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose statt. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem Leerplasmid pEKEx2 eingesetzt.

Die Kultivierungen mit den generierten DM1730–T Stämmen zeigten, dass die RhtA, RhtB und YeaS enthaltenden Stämme mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,25 \text{ h}^{-1}$ nahezu identisch zum Vergleichsstamm mit Leervektor wuchsen (Abbildung 11). Die einzige Ausnahme war der *rhtC* exprimierende Stamm, der mit einer Wachstumsrate von nur $\mu=0,12 \text{ h}^{-1}$ deutlich langsamer wuchs. Um im Weiteren die Funktionalität der Transporter zu untersuchen, wurden parallel die Überstände auf die gebildeten Aminosäuren mittels HPLC Analysen untersucht (Abbildung 12). Im Vergleich zu den im Überstand der Kontrolle gemessenen 14,3 mM L-Threonin nach 48 h konnte nur im Überstand des *rhtA* exprimierenden Stammes mit 25,6 mM eine deutliche Steigerung der L-Threonin-Akkumulation nachgewiesen werden. In dem Überstand des *rhtB* exprimierenden Stammes wurde neben einer deutlich geringeren L-Threonin Konzentration die höchste Glycin-Konzentration mit 9,6 mM gemessen. Die hohe Glycin-Konzentration lässt auf Abbau von L-Threonin zu Glycin schließen, was vermuten lässt, dass L-Threonin mittels RhtB in *C. glutamicum* nicht exportiert wird, und die

Experimente mit dem durch ungerichtete Mutagenese erhaltenen Stamm *C. glutamicum* DM368 bestätigt. In Überständen der *rhtC* und *yeaS* exprimierenden Stämme wurden im Vergleich zu der Kontrolle mit 14,8 mM bzw. 15,6 mM L-Threonin nahezu identische Konzentrationen gemessen. Darüber hinaus wurde im Überstand des *rhtC* exprimierenden Stammes eine auffällig hohe Konzentration von L-Lysin detektiert, aber auch in den Überständen der anderen Stämme konnte L-Lysin gemessen werden. Insgesamt ist es überraschend, dass *C. glutamicum* DM1730-T noch viel L-Lysin bildete, da durch die Überexpression der Gene *hom^{fbr}* und *thrB* der Stoffwechselfluss nahezu komplett in Richtung L-Threonin umgelenkt werden sollte und darüber hinaus zuvor mit *C. glutamicum* DM368 auch keine L-Lysin-Akkumulation gemessen wurde. Der Nachweis dieser Aminosäure lässt auf Probleme beim Umleiten des Metabolitflusses schließen, was möglicherweise durch Mutation der Plasmid-kodierten Gene *hom^{fbr}* oder *thrB* zu erklären ist, da in bereits vorhergegangenen Experimenten der Metabolitfluss durch Nutzung des Plasmids pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* vollständig von L-Lysin zu L-Threonin umgeleitet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der L-Lysin-Bildung wurde nicht die maximal mögliche Menge L-Threonin gebildet weshalb die Gesamtausbeute in dem Stamm *C. glutamicum* DM1730-T geringer war als in *C. glutamicum* DM368-3. Des Weiteren resultierte die Expression von *rhtC* nicht in einer erhöhten L-Threonin-Akkumulation, aber auch das Wachstum dieses Stammes war stark beeinträchtigt. Offensichtlich lagen Probleme bei der Expression der Gene beider Plasmide vor.

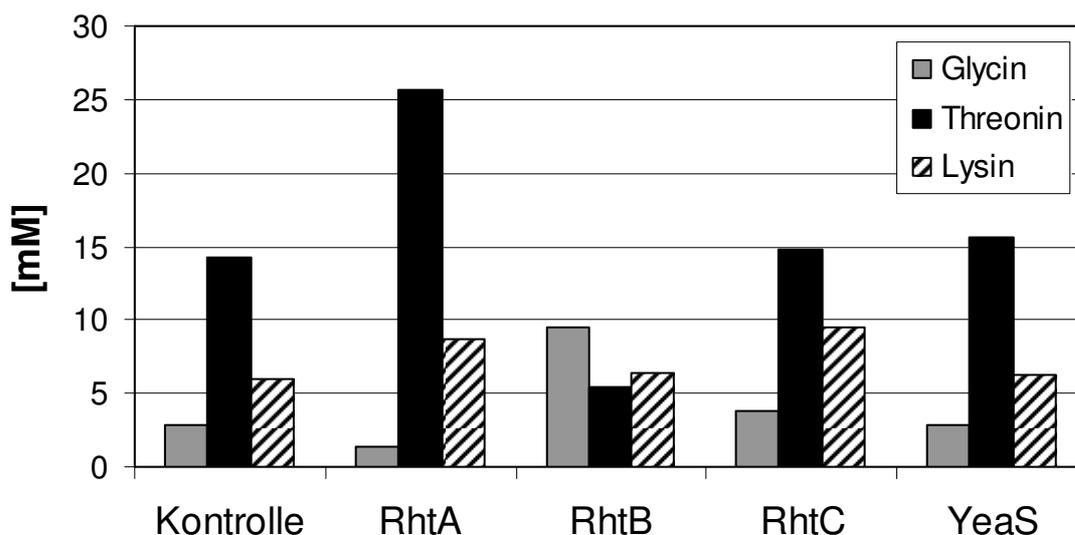


Abbildung 12: Aminosäure-Akkumulation von *C. glutamicum* DM1730-T Stämmen nach 48 h, die zusätzlich die jeweiligen pEKEx2-kodierten Transporter exprimierten. Die Kultivierung fand in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose statt. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem Leerplasmid pEKEx2 untersucht.

Bereits in den vorhergegangenen Analysen mit dem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Stamm *C. glutamicum* DM368-3 wurden mit Ausnahme bei Expression von *rhtC* vergleichbare Ergebnisse erhalten, wenn auch die Konzentrationen zum Teil geringer waren. Daten der Firma Evonic bestätigten die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der L-Threonin-Akkumulation mit *C. glutamicum* DM1730-T, wobei die höchste L-Threonin-Akkumulation durch Expression des Gens *rhtC* erzielt wurde. Die noch nachweisbaren L-Lysin-Konzentrationen in allen Überständen weisen auf unvollständige Umlenkung des Stoffwechselflusses von L-Aspartat Semialdehyd zu L-Threonin hin. Dennoch konnte deutlich gezeigt werden, dass durch Nutzung der heterologen Transporter die L-Threonin-Akkumulation gesteigert werden kann. Da das noch gebildete L-Lysin auf Mutationen in dem Plasmid pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* schließen lässt, mussten die Stämme neu konstruiert werden. Da die Funktionalität bereits zum Teil in *C. glutamicum* DM1730-T gezeigt wurde, sind die weiteren Analysen mit einem zweiten L-Lysin produzierenden Stamm durchgeführt worden.

2.3. Produktbildung mit *C. glutamicum* DM1800-T

Der Stamm *C. glutamicum* DM1800, der erst im Verlaufe der Untersuchungen durch die Firma Evonic zur Verfügung gestellt wurde, ist besser für die L-Threonin-Bildung geeignet, da er im Vergleich zu dem Stamm *C. glutamicum* DM1730 keine reduzierte Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität besitzt (Abbildung 9). Um den Stoffwechselfluss von L-Lysin zu L-Threonin zu lenken wurde der Stamm *C. glutamicum* DM1800 durch das Plasmid pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* transformiert. Stämme, die durch das Plasmid pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* transformiert wurden, werden im Folgenden wieder durch die Namensweiterung „-T“ gekennzeichnet. Zusätzlich wurden als pEKEx2-Derivate die heterologen Transportergene *rhtA* und *rhtC* eingebracht. Versuche mit den heterologen Transportern *rhtB* und *yeaS* wurden nicht durchgeführt, da die vorhergegangenen Versuche zeigten, dass diese L-Threonin in *C. glutamicum* ineffizient bzw. überhaupt nicht transportieren. Die neu generierten Stämme *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2, *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtA*, *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtC* wurden über einen Zeitraum von 48 h in CgXII, 4% Glukose kultiviert und die Akkumulation der Aminosäuren mittels HPLC Analysen bestimmt (Tabelle 11). An der Kultivierung war auffällig, dass die Transporter exprimierenden *C. glutamicum* DM1800-T Stämme mit der Wachstumsrate von $\mu=0,19 \text{ h}^{-1}$ deutlich langsamer wuchsen als der Kontrollstamm

DM1800-T ($\mu=0,23 \text{ h}^{-1}$). Offensichtlich beeinträchtigt die Bildung der Transporter das Wachstum der Zellen.

Wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist wurde im Überstand der Kontrolle nach 24 h 8,5 mM Glycin und 9,7 mM L-Threonin gemessen, die in der weiteren Kultivierung nach 48 h auf 15,8 mM Glycin und 14,6 mM L-Threonin anstiegen. Auch in diesem Fall lässt die hohe Glycin-Konzentration im Medium auf hohe zellinterne L-Threonin-Konzentrationen schließen. Darüber hinaus fand keine L-Lysin-Akkumulation statt, was die effiziente Umlenkung des Stoffwechselflusses von L-Lysin zu L-Threonin bestätigt.

Tabelle 11: Aminosäure-Akkumulation von *C. glutamicum* DM1800-T durch Expression der heterologen Transporter *rhtA*, bzw. *rhtC*. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem Leerplasmid pEKEx2 untersucht. Die Stämme wurden über einen Zeitraum von 48 h in Minimalmedium CGXII, 4% Glukose, kultiviert.

	24 h			48 h		
	Kontrolle	RhtA	RhtC	Kontrolle	RhtA	RhtC
L-Glutamat	0,4	1,6	0,5	0,5	7,2	1,3
L-Serin	0,1	7,9	0,5	0,1	2,1	1,4
L-Homoserin	1,4	14,1	0,3	0,6	14,7	0,3
Glycin	8,5	2,1	0,8	15,8	2,8	1,4
L-Threonin	9,7	19,0	32,7	14,6	31,0	49,5
L-Alanin	3,2	3,4	2,5	4,4	4,2	2,4
L-Lysin	0	0	0	0	0	0

Da im Überstand der *rhtA* bzw. *rhtC* exprimierenden Stämme keine Glycin-Akkumulation zu messen war, kann dies als Hinweis gesehen werden, dass durch Bildung der heterologen Transporter eine hohe interne L-Threonin-Konzentration verhindert wurde. Neben 31 mM L-Threonin akkumulierte der *rhtA* exprimierende Stamm 7,2 mM L-Glutamat und 14,7 mM Homoserin. Diese Ergebnisse zeigten, dass *rhtA* ein breites Substratspektrum besitzt und nicht nur L-Threonin exportiert. Bereits in den zuvor durchgeführten Experimenten mit dem Stamm *C. glutamicum* DM368-3 konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden. Dagegen konnte bei Expression von *rhtC* schon nach 24 h 32,7 mM L-Threonin im Überstand gemessen werden. Dieser Wert steigerte sich noch im Laufe der Kultivierung auf 49,5 mM L-Threonin nach 48 h. Neben L-Threonin wurde keine Aminosäure in hoher Konzentration bei Expression von *rhtC* in dem Stamm DM1800-T detektiert. Daraus kann geschlossen werden, dass RhtC eine sehr hohe Spezifität gegenüber L-Threonin besitzt. Trotz der verringerten Aktivität der Homoserin-Dehydrogenase wären wahrscheinlich vergleichbare Ergebnisse mit *C. glutamicum* DM1730-T erzielt worden, da dies durch das Plasmid-kodierte

Gen *hom*^{fbr} ausgeglichen worden wäre. Jedoch bietet der Stamm *C. glutamicum* DM1800 die ideale Ausgangsbasis für weitere Stammmodifikationen zur Verbesserung der L-Threonin-Produktion, da keine chromosomal kodierte, reduzierte Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität vorliegt.

2.4. Bestimmung zellinterner Konzentrationen und Exportraten

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die heterologen Transporter RhtA und RhtC L-Threonin in *C. glutamicum* effektiv exportieren. Um noch detailliertere Daten über diese beiden Transporter bezüglich Spezifität und Effektivität zu erhalten, wurde ein spezieller experimenteller Ansatz gewählt, der darin besteht unabhängig vom Stammhintergrund durch Peptidzugabe die intrazelluläre Aminosäure-Konzentration zu beeinflussen, wie es in Abbildung 13 schematisch dargestellt ist.

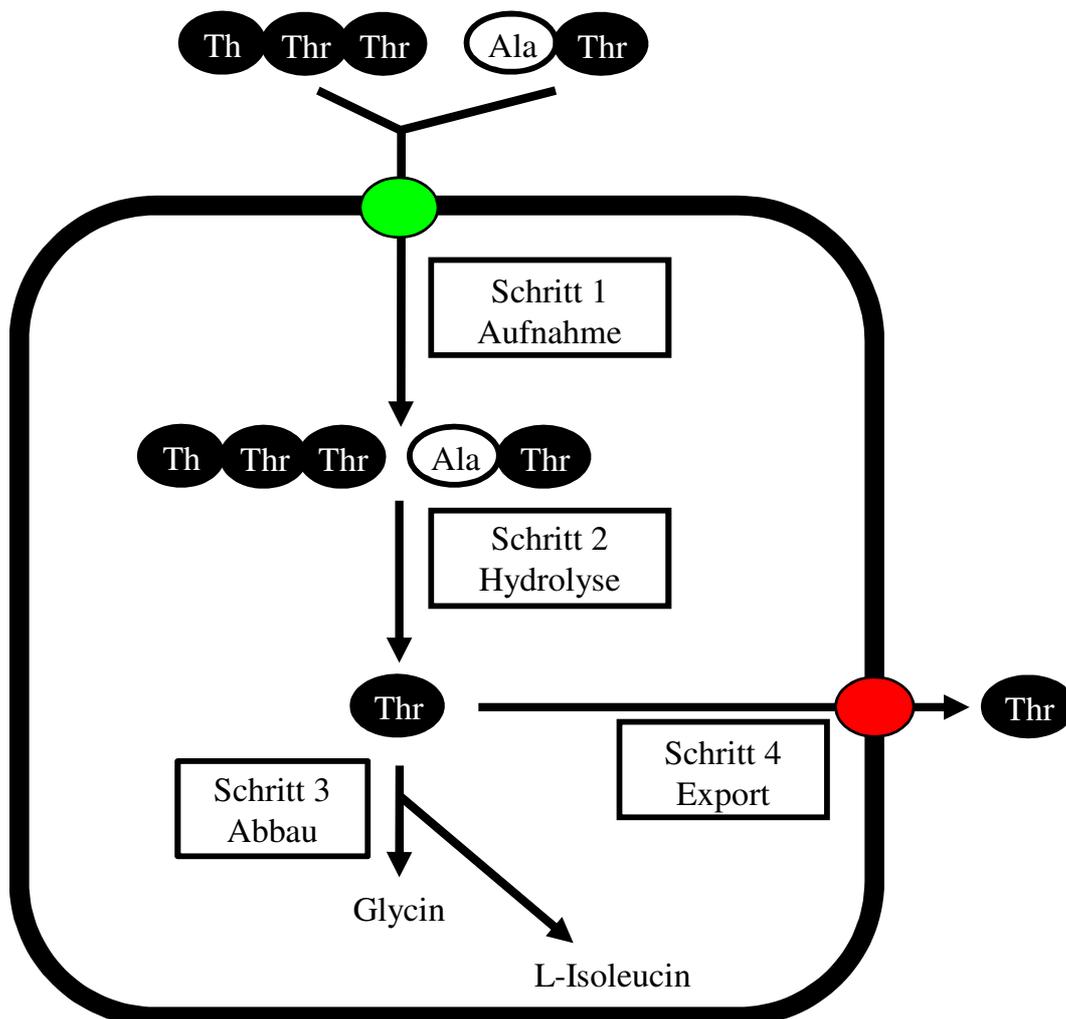


Abbildung 13: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Bestimmung spezifischer Exportraten durch Zugabe von Peptiden. Es wurde die Verstoffwechselung von L-Threonin-Tripeptid, L-Alanin-L-Threonin Dipeptid und die Kombination dieser Peptide untersucht. Zusätzlich sind die vier entscheidenden Schritte zur Akkumulation hoher interner Konzentrationen von L-Threonin aufgeführt. Dabei treten die Schritte 1 und 2 in Konkurrenz zu Schritt 3 und 4.

Es wurde bereits gezeigt, dass *C. glutamicum* Peptide effektiv aufnimmt und hydrolysiert wodurch sehr schnell sehr hohe, interne Aminosäure-Konzentrationen erzielt werden können (Vrljic et al., 1996). Um genaue Transportraten zu bestimmen ist es notwendig eine hohe, sättigende Konzentration von dem Substrat zu erreichen (Abb. 13). Dabei sind vor allem die beiden ersten Schritte, die Aufnahme der gewählten Peptide in die Zelle und deren Hydrolyse, von entscheidender Bedeutung, da beide Schritte Geschwindigkeits-bestimmend sein können. Die Aufnahme und die Hydrolyse konkurrieren dabei in diesem experimentellen Ansatz mit den anschließenden Reaktionen, dem Abbau und dem Export des Substrats. Um eine hohe, sättigende Konzentration zu erzielen müssen somit die ersten beiden Schritte schneller ablaufen als die beiden Folgenden. Zu diesem Zweck wurde der Stamm *C. glutamicum* DM1800 durch die Plasmide pEKE_{x2}, pEKE_{x2} *rhtA* und pEKE_{x2} *rhtC* transformiert, und dann unter Zugabe verschiedener L-Threonin-haltiger Peptide inkubiert und die externe und interne L-Threonin-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dies hatte zum Ziel durch Aufnahme und Hydrolyse der Peptide schnell eine hohe interne L-Threonin-Konzentration zu erreichen, um den resultierenden Verlauf der externen L-Threonin-Konzentration zu verfolgen um daraus eine Exportrate zu bestimmen.

Da *C. glutamicum* wahrscheinlich mehrere Peptid-Aufnahmesysteme mit möglicherweise unterschiedlicher Spezifität besitzt (Winnen et al., 2005), bestand die Möglichkeit, dass die Kombination von Peptiden durch getrennte Aufnahme zu höheren internen Konzentrationen führt als die Zugabe nur eines Peptids. Daher wurde zu Beginn in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800 pEKE_{x2} untersucht, ob die Nutzung eines L-Alanin-L-Threonin Dipeptids, eines L-Threonin-Tripeptids oder die Kombination der beiden Peptide zu der höchsten internen L-Threonin-Konzentration in kürzester Zeit führte (Abb. 14).

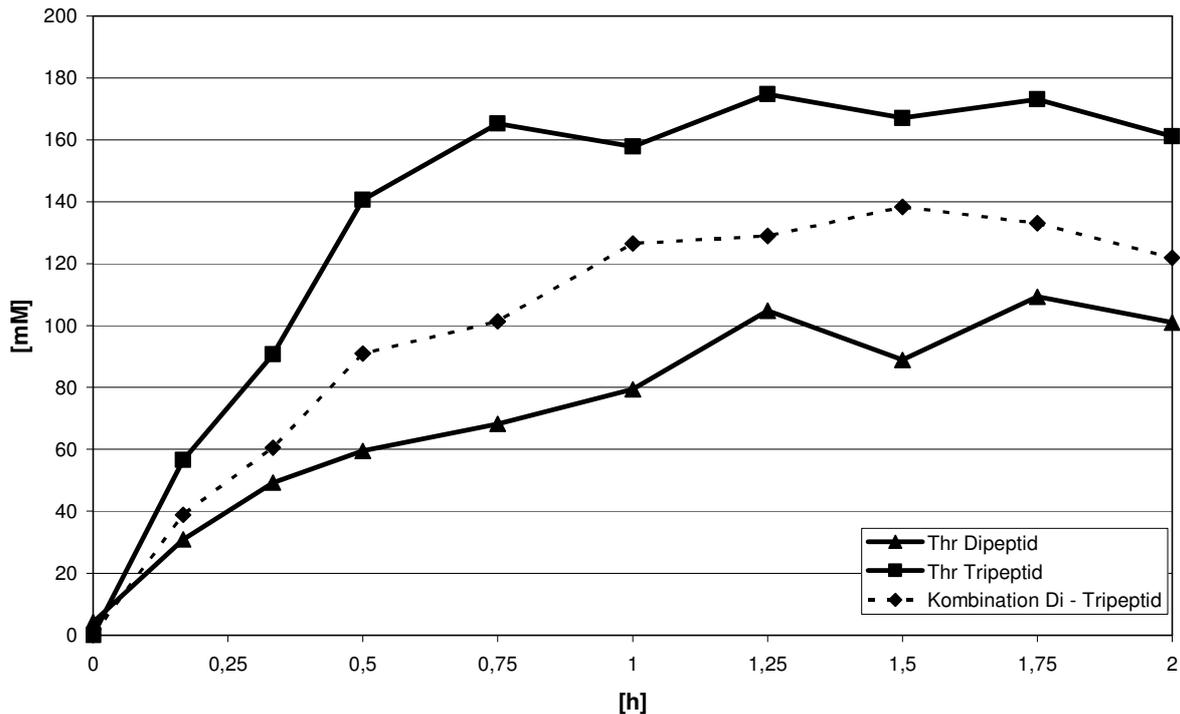


Abbildung 14: Interne L-Threonin-Konzentration in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800 pEKEx2, der in CgXII, 4% Glukose, und 6 mM Ala-Thr Dipeptid, 2 mM Thr Tripeptid und der Kombination aus 1 mM Thr Tripeptid und 3 mM Ala-Thr Dipeptid inkubiert wurde.

In dem Experiment zur Ermittlung der optimalen Peptidzugabe wurden äquimolare Mengen verschiedener Peptide eingesetzt um die gleiche Endkonzentration an L-Threonin zu erreichen. Dazu wurden 6 mM L-Ala-L-Thr Dipeptid, 2 mM L-Thr Tripeptid oder 3 mM L-Ala-L-Thr Dipeptid zusammen mit 1 mM L-Thr Tripeptid zugegeben um nach Hydrolyse eine extrazelluläre Konzentration von theoretisch maximal 6 mM L-Threonin zu erzielen. Die eingesetzten Konzentrationen waren höher als in vergleichbaren Untersuchungen (Simic et al., 2001) um möglichst deutlichere Unterschiede bei Ergebnisse zu erzielen. Es zeigte sich, dass durch Zugabe von L-Threonin Tripeptid am schnellsten die maximale, interne L-Threonin-Konzentration von 175 mM erreicht wurde. Darüber hinaus ergab das Experiment, dass keine zusätzliche Steigerung durch die Zugabe der Kombination aus Di- und Tripeptid gegenüber der Inkubation mit L-Threonin-Tripeptid erreicht werden konnte. Wahrscheinlich wird die Aufnahme des Di- und Tripeptids durch das gleiche Aufnahmesystem katalysiert. Daher handelt es sich bei der kombinierten Zugabe der Peptide eher um eine Konkurrenzreaktion, was zwar zu einem schnelleren Anstieg der L-Threonin-Konzentration verglichen zum Dipeptid aber zu einem langsameren Anstieg verglichen zum Tripeptid führt. Auch wenn bisher von *C. glutamicum* kein Peptidaufnahme-System bekannt ist, konnten für andere Organismen diese Proteine identifiziert werden (Doeven et al., 2005).

In den folgenden Experimenten wurde auf Grund der erhaltenen Ergebnisse ausschließlich mit dem Tripeptid gearbeitet.

Zur Vergleichbarkeit mit bereits bekannten Daten zum nativen Threonin-Exporter *thrE* (Simic et al., 2001) wurde in den Experimenten 1 mM L-Threonin-Tripeptid eingesetzt. Der Stamm *C. glutamicum* DM1800, der zusätzlich pEKEx2, pEKEx2 *rhtA* oder pEKEx2 *rhtC* enthielt, wurde zuerst zwei Stunden in CgXII, 4% Glukose und zusätzlich 1 mM L-Threonin-Tripeptid vorinkubiert um bereits eine hohe interne L-Threonin-Konzentrationen zu erzielen. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und erneut zwei Stunden in CgXII, 4% Glukose und zusätzlich 1 mM L-Threonin-Tripeptid inkubiert und die internen (Abbildung 15) und externen (Abbildung 16) L-Threonin-Konzentrationen gemessen.

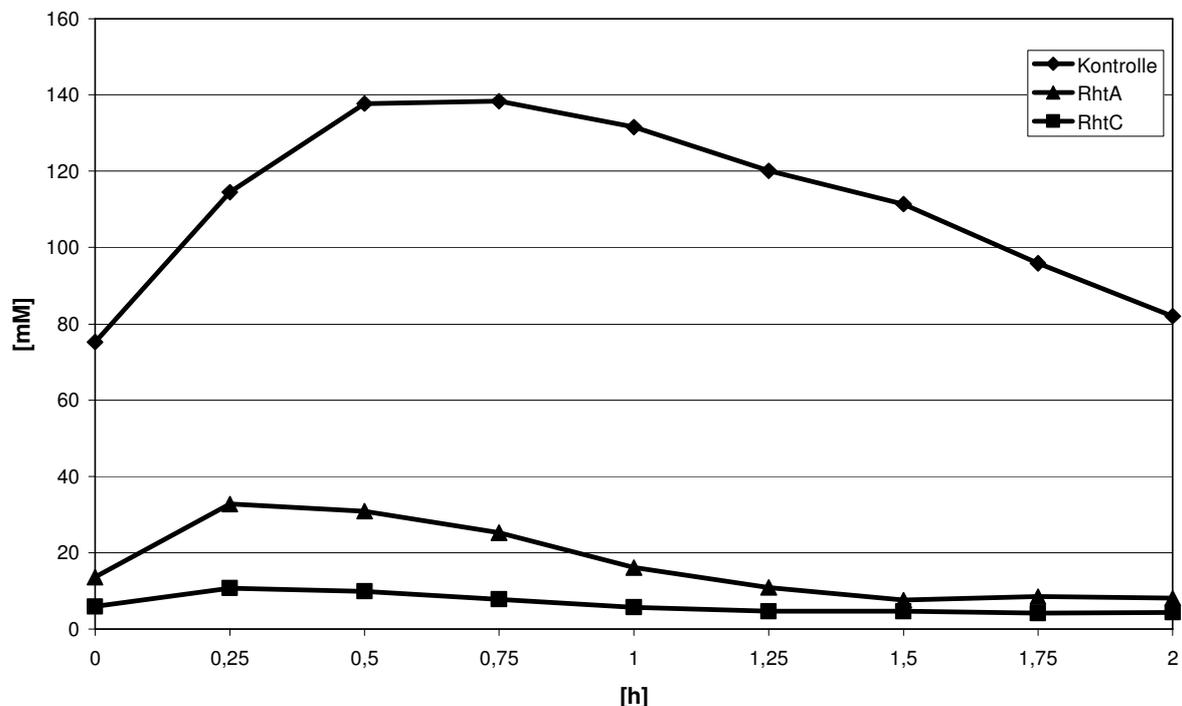


Abbildung 15: Interne L-Threonin-Konzentration in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800, der zusätzlich pEKEx2, pEKEx2 *rhtA* oder pEKEx2 *rhtC* enthielt. Die Inkubation erfolgte in CgXII, 4% Glukose, 1 mM L-Threonin-Tripeptid.

Durch Zugabe von L-Threonin-Tripeptid fand eine Akkumulation von bis zu 140 mM L-Threonin im Zellinneren des Kontrollstammes statt. Vergleichbare Werte wurden auch von Simic et al., (2001) bei Untersuchungen zu *thrE* gemessen. Dagegen führte die Expression der heterologen Transporter zu einer bei weitem niedrigeren Akkumulation von L-Threonin. Während die Expression von *rhtA* zu einer internen Akkumulation von noch 30 mM

L-Threonin führte, betrug die maximale L-Threonin-Konzentration bei Expression von *rhtC* sogar nur 10 mM.

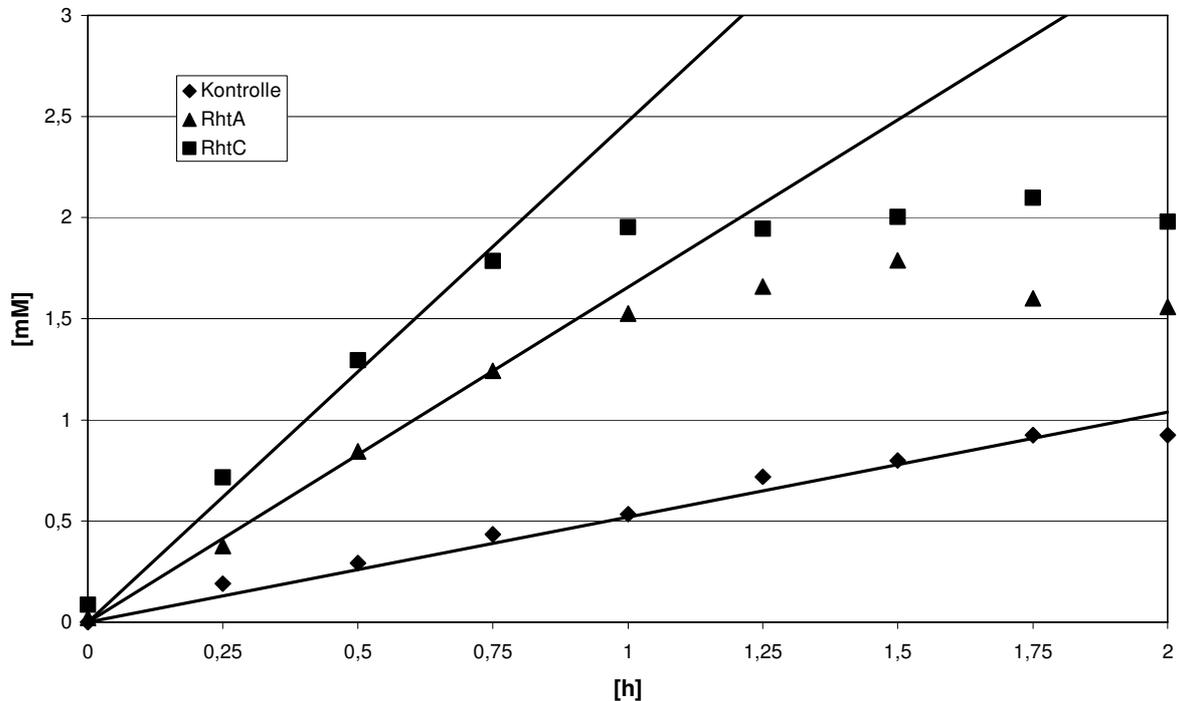


Abbildung 16: Externen L-Threonin-Konzentration im Peptidsystem mit dem Stamm *C. glutamicum* DM1800, der zusätzlich pEKEx2, pEKEx2 *rhtA* oder pEKEx2 *rhtC* enthielt. Die Inkubation erfolgte in CgXII, 4% Glukose ,1 mM L-Threonin-Tripeptid. Die Daten wurden im identischen Experiment wie für Abb. 14 erhoben.

Wie Abbildung 16 zeigt scheidet die Kontrolle über einen Zeitraum von zwei Stunden konstant L-Threonin aus und akkumuliert bis dahin etwa 1 mM mit einer Exportrate von $2,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ (Tabelle 12), was vorhergegangene Untersuchungen, in denen für den Wildtyp eine Exportrate von $2,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ bestimmt wurde, bestätigt (Simic et al., 2001). Die *rhtA* beziehungsweise *rhtC* exprimierenden Stämme scheiden L-Threonin mit erheblich höheren Raten von $5,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ bzw. $8,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ aus als die Kontrolle und akkumulieren 1,6 mM bzw. 2 mM L-Threonin.

Tabelle 12: Exportrate der heterologen Transporter RhtA und RhtC zur L-Threonin-Akkumulation.

Exporter	L-Threonin Exportrate [nmol min ⁻¹ mg TG ⁻¹]
Kontrolle	2,3
RhtA	5,8
RhtC	8,9

Im Vergleich mit *E. coli* Produktionsstämmen mit kurzfristigen Exportraten von bis zu 25 nmol min⁻¹ mg TG⁻¹ während der Fermentation scheinen die ermittelten Exportraten zwar relativ gering zu sein (Kruse et al., 2002), doch es muss berücksichtigt werden, dass die Raten für *E. coli* lediglich aus Kultivierungen ohne Messung intrazellulärer L-Threonin-Konzentrationen bestimmt wurden und nicht aus vergleichbaren Peptid-basierenden Experimenten.

In den *rhtA* bzw. *rhtC* exprimierenden Stämmen fällt die Exkretion aber schon nach weniger als einer Stunde ab, was auf die bereits zu diesem Zeitpunkt geringen L-Threonin-Konzentrationen zurückzuführen ist (Abbildung 15). Deswegen ist davon auszugehen, dass das Exportsystem nicht gesättigt ist und sogar prinzipiell noch höhere Exportraten erzielt werden könnten, falls die interne L-Threonin-Konzentration noch weiter gesteigert werden würde. Bei dem Versuch den zellinternen K_m für den L-Lysin-Exporter LysE über die Veränderung der Effluxrate über die Zeit bei einer bestimmten Anfangskonzentration zu bestimmen, wurde ein Wert von 24 mM abgeschätzt (Broer und Krämer, 1991). Dies könnte auch für den L-Threonin-Exporter der Fall sein, wobei der hohe K_m den physiologischen Bedürfnissen entspräche, da kein aus Glukose gebildetes L-Threonin ausgeschieden werden sollte.

Da die intrazelluläre Konzentration von L-Threonin der limitierende Faktor in diesen Untersuchungen war (Abb. 15), wurde zusätzlich ein Experiment mit L-Threonin-Pentapeptid durchgeführt, bei dem der Stamm mit dem bislang effizientesten Exporter RhtC eingesetzt wurde. Der Hintergrund für die Verwendung des Pentapeptids war ferner, dass Doeven et al. (2005) nachwiesen, dass Pentapeptide effektiv in zahlreichen Prokaryoten aufgenommen und verstoffwechselt werden. Mit dem Stamm *C. glutamicum* DM 1800 wurde allerdings nur eine maximale, interne Konzentration von 40 mM detektiert (Daten nicht gezeigt). Obwohl *C. glutamicum* verschiedene Peptid-Aufnahmesysteme besitzen soll (Winnen et al., 2005) konnte durch Verwendung von L-Threonin-Pentapeptiden keine höhere interne L-Threonin-

Konzentration, um die Sättigung des Transporters zu erreichen, erzielt werden. Es ist denkbar, dass entweder der erste Schritt, die Aufnahme, oder der zweite Schritt, die Hydrolyse des Pentapeptids, langsamer ablaufen als beim Tripeptid und somit keine höheren internen Konzentrationen erzielt werden können.

Durch das Pentapeptid wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden ein linearer Anstieg der extrazellulären Threonin Konzentration bestimmt (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde für *C. glutamicum* DM1800 eine Exportrate von $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ berechnet, und für *C. glutamicum* DM1800 pEKEEx2 *rhtC* mit dem heterologen Transporter eine Exportrate von $6,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$.

Die bisherigen Untersuchungen mit den Stämmen *C. glutamicum* DM 368-3, *C. glutamicum* DM1730-T und *C. glutamicum* DM1800-T zeigten, dass im Gegensatz zu RhtC der Transporter RhtA ein breiteres Substratspektrum besitzt. Deshalb wurde auch die Spezifität der Transporter in dem Peptidsystem untersucht. Dazu wurden vergleichbare Experimente zu den oben beschriebenen mit L-Serin-Tripeptid durchgeführt. Auffallend war, dass gegenüber L-Threonin mit L-Serin deutlich geringere interne Konzentrationen erreicht werden konnten (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird L-Serin über die Serinhydroxymethyltransferase und die Serin-Dehydratase stärker verstoffwechselt als L-Threonin (Netzer et al., 2004). Die maximalen internen L-Serin-Konzentrationen betragen 30 mM sowohl in der Kontrolle als auch in dem *rhtC* exprimierenden Stamm. In dem *rhtA* exprimierenden Stamm war eine Konzentration von maximal 15 mM nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

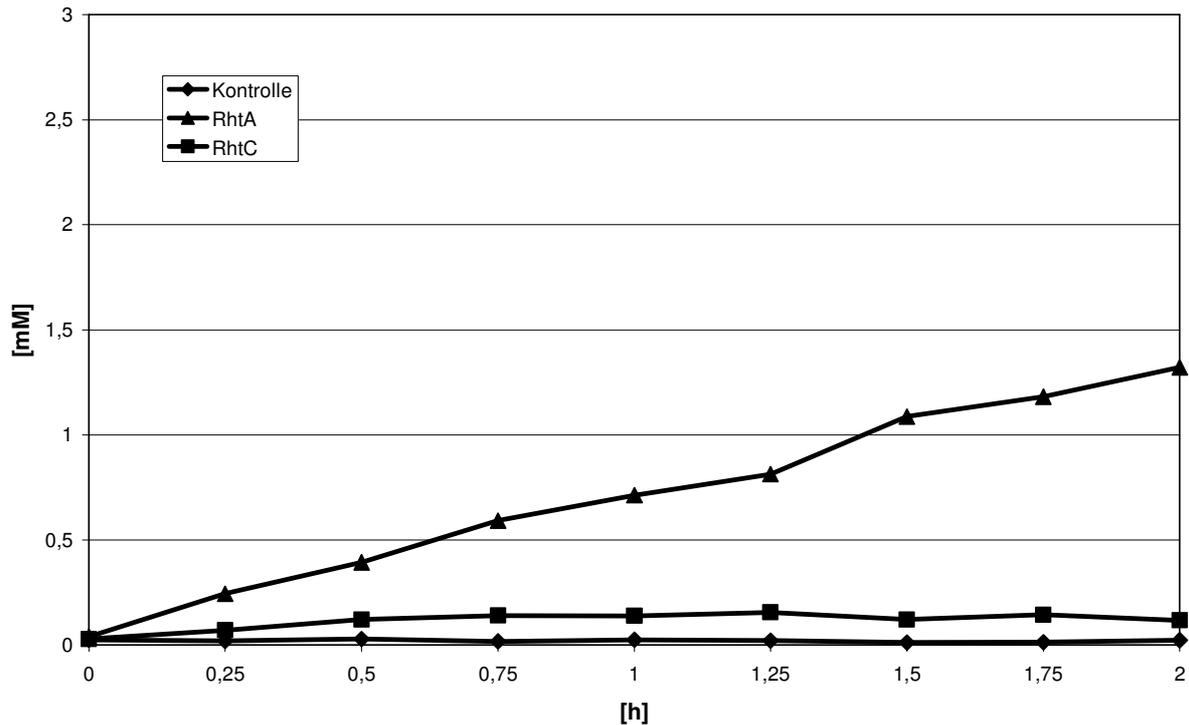


Abbildung 17: Externe L-Serin-Konzentration in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800, der zusätzlich pEKEx2, pEKEx2 *rhtA* oder pEKEx2 *rhtC* enthielt. Die Inkubation erfolgte in CgXII mit 4% Glukose und 1 mM L-Serin-Tripeptid.

Entsprechend der geringeren internen L-Serin-Konzentration wurde in dem RhtA exprimierenden Stamm eine über den gesamten Versuchszeitraum konstante Zunahme der externen L-Serin-Konzentration gemessen (Abbildung 17), aus der eine Exportrate von $5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ bestimmt wurde. Schlussfolgernd kann die Aussage getroffen werden, dass der Transporter RhtA ein breites Substratspektrum besitzt, denn neben L-Threonin und dem bekannten Export von Homoserin (Zakataeva et al., 1999) konnte gezeigt werden, dass RhtA auch den Export von L-Serin katalysiert. Dabei exportiert der Transporter RhtA L-Serin fast genauso effektiv wie L-Threonin. Im Gegensatz dazu zeigten die bisherigen Untersuchungen, dass RhtC spezifisch L-Threonin transportiert.

2.5. Transkriptquantifizierung unter Produktbildungsbedingungen

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der L-Threonin-Bildung zu bekommen wurden sowohl von den Stämmen *C. glutamicum* DM1800-T pEKE2, *C. glutamicum* DM1800-T pEKE2 *rhtA*, *C. glutamicum* DM1800-T pEKE2 *rhtC* als auch von dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 die Transkriptmengen der für die L-Threonin-Produktion relevanten Gene untersucht. Die Verhältnisse der Transkriptmengen wurden dabei in Bezug

zum Referenzgen *ddh* gesetzt (Abbildung 18). Von verschiedenen Genen hatte sich dieses als das am besten geeignete Referenzgen erwiesen (Diesveld, 2005). Als Standard zu dem jeweiligen Gen wurden in getrennten Ansätzen zuvor PCR-Amplifikate dieser Gene generiert und in definierten Konzentrationen zur Erstellung einer Eichgeraden mittels RT-PCR eingesetzt. Die Experimente basierten auf zwei unabhängigen, den Versuchen von Ergebnisse 2.3. entsprechenden Kultivierungen und anschließenden RNA Präparationen.

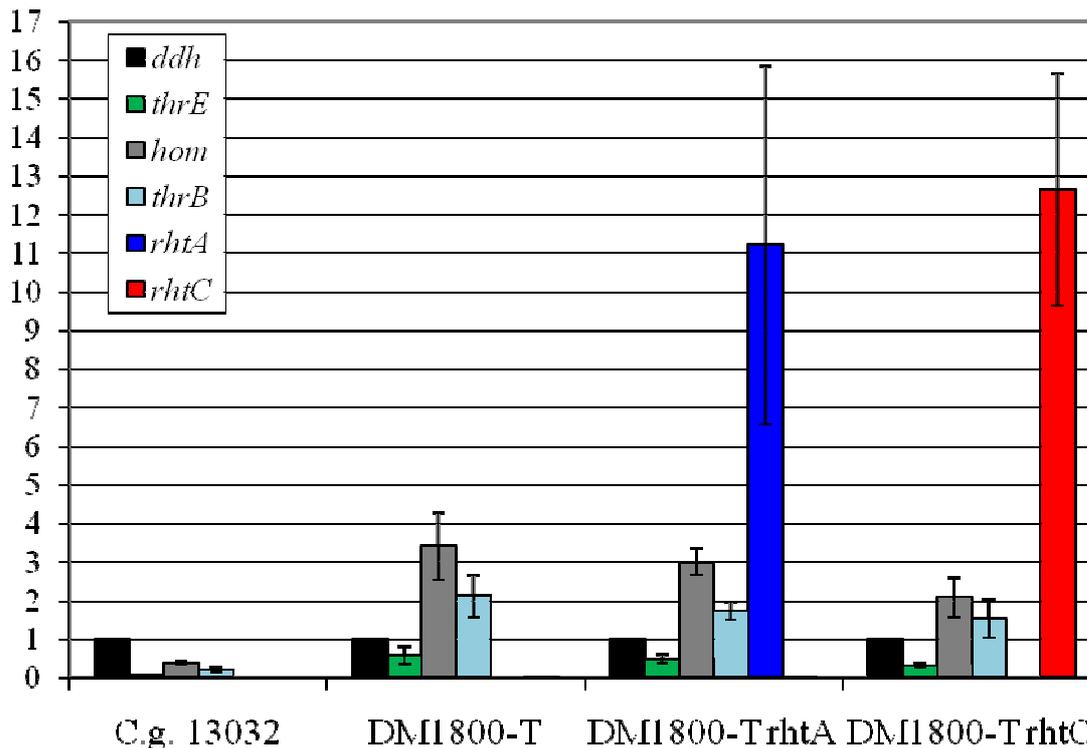


Abbildung 18: Transkriptquantifizierung der an der L-Threonin-Akkumulation beteiligten Gene aus *C. glutamicum* DM1800-T Stämmen mit Expression der heterologen Transporter *rhtA* oder *rhtC* unter Produktbildungsbedingungen. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem Leerplasmid pEKEEx2 (DM1800-T) und der Wildtyp (*C. glutamicum* ATCC13032) untersucht. Die Konzentration der jeweiligen Transkripte wurde auf die Konzentration von *ddh* bezogen.

Die Transkripte aller untersuchten Gene waren im Wildtyp gut quantifizierbar, wobei das Referenzgen *ddh* am stärksten transkribiert wurde. Verglichen zu *ddh* wurde *thrE* 13-fach schwächer, *hom* 2,5-fach schwächer und *thrB* 4,5-fach schwächer transkribiert. Dabei war die Transkriptmenge von *thrB* niedriger als die von *hom*. Dies entsprach nicht den Erwartungen, da ausgehend von bisherigen Untersuchungen zwei Transkripte für das Operon *hom thrB* zu erwarten waren (Mateos et al., 1994). Zum einen wurde ein langes Transkript, das beide Gene beinhaltet, und zum Anderen ein kurzes Transkript, das ausschließlich für *thrB* kodiert, erwartet. Daher wurde eine höhere Transkriptmenge von *thrB* im Vergleich zu *hom* erwartet.

Daten von Affimetrix Microarrays der Firma Evonic bestätigten jedoch, dass das *thrB* Transkript im Wildtyp und auch anderen Stämmen unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen etwa 3,4-fach geringer vorliegt als das *hom* Transkript. Möglicherweise ist in den Northern Blot-Analysen, in denen die zwei Transkripte nachgewiesen wurden (Mateos et al., 1994), ein spezifisches, kurzes *hom* Transkript nicht detektiert worden, da es auf Grund seiner mutmaßlichen Größe von ca. 1,5 kb durch die 16S rRNA überlagert wurde. Dies deutet auf spezifischere Regulation der Gene *hom thrB* hin als bisher angenommen wurde (Eikmanns et al., 1991).

Verglichen zum Wildtyp war in DM1800-T pEKEx2 durch Überexpression mittels des Plasmids pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* die Konzentration der Transkripte *hom*, *thrB* und *thrE* 10-fach erhöht. Auch in diesen Experimenten war die Konzentration von *hom* etwa 5-fach höher als *thrB*. Während die Gene *rhtA* und *rhtC* unter Kontrolle des *tac*-Promotors ohne Induktion durch IPTG circa 12-fach stärker transkribiert wurden als das Referenzgen *ddh*, wurde *hom* etwa 3-fach und *thrB* 2-fach stärker transkribiert. Trotz 10-fach höherer Transkriptmenge von *thrE* durch Überexpression war die Transkriptmenge 2-fach niedriger als die des Referenzgens *ddh*.

Trotz der 10-fach stärkeren Transkription des nativen Exporters *thrE* ist der Stamm *C. glutamicum* DM1800-T nicht in der Lage L-Threonin effektiv zu exportieren. Daher kann auf Grund der geringen Transkriptmengen des nativen Transporters *thrE* und der hohen Transkriptmenge der Gene *rhtA* und *rhtC* in dem jeweiligen Stamm aus den Experimenten geschlossen werden, dass ausschließlich die Expression der heterologen Transporter für die hohe L-Threonin-Akkumulation verantwortlich war. Dies wird auch völlig unabhängig davon durch die Fermentationsergebnisse der rekombinanten Stämme ohne Expression der heterologen Transporter in den Abschnitten 2.2. und 2.3. bestätigt, da nur bedingt durch die Bildung von RhtA bzw. RhtC die starke Produktbildung erfolgt.

2.6. Auswirkung von pEKEx2 *hom thrB rhtC* auf die L-Threonin-Akkumulation

Um bei eventuell zukünftigen Stammkonstruktionen nicht zwei Plasmide transformieren zu müssen, die für die L-Threonin-Synthesegene beziehungsweise *rhtC* kodieren, wurden verschiedene Plasmidkonstruktionen versucht. Dazu wurde zunächst versucht das Gen *thrE* über Restriktion aus dem Vektor pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* zu entfernen. Jedoch wurde mit den entsprechenden Ligationsprodukten weder mit *E. coli* noch mit *C. glutamicum* ein

entsprechend verkleinertes und intaktes Plasmid erhalten. Möglicherweise resultiert die Überexpression der Gene *hom-thrB* ohne gleichzeitige Überexpression des Gens *thrE* in einer hohen, toxischen Konzentration von L-Threonin im Zellinneren. Denn es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von *hom* und *hom-thrB* zu instabilen Plasmiden in *C. glutamicum* führt (Eggeling et al., 1997)

Daher wurde als weiterer Ansatz die Klonierung des Operons *hom^{fbr} thrB* in den Vektor pEKEx2 *rhtC* verfolgt. Sowohl die Gene der L-Threonin-Biosynthese, als auch das Gen des heterologen Transporters RhtC wären somit auf einem Plasmid lokalisiert, was die Transformation weiterer Stämme durch dieses Plasmid vereinfachen würde. Nach Transformation des Stammes *C. glutamicum* DM1800 durch das neu konstruierte Plasmid und anschließenden Kultivierungen zeigte der neu generierte Stamm ein vergleichbares Wachstumsverhalten zum Wildtyp sowohl im Voll- als auch im CgXII Minimalmedium mit 4% Glukose. Auffällig dabei war jedoch, dass die erreichte End-OD von *C. glutamicum* DM1800 pEKEx2 *hom^{fbr} thrB rhtC* mit OD = 45 gegenüber *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtC* mit OD = 32 deutlich erhöht war. Von Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase dieser Kultivierung wurde die RNA präpariert, um die Eignung des neu hergestellten Vektor pEKEx2 *hom^{fbr} thrB rhtC* über die Quantifizierung der Transkripte zu bestimmen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Transkriptquantifizierung der Gene *hom^{fbr}*, *thrB*, *rhtC*, *thrE* und *ddh* aus dem Stamm *C. g.* DM1800, der verschiedene Vektoren enthält. Als Kontrolle wurde der Stamm ohne Vektor verwendet. Die Faktoren der mRNA-Transkriptmenge sind in Bezug auf das Referenzgen *ddh* angegeben, wobei n. d. für nicht detektiert steht.

Vektor	Gene				Referenzgen
	<i>hom</i>	<i>thrB</i>	<i>rhtC</i>	<i>thrE</i>	<i>ddh</i>
-	0,39	0,22	n.d.	0,08	1
pEC-T18 <i>hom^{fbr} thrB thrE</i> pEKEx2 <i>rhtC</i>	2,1	1,5	12,6	0,33	1
pEKEx2 <i>hom^{fbr} thrB rhtC</i>	9,1	9	46,6	0,06	1

Mit dem neu konstruierten Vektor pEKEx2 *hom^{fbr} thrB rhtC* in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800 wurden deutlich höhere Transkriptmengen gebildet als in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtC* mit den zwei Plasmiden (Tab. 13). Sowohl das Operon *hom^{fbr} thrB* als auch das Gen des heterologen Transporters *rhtC* wurden in dem

Stamm mit dem neuen Vektor pEKEx2 *hom^{fbr} thrB rhtC* etwa vier- bis fünffach stärker transkribiert als in dem Stamm mit den beiden Vektoren pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE* und pEKEx2 *rhtC*. Der Transkriptlevel von *thrE* war erwartungsgemäß unbeeinflusst im Stamm mit dem Neukonstrukt.

Mit DM1800 pEKEx2 *hom^{fbr} thrB rhtC* wurden Fermentationen im direkten Vergleich mit DM1800-T pEKEx2 *rhtC* durchgeführt. Wider Erwarten wurden nach 48 h mit dem Neukonstrukt nur 20 mM L-Threonin im Kultivierungsüberstand gemessen, verglichen zu 45 mM L-Threonin, die beim Vergleichsstamm *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtC* akkumulierten. Auffällig an diesem Befund war, dass kein L-Lysin im Überstand gefunden wurde, was auf eine vollständige Umlenkung des Stoffwechselflusses von L-Lysin in Richtung L-Threonin schließen ließ. Da auch kein Glycin detektiert wurde, kann interne Akkumulation und anschließender Abbau von L-Threonin ausgeschlossen werden. Da dieser Stamm deutlich höhere OD-Werte erreicht, fließt offensichtlich mehr C-Quelle in die Biomasse verglichen zu dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtC*. Auch wenn bisher nicht erklärt werden kann warum deutlich mehr C-Quelle in die Biomasse floss und dadurch eine geringere Ausbeute erzielt wurde, zeigen die Experimente, dass offensichtlich eine Ausbalancierung der L-Threoninsynthese und dessen Export mit dem Gesamtstoffwechsel nötig ist, die möglicherweise bei der mit pEKEx2 *hom^{fbr} thrB rhtC* erreichten sehr hohen Expression nicht gegeben ist.

2.7. Einführung chromosomaler Mutationen in *ilvA* (Threonin-Dehydratase)

Da es sich bei L-Threonin nicht um eine Aminosäure am Ende eines Syntheseweges handelt, sondern um die Vorstufe von L-Isoleucin, wurde versucht eine erhöhte Akkumulation durch Reduktion der weiteren Umwandlung zu L-Isoleucin zu erreichen, wie es auch für die L-Threoninbildung mit *E. coli* bekannt ist (Debabov 2003). Auch für L-Serin, das zu Glycin durch die Serinhydroxymethyltransferase und zu Pyruvat durch die Serin-Dehydratase weiterverstoffwechselt wird, wurde in *C. glutamicum* bereits gezeigt, dass eine Reduktion der Weiterverstoffwechslung die verstärkte Akkumulation von L-Serin zur Folge hat (Stolz et al., 2006). Durch Mutation der Threonin-Dehydratase in einem *E. coli* L-Threonin-Produktionsstamm konnte bereits die L-Threonin-Akkumulation deutlich gesteigert werden (Debabov, 2003). Da aber die Deletion des für die Threonin-Dehydratase kodierenden Gens *ilvA* eine L-Isoleucin-Auxotrophie zur Folge gehabt hätte, wurde das Gen *ilvA* über gerichtete

Mutagenese zur Generierung verschiedener Threonin-Dehydratasen mit stark verringerter Aktivität mutiert. Die in das Gen *ilvA* eingebrachten Mutationen basierten auf einer Auswahl von Veränderungen, die durch Möckel et al. (1994) beschrieben wurden. Dazu wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit spezifischen Oligonukleotiden *ilvA* plasmidkodiert verändert und durch doppelte Rekombination mit dem Vektor pK19 *mob sacB* in das Chromosom eingebracht. Dies wurde durch Sequenzierung des chromosomalen Abschnittes nach vorhergegangener PCR bestätigt.

Nachdem die Mutationen *ilvA*^{A257G}, *ilvA*^{I328N}, *ilvA*^{S418D}, *ilvA*^{G96D}, *ilvA*^{G331L} und *ilvA*^{Q27Stop} in das Genom von *C. glutamicum* DM1800 eingebracht worden waren, zeigten anschließende Wachstumsexperimente in CgXII mit 4% Glukose, dass die generierten Stämme in zwei Gruppen unterteilt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Der eine Teil der neu generierten Stämme wuchs vergleichbar zu *C. glutamicum* DM1800, der andere Teil war auxotroph und musste durch L-Isoleucin-Zugabe supplementiert werden. Dabei konnte mit steigender L-Isoleucin-Konzentration das Wachstum graduell wiederhergestellt werden und mit 0,5 mM und 1 mM L-Isoleucin ein Wachstum vergleichbar zum Kontrollstamm *C. glutamicum* DM1800 erzielt werden.

Tabelle 14: Spezifische Aktivität der durch gerichtete Mutagenese generierten Threonin-Dehydratasen in *C. glutamicum* DM1800. Als Kontrolle wurden *C. glutamicum* SM13 pEK *hom*^{FBR} *thrB* pECM3 *ilvA* (Überexpression) und *C. glutamicum* DM1800 verwendet. Die Kodierungen geben jeweils den durch die Punktmutation in *ilvA* erreichten Aminosäureaustausch an.

Aminosäureaustausch im Gen <i>ilvA</i>	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$]
Überexpression	0,527
<i>C. g.</i> DM1800	0,032
A257G	0,024
I328N	0,027
S418D	0,016
G96D	0,009
G331L	0,013
Q27Stop	0,008

In Tabelle 14 sind die ermittelten Enzymaktivitäten der generierten Mutanten aufgelistet. Verglichen zu dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* DM1800 resultierten die eingebrachten Mutationen auf der einen Seite in Stämmen mit geringerer Enzymaktivität (*ilvA*^{A257G}, *ilvA*^{I328N}, *ilvA*^{S418D}) und auf der anderen Seite in Mutationen (*ilvA*^{G96D}, *ilvA*^{G331L}), die

vergleichbare Enzymaktivitäten wie die Negativkontrolle *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{Q27Stop} aufwiesen. Diese Negativkontrolle ergab im Test noch eine sehr geringe Aktivität. Wie die Wachstumstests aber ergaben (Daten nicht gezeigt), führte sowohl die Mutation *ilvA*^{G96D}, als auch *ilvA*^{G331L} zur L-Isoleucin-Auxotrophie der Stämme, sodass diese Restaktivität keiner Threonin-Dehydratase Aktivität entspricht.

Entsprechend den Erwartungen, dass die Reduktion des L-Threonin-Umsatzes zu einer gesteigerten Akkumulation führt, wurde aus den beiden erzeugten Gruppen der Stamm *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{S416D} mit mittlerer Aktivität und der auxotrophe Stamm *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{G96D} ausgewählt und mit den Plasmiden pEC-T18 *hom*^{fbr} *thrB thrE* und pEKEx2 *rhtC* transformiert.

Die Supplementation von 1 mM L-Isoleucin resultierte bei dem Stamm *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{G96D}-T in einem identischen Wachstumsverhalten verglichen zu dem Ausgangsstamm (Daten nicht gezeigt). Die Wachstumsrate des *rhtC* exprimierenden Stammes war mit $\mu=0,19 \text{ h}^{-1}$ deutlich niedriger als die der Kontrolle mit $\mu=0,24 \text{ h}^{-1}$. Wie bereits mit dem Ausgangsstamm ohne *ilvA* Mutation (*C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 *rhtC*) wurde auch in diesem Fall beobachtet, dass die Expression des heterologen Transporters *rhtC* das Wachstum negativ beeinflusste. Bereits durch Zugabe von 0,5 mM L-Isoleucin konnte der auxotrophe Stamm *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{G96D}-T wieder wachsen. Jedoch resultierte die niedrigere L-Isoleucin-Konzentration in einer niedrigeren Wachstumsrate ($\mu=0,2 \text{ h}^{-1}$), weshalb dieser Stamm zur Vergleichbarkeit in folgenden Kultivierungen durch Zugabe von 1 mM L-Isoleucin supplementiert wurde. Ohne Expression des Transporters wirkte sich die Reduktion des L-Threonin-Abbaus bereits positiv auf die L-Threonin-Akkumulation aus. Der auxotrophe Stamm akkumulierte 35 mM, der Stamm mit mittlerer Aktivität 25 mM verglichen zu 20 mM L-Threonin, die die Kontrolle im Medium nach 48 h akkumulierte.

In der weiteren Arbeit wird die folgenden Bezeichnung für die Stämme gewählt: *C. glutamicum* DM1800-96 für den Stamm *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{G96D} und *C. glutamicum* DM1800-416 für den Stamm *C. glutamicum* DM1800 *ilvA*^{S416D}.

2.8. Produktbildung und Produktbildungsraten mit den konstruierten Stämmen

Nach Generierung der *C. glutamicum* Stämme DM1800-T, DM1800-96-T und DM1800-416-T durch Transformation der Plasmide pEC-T18 *hom*^{fbr} *thrB thrE* und pEKEx2 bzw. pEKEx2 *rhtC* wurde eine Fermentation über 48 Stunden mit Probennahme in Abständen von

etwa 3 Stunden durchgeführt um anhand der erhaltenen Daten Produktionsraten berechnen zu können.

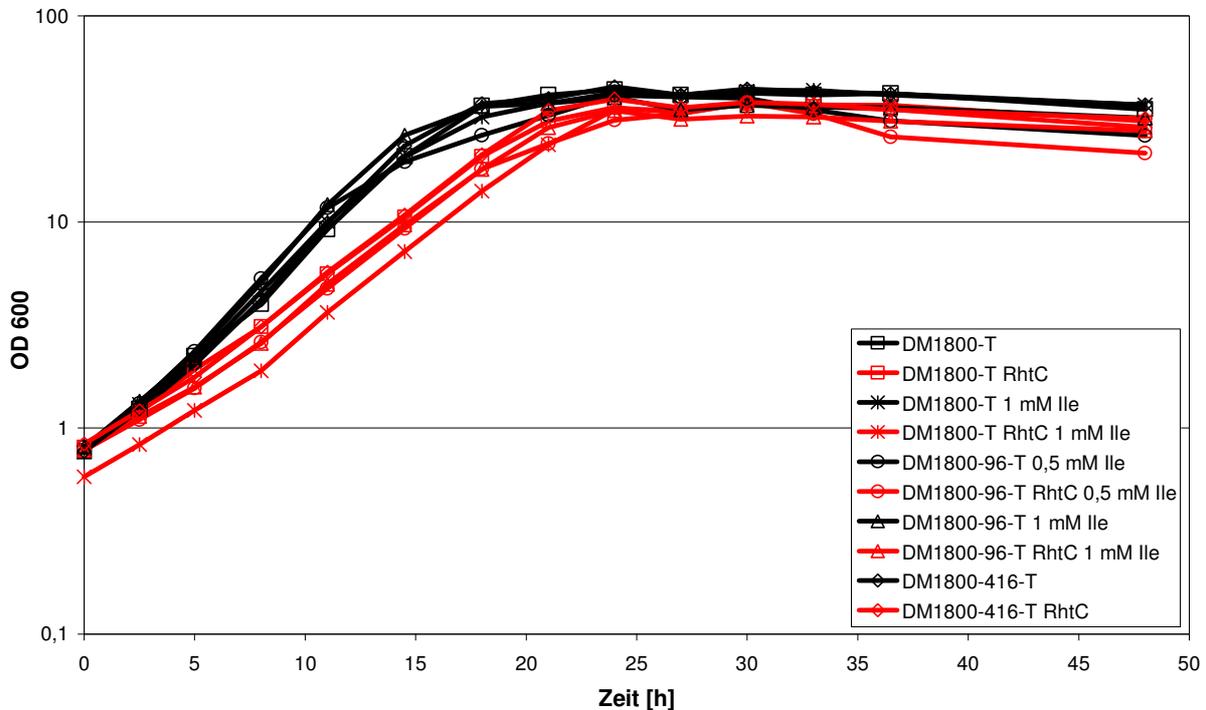


Abbildung 19: Wachstum von DM1800-T und seiner Derivate DM1800-96-T und DM1800-416-T in CgXII, 4% Glukose. Die einzelnen Stämme enthielten zusätzlich pEKEx2 *rhtC* oder pEKEx2. Die Stämme wurde durch Zugabe von 0 mM, 0,5 mM oder 1 mM Isoleucin entsprechend der Legende supplementiert.

Bei Betrachtung des Wachstums der Stämme *C. glutamicum* DM1800-T und der Derivate *C. glutamicum* DM1800-96-T und *C. glutamicum* DM1800-416-T zeigte sich, dass die Expression von *rhtC* (rote Graphen) das Wachstum gegenüber dem jeweiligen Kontrollstamm mit Leerplasmid (schwarze Graphen) negativ beeinflusste (Abb. 19). Dies könnte auf die verstärkte Bildung des Transporters, den Einbau in die Zellmembran und eine damit einhergehende Destabilisierung der Zellmembran zurückgeführt werden (Wagner et al., 2008). Auch ein zu starker L-Threonin-Export und eine daraus resultierende, zellinterne Limitation von L-Threonin wären denkbar.

Da der Stamm *C. glutamicum* DM1800-96-T L-Isoleucin auxotroph ist, wurde die Konzentration von 0,5 mM bzw. 1 mM L-Isoleucin gewählt um etwa vergleichbares Wachstum zum Ausgangsstamm *C. glutamicum* DM1800-T zu ermöglichen.

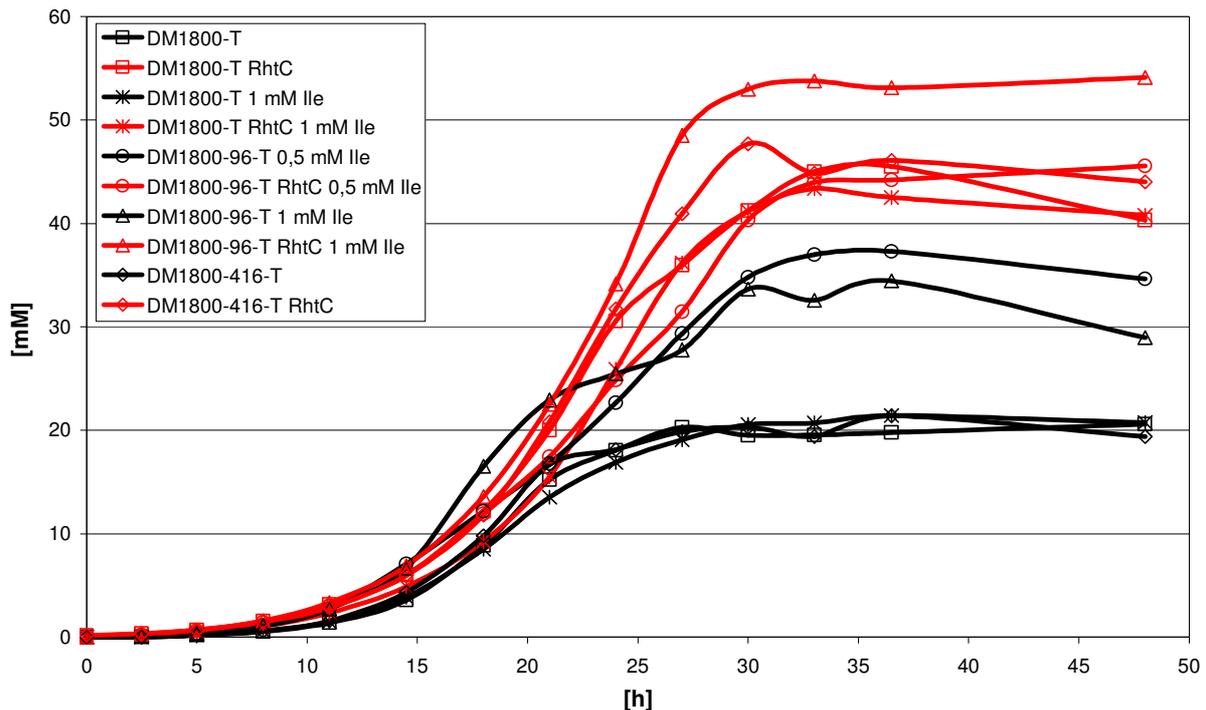


Abbildung 20: L-Threonin-Akkumulation von DM1800-T und seiner Derivate DM1800-96-T und DM1800-416-T in CgXII, 4% Glukose. Die einzelnen Stämme enthielten zusätzlich pEKEx2 *rhtC* oder pEKEx2. Die Stämme wurde durch Zugabe von 0 mM, 0,5 mM oder 1 mM Isoleucin entsprechend der Legende supplementiert.

Ohne Expression des Transporters *rhtC* wirkte sich die Verhinderung der Weiterstoffwechselung des L-Threonins im Stamm DM1800-96-T bereits positiv auf die L-Threonin-Akkumulation aus (Abb. 20). Allein durch die *ilvA*^{G96D} Mutation wurde die Akkumulation auf maximal 38 mM gesteigert. Dagegen konnte durch die Mutation *ilvA*^{S418D}, die zwar zu verringerter Threonin-Dehydratase-Aktivität aber nicht zu erkennbarem Wachstumsnachteil führt, kein Effekt beobachtet werden. Durch zusätzliche Expression des Transporters *rhtC* wurde eine Steigerung der L-Threonin-Akkumulation auf maximal 45 mM im Ausgangsstamm erreicht. Wurde allerdings die Expression des Transporters *rhtC* mit der Mutation *ilvA*^{G96D} kombiniert, so ergab dies eine Steigerung um 20% auf die maximale Akkumulation von 55 mM L-Threonin (Abb. 20).

Auf Grund der Probennahme in engen Zeitabständen war es möglich über eine Kurvenanpassung die L-Threonin-Akkumulationsrate zu bestimmen. Dazu wurden zunächst die Messdaten des Wachstums und der Produktbildung als mathematische Kurve beschrieben und dabei Daten zwischen den einzelnen Messpunkten generiert. Solch eine Anpassung ist für *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC bezüglich des Wachstums und der L-Threonin-Akkumulation in Abbildung 21 dargestellt.

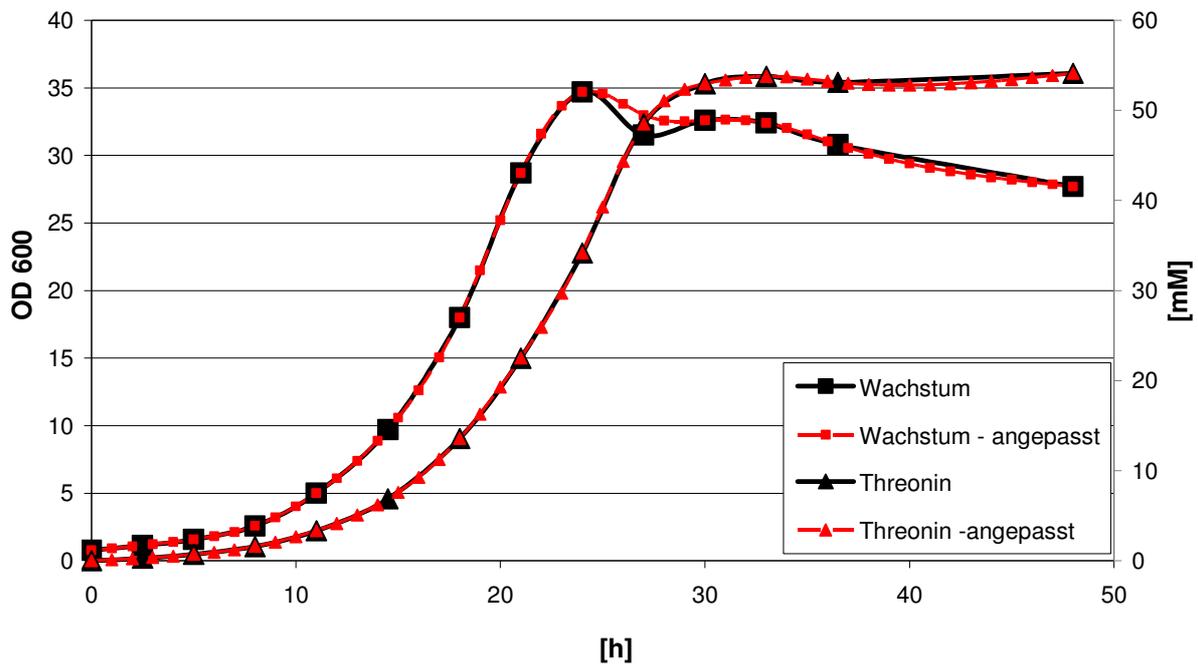


Abbildung 21: Wachstum (■) und L-Threonin-Akkumulation (▲) des Stamms *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC in CgXII, 4% Glukose und 1 mM L-Isoleucin Supplementation. Zusätzlich wurden mittels eines Algorithmus Daten zwischen den Messpunkten für Wachstum (■) und Akkumulation (▲) generiert.

Wie ersichtlich war eine hervorragende Anpassung möglich, da die generierten Daten für Wachstum und Akkumulation nahezu deckungsgleich mit den gemessenen Daten des Wachstums und der Akkumulation in der exponentiellen Phase waren und auch in der stationären Phase die Messdaten gut dargestellt werden konnten. Entsprechende Berechnungen wurden für alle Stämme durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Anpassungen ermöglichten es die Produktbildungsdaten für alle Stämme zu bestimmen, was für die ersten 30 Stunden in der Abbildung 22 gezeigt ist.

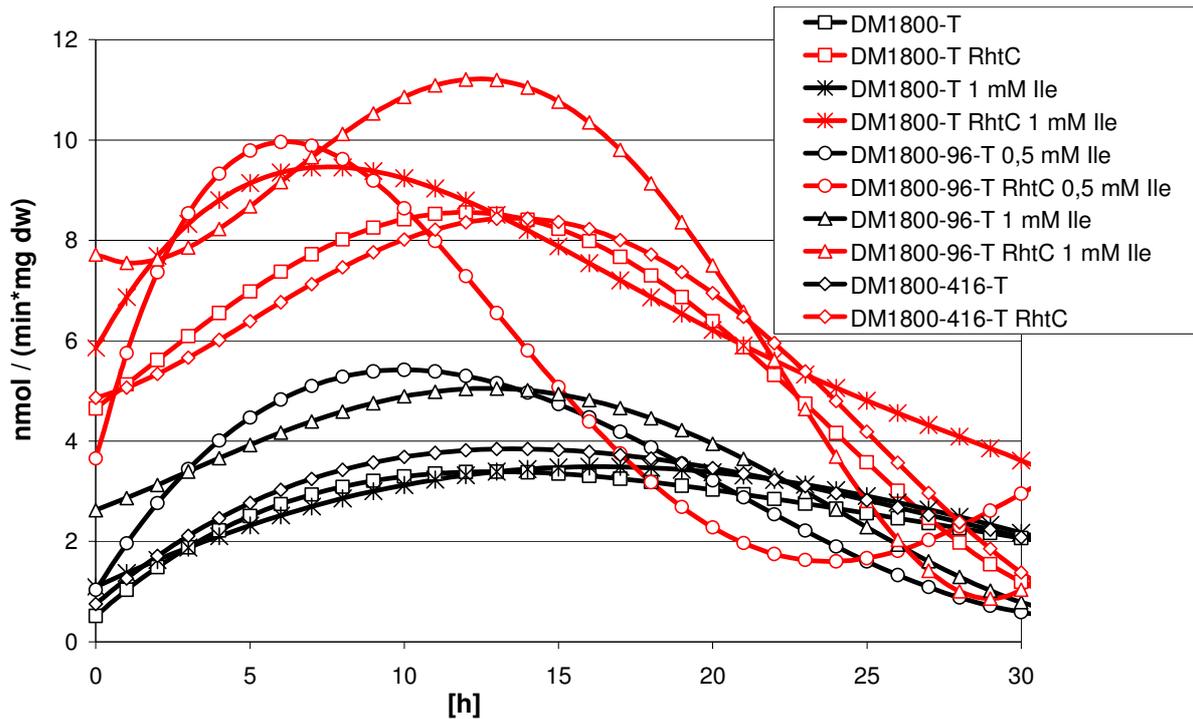


Abbildung 22: L-Threonin-Akkumulationsrate von DM1800-T und seiner Derivate DM1800-96-T und DM1800-416-T in CgXII, 4% Glukose bei 0, 0,5 oder 1 mM L-Isoleucin Supplementation. Die einzelnen Stämme enthielten zusätzlich pEKEx2 *rhtC* (rote Graphen) oder pEKEx2 (schwarze Graphen).

Ohne Expression des Transporters *rhtC* (schwarze Graphen) wirkte sich die Verhinderung der Weiterverstoffwechslung von L-Threonin im Stamm DM1800-96-T wie zu erwarten auch positiv auf die L-Threonin-Akkumulationsrate aus (Abb. 22). Während die Mutation *ilvA*^{S418D} verglichen mit dem Ausgangsstamm nur zu einer minimalen Steigerung führte, war durch die Mutation *ilvA*^{G96D} eine Steigerung von $3,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ im Referenzstamm auf $5,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ festzustellen. Verglichen mit den Leerplasmid enthaltenden Stämmen resultierte die Expression von *rhtC* (rote Graphen) in einer deutlichen Steigerung der Threonin-Akkumulationsrate (Abb.22). Während bei dem Referenzstamm DM1800-T eine Steigerung von $3,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ auf $8,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ erfolgte, erhöhte sich die Akkumulationsrate in dem Stamm DM1800-96-T von $5,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ auf die maximale Threonin-Akkumulationsrate von $11,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Reduktion des L-Threonin-Abbaus zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität führt. Dabei ist auffallend, dass bei allen Stämmen eine Kopplung der Produktivität an die exponentielle Phase zu beobachten war.

2.9. Flussanalysen und chromosomale Mutationen in den Genen *gltA* und *pyc*

Die Reduktion der L-Threonin-Verstoffwechslung führte zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität und auch unter diesen Bedingungen wurde bei Expression des heterologen Transporters *rhtC* kein Glycin im Medium akkumuliert. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass durch Expression von *rhtC* der Export immer noch nicht limitierend ist. Zur weiteren Steigerung der L-Threonin-Akkumulation sollte deswegen die Vorstufen-Bereitstellung verbessert werden. Daher wurde als weiterer Schritt der Stamm *C. glutamicum* DM1730 *mgo*^{red} *2xlysC* mit in die Untersuchungen einbezogen. Ausgehend von dem Stamm *C. glutamicum* DM1730 trägt dieser Stamm zwei weitere Mutationen (Abb. 9). Zum Einen wurde eine zweite Kopie des für die Feedback-resistente Aspartatkinase kodierenden Gens *lysC* in das Genom integriert (Cremer et al., 1991). Zum Anderen resultierte die Mutation des Gens *mgo* in einer reduzierten Aktivität der Malatquinon-Oxidoreduktase, von der bereits gezeigt wurde, dass die Inaktivierung in einem L-Lysin-Produktionsstamm zu einer 18% gesteigerten Ausbeute führen kann (Mitsuhashi et al., 2006). Dieser Stamm hat eine gesteigerte L-Lysin-Ausbeute verglichen mit dem Stamm *C. glutamicum* DM1800 und es sollte geprüft werden, ob durch Umlenken des Stoffwechselflusses in Richtung L-Threonin auch die L-Threonin-Akkumulation deutlich gesteigert werden kann. In einem weiteren Ansatz zur Verbesserung der Vorstufen-Bereitstellung wurde die Reduktion des Stoffwechselflusses über den Citrat-Zyklus durch Veränderung der Citrat-Synthase Aktivität angestrebt (Radmacher et al., 2007) und durch chromosomale Überexpression des für die Pyruvatcarboxylase kodierenden Gens *pyc* sollte eine verstärkte Oxalacetat-Bereitstellung erfolgen (Riedel et al., 2001).

Um Vorhersagen bezüglich der geplanten chromosomalen Veränderung der Gene *gltA* und *pyc* und die daraus resultierende Enzymaktivität der Citrat-Synthase und der Pyruvatcarboxylase treffen zu können, wurden zuvor mit Unterstützung von S. Noack (IBT2) Stofffluss-Analysen *in silico* basierend auf dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-T durchgeführt (Abbildung 23).

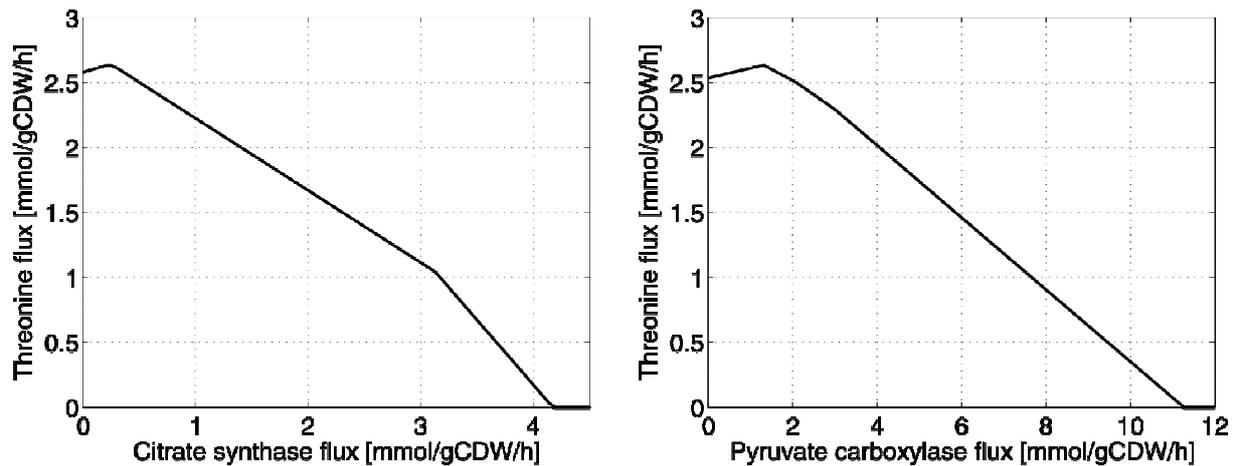


Abbildung 23: Robustheitsanalyse für *C. glutamicum* DM1800-T RhtC. Die berechneten L-Threonin-Produktionsraten in Abhängigkeit zu der Citrat-Synthase- bzw. Pyruvat-Carboxylase-Aktivität stellen theoretische Maximalwerte unter nicht-wachsenden Bedingungen dar.

Unter Nutzung eines Netzwerkmodells für *C. glutamicum*, welches die Reaktionen des Zentralstoffwechsels sowie aller Aminosäure-Biosynthesewege enthält, wurde eine stationäre Stoffflussanalyse für den Stamm *C. glutamicum* DM1800-T RhtC durchgeführt. Mithilfe der experimentellen Daten aus einem Schüttelkolbenversuch wurden zunächst die extrazellulären Flüsse sowie die Wachstumsrate geschätzt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Annahme metabolischer Stationarität ist mit dieser Methode ausschließlich der exponentielle Wachstumsbereich beschreibbar.

Um den Einfluss der Reaktionen Citratsynthase (CS) und Pyruvat-Carboxylase (PC) auf die L-Threonin-Produktion in *C. glutamicum* DM1800-T RhtC zu untersuchen, wurde eine Robustheitsanalyse durchgeführt. Die Glukose-Aufnahmerate wurde dabei auf den geschätzten Wert von $v_{\text{Glc}}=2.08 \text{ mmol g TG}^{-1} \text{ h}^{-1}$ fixiert (Marx et al., 1999). Mithilfe eines linearen Programmierungsansatzes wurden mittels Optimierung unter jeweils variierendem Kontrollfluss (jeweils CS oder PC variiert) die maximalen L-Threonin-Produktionsraten berechnet (Abb. 23).

Generell ist zu erkennen, dass eine Reduktion des CS-Flusses eine positive Wirkung auf die L-Threonin-Bildung hat. Ursache hierfür ist die damit verbundene Reduzierung des TCA-Flusses, wodurch zum einen weniger Kohlenstoff in Form von CO_2 verloren geht und zum anderen mehr Kohlenstoff über Oxalacetat in Richtung L-Threonin geleitet wird. Für den PC-Fluss ist nur der Bereich bis ca. $1.0 \text{ mmol g TG}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (<50% von v_{Glc}) relevant, wobei hier kein nennenswerter Einfluss auf die L-Threonin-Bildung beobachtet wird.

Experimentelle Untersuchungen bezüglich gesteigerter Pyruvat-Carboxylase-Aktivität hatten aber gezeigt, dass dies zu gesteigerter Ausbeute führt (Riedel et al., 2001). Da ferner eine graduelle Promotorabstufung äußerst aufwendig ist, wurde, um eine verstärkte Transkription des Gens *pyc* zu erreichen, dessen nativer Promotor durch den starken *glyA*-Promotor ausgetauscht. Bereits in RT-PCR Analysen (Diesveld 2005) und in CAT-Assays zur Detektion von Promoterstärken (Stolz et al., 2007) konnte die starke Transkription durch den *glyA*-Promotor nachgewiesen werden. Dazu wurde der *glyA*-Promotor mit flankierenden Bereichen des *pyc*-Promotors in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert und anschließend mittels zweifacher homologer Rekombination des konstruierten Vektors pK19*mobsacB* P_{*pyc*} ins Genom integriert. Derartige Mutanten des Stammes *C. glutamicum* DM1800 werden im Folgenden durch die Erweiterung „-PC“ gekennzeichnet. Die nach Stofffluss-Analyse aussichtsreiche, reduzierte Citratsynthase-Aktivität zur Steigerung der Threonin-Ausbeute wurde durch Deletion eines der zwei Citratsynthase-Promotoren mithilfe von pK19*mobsacB* P_{*gltA*} Δ160 erreicht (Radmacher et al., 2007). Derartige Mutanten werden im Folgenden durch die Erweiterung „-CS“ gekennzeichnet. Die neu generierten Stämme wurden durch die Plasmide pEC-T18 *hom*^{fbr} *thrB thrE* und pEKEx2 *rhtC* transformiert und bezüglich der L-Threonin-Akkumulation untersucht. Stämme, die durch das Plasmid pEC-T18 *hom*^{fbr} *thrB thrE* transformiert wurden, werden im Folgenden durch die Namensweiterung „-T“, die diejenigen die mit pEKEx2 *rhtC* transformiert wurden durch die Namensweiterung „RhtC“ gekennzeichnet.

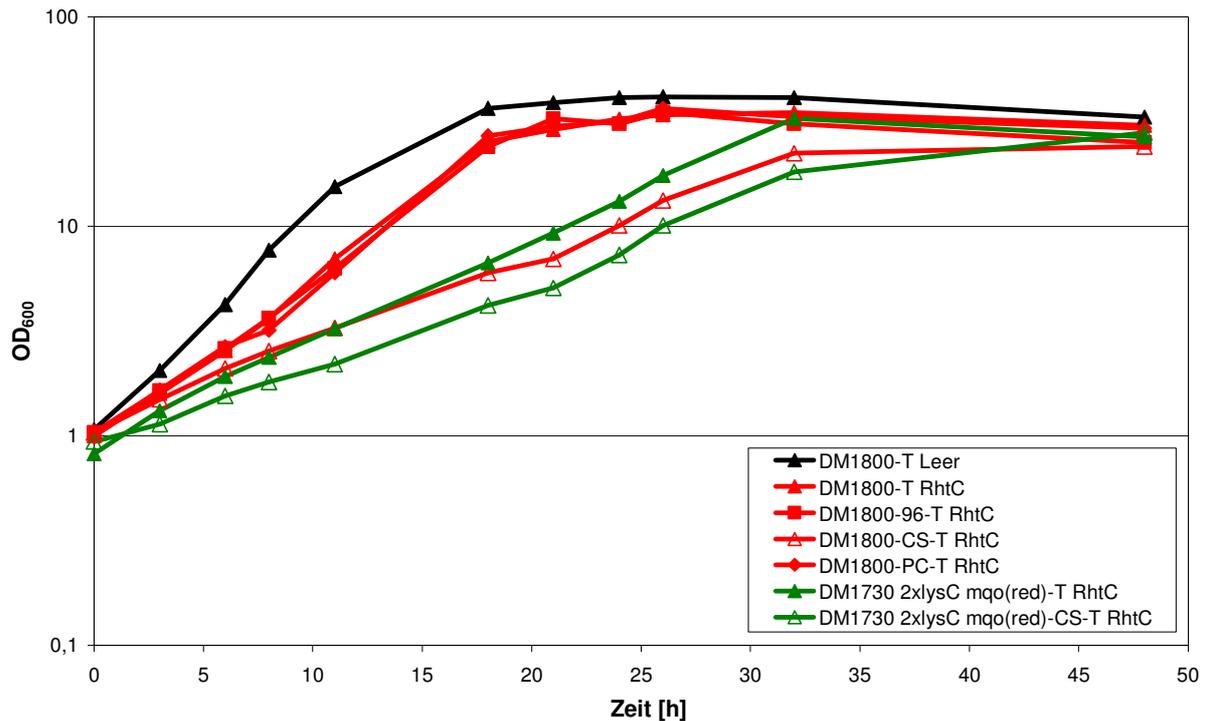


Abbildung 24: Wachstum von DM1800-T, DM1800-T RhtC und seiner Derivate DM1800-96-T RhtC, DM1800-CS-T RhtC, DM1800-PC-T RhtC, DM1730 2xlysC mgo^{red}-T RhtC und seinem Derivat DM1730 2xlysC mgo^{red}-CS-T RhtC in CgXII, 4% Glukose. Als Kontrolle wurde DM1800-T pEKEx2 verwendet. Der Stamm DM1800-96-T RhtC wurde durch Zugabe von 1 mM L-Isoleucin supplementiert.

Der Kontrollstamm DM1800-T ohne Expression von *rhtC* wuchs mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,25 \text{ h}^{-1}$ deutlich schneller als alle anderen untersuchten Stämme (Abb. 24). Verglichen zu den anderen bereits untersuchten Stämmen *C. glutamicum* DM1800-T RhtC und *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC, zeigte die neu konstruierte Mutante *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,18 \text{ h}^{-1}$ keinen Unterschied im Wachstum. Im Gegensatz dazu führte die 160 bp Deletion im Bereich des *gltA* Promoters zu einem deutlich verlangsamten Wachstum. Der Stamm *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC wuchs mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ signifikant langsamer als *C. glutamicum* DM1800-T RhtC ($\mu=0,18 \text{ h}^{-1}$). Das schlechtere Wachstum durch die geringere Citrat-Synthase-Aktivität lässt auf eine deutliche Verschiebung des Stoffwechselflusses durch die geringere Citrat-Zyklus-Aktivität schließen (Radmacher et al., 2007).

Auch die zwei weiteren Mutationen des neu mit in die Untersuchungen einbezogenen Stammes *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mgo^{red}-T RhtC führten zu schlechterem Wachstum ($\mu=0,12 \text{ h}^{-1}$), was eine verstärkte L-Threonin-Synthese vermuten ließ. Das schlechteste Wachstum wurde aber für den Stamm *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mgo^{red}-CS-T RhtC

beobachtet, der in diesem Experiment mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,08 \text{ h}^{-1}$ erheblich langsamer wuchs als der Ausgangsstamm.

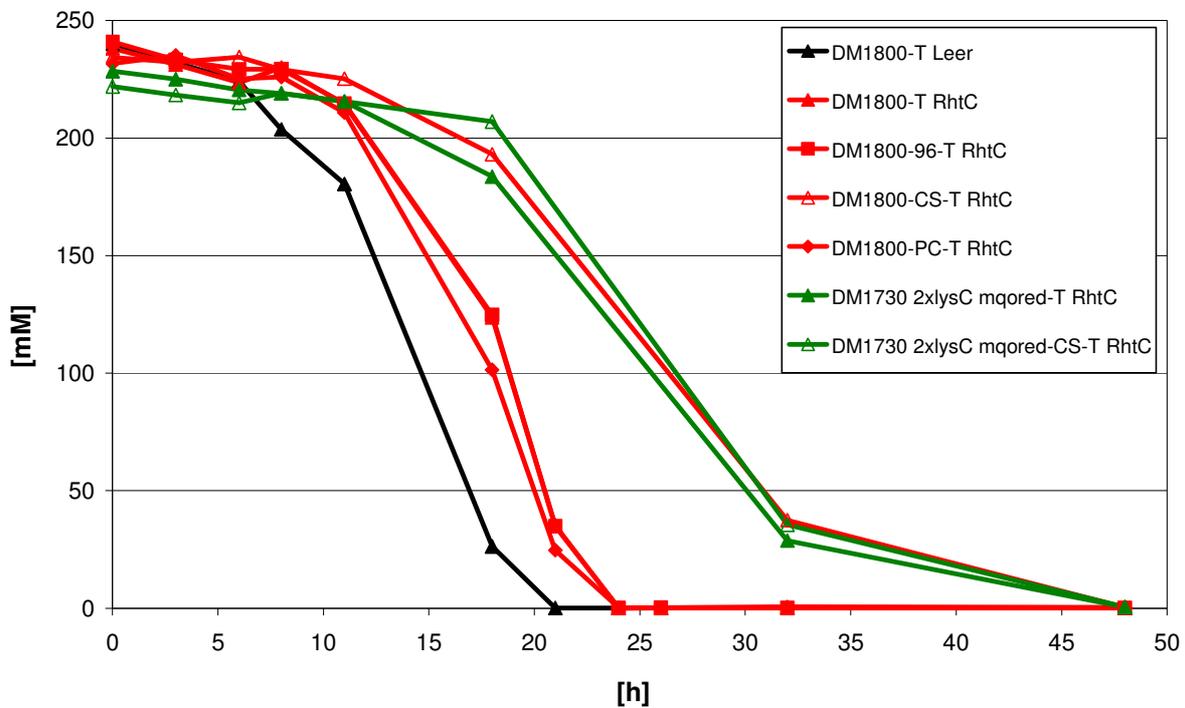


Abbildung 25: Glukose-Aufnahme durch *C. glutamicum* DM1800-T RhtC und seiner Derivate *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC, *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mqo^{red}-T RhtC und seinem Derivat *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mqo^{red}-CS-T RhtC in CgXII, 4% Glukose. Als Kontrolle wurde *C. glutamicum* DM1800-T pEKEEx2 verwendet. Der Stamm DM1800-96-T RhtC wurde durch Zugabe von 1 mM L-Isoleucin supplementiert.

Entsprechend dem Wachstum zeigte sich bei der Glukose-Abnahme, dass bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase Glukose komplett verbraucht war (Abb. 25). So wurde für den Kontrollstamm *C. glutamicum* DM1800-T bereits nach 21 h der komplette Glukose-Verbrauch festgestellt. Die Stämme *C. glutamicum* DM1800-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC und *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC verbrauchten langsamer die Glukose als der Kontrollstamm *C. glutamicum* DM1800-T. Erst nach 24 h wurde der komplette Glukose-Verbrauch festgestellt. Im Vergleich dazu verbrauchte das zweite neu konstruierte Derivat *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC deutlich langsamer die Glukose auf Grund des langsameren Wachstums. Auch mit dem neu mit in die Untersuchung einbezogenen Stamm *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mqo^{red}-T RhtC und dessen Derivat *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mqo^{red}-CS-T RhtC wurden ähnliche Ergebnisse auf Grund des langsameren Wachstums wie mit der Citrat-Synthase Mutante *C. glutamicum*

DM1800-CS-T RhtC bezüglich des Glukose-Verbrauchs beobachtet. Für die drei Stämme wurde der komplette Glukose-Verbrauch erst nach 48 h gemessen.

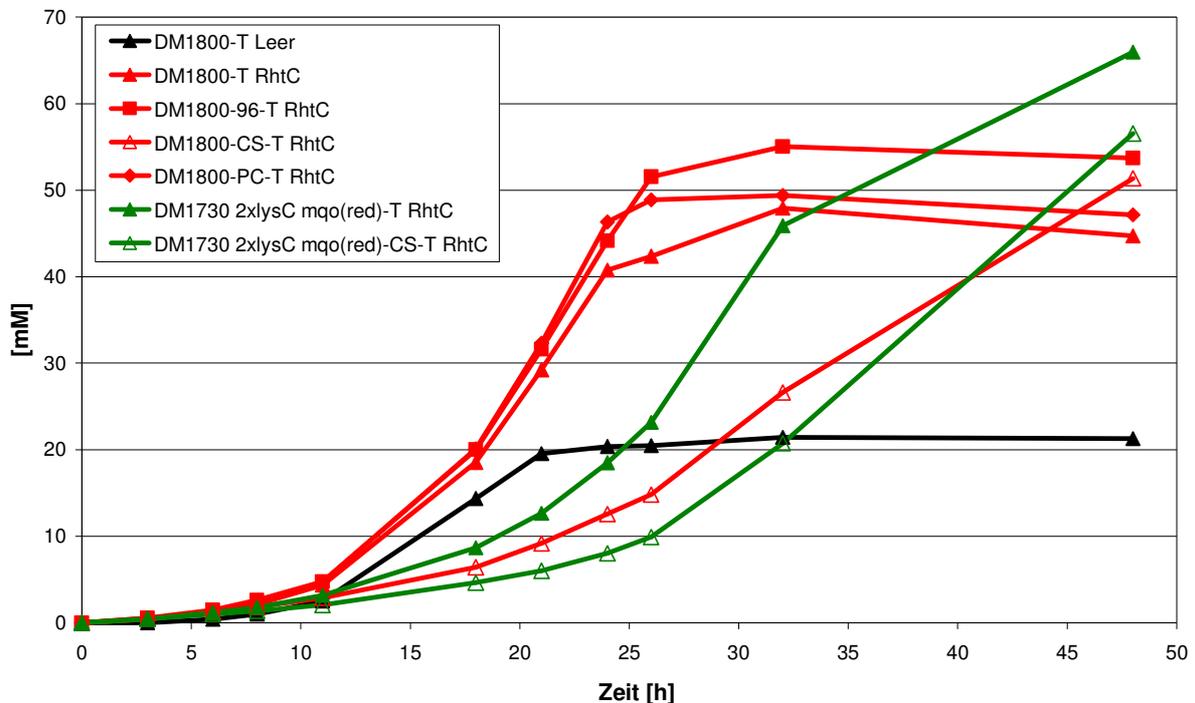


Abbildung 26: L-Threonin-Akkumulation von DM1800-T RhtC und seiner Derivate *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC, *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mqp^{red}-T RhtC und seinem Derivat *C. glutamicum* DM1730 2xlysC mqp^{red}-CS-T RhtC in CgXII, 4% Glukose. Als Kontrolle wurde *C. glutamicum* DM1800-T pEKEx2 verwendet. Der Stamm DM1800-96-T RhtC wurde durch Zugabe von 1 mM L-Isoleucin supplementiert.

Betrachtet man die L-Threonin-Akkumulation des neu konstruierten Stammes *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC mit der des Ausgangsstammes *C. glutamicum* DM1800-T RhtC, so zeigte sich eine geringe Steigerung von 45 mM auf 48 mM nach 48 h, wobei der neu konstruierte Stamm in den ersten 24 h deutlich schneller höhere Konzentrationen L-Threonin akkumulierte (Abb. 26). Dabei spiegelte sich die schnellere L-Threonin-Akkumulation des Stammes *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC auch in einem geringfügig schnelleren Glukose-Verbrauch wieder (Abb. 25). Im Vergleich dazu akkumulierte das zweite neu konstruierte Derivat *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC deutlich langsamer L-Threonin auf Grund des langsameren Wachstums. Nach 48 h konnten jedoch mit 51 mM im Überstand eine Steigerung von circa 15% gemessen werden. Die höchste L-Threonin-Konzentration der *C. glutamicum* DM1800 Derivate wurde aber im Überstand des Threonin-Dehydratase inaktivierten Stammes *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC detektiert. Mit 54 mM

akkumulierte dieser Stamm 20% mehr L-Threonin als der Ausgangsstamm *C. glutamicum* DM1800-T RhtC.

Auch mit dem neuen Stamm *C. glutamicum* DM1730 $2xlysC mqr^{red}$ -T RhtC und dessen Derivat *C. glutamicum* DM1730 $2xlysC mqr^{red}$ -CS-T RhtC wurden ähnliche Ergebnisse auf Grund des langsameren Wachstums wie mit der Citrat-Synthase Mutante *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC bezüglich der L-Threonin-Akkumulation beobachtet. Das langsamere Wachstums führte auch bei diesen Stämmen zu einem deutlich späteren Anstieg der L-Threonin-Akkumulation, wobei der Stamm *C. glutamicum* DM1730 $2xlysC mqr^{red}$ -T RhtC maximal 66 mM L-Threonin akkumulierte. Trotz der stärkeren L-Threonin-Akkumulation in den neu mit in die Untersuchung einbezogenen Stämmen wurde kein Glycin und auch kein L-Lysin im Überstand gemessen. Deswegen ist davon auszugehen, dass der Export nicht mehr der limitierende Faktor für die L-Threonin-Produktion mit diesen *C. glutamicum* Stämmen ist.

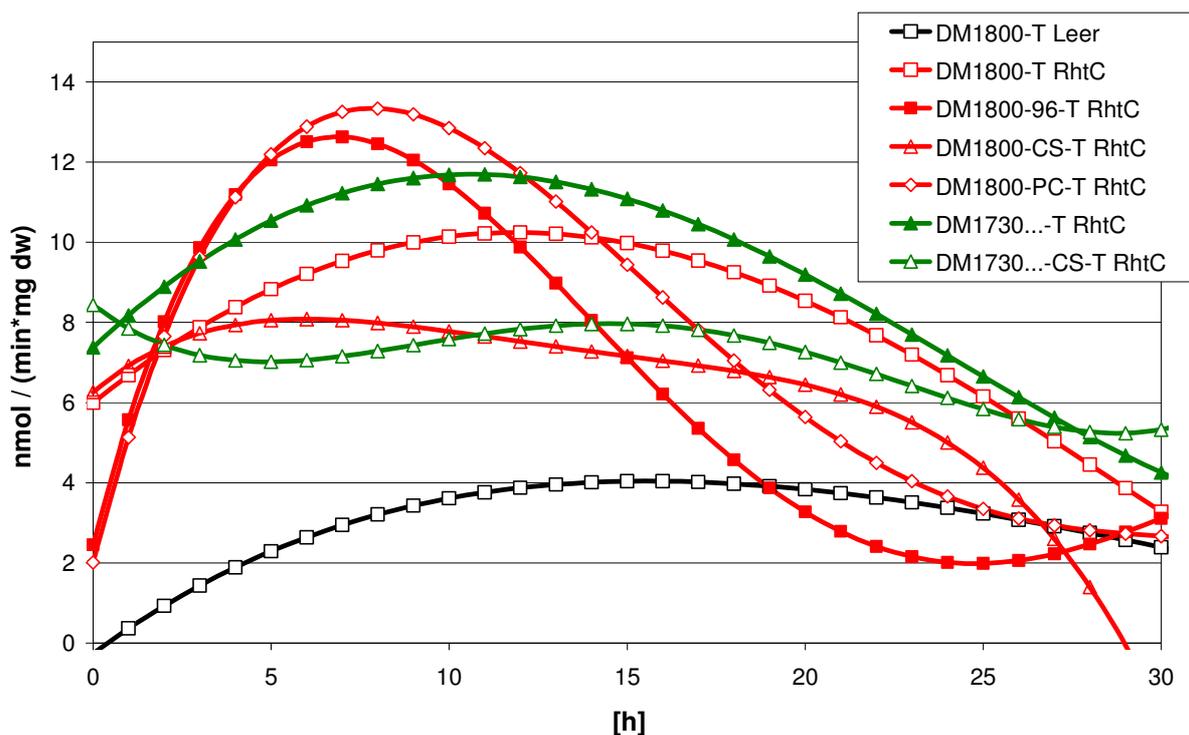


Abbildung 27: L-Threonin-Akkumulationsrate von DM1800-T RhtC und seiner Derivate *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC, *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC, *C. glutamicum* DM1730 $2xlysC mqr^{red}$ -T RhtC und seinem Derivat *C. glutamicum* DM1730 $2xlysC mqr^{red}$ -CS-T RhtC in CgXII, 4% Glukose. Als Kontrolle wurde *C. glutamicum* DM1800-T pEKE_{x2} verwendet. Der Stamm DM1800-96-T RhtC wurde durch Zugabe von 1 mM L-Isoleucin supplementiert.

Es konnte bestätigt werden, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1800-T ohne Expression des heterologen Transporters *rhtC* L-Threonin mit einer Rate von $4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$

deutlich langsamer akkumuliert als die *rhtC* exprimierenden Stämme (Abb. 27). Die Reduktion des Abbaus von L-Threonin in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC führte zu einer deutlichen Steigerung der Exportrate von $10,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ im Referenzstamm *C. glutamicum* DM1800-T RhtC auf $12,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$. Trotz der geringeren Konzentration des Stammes *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC mit 48 mM L-Threonin im Vergleich zu *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC mit 54 mM, wurde für diesen Stamm die maximale Exportrate von $13,3 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ bestimmt. Auf Grund des stark verzögerten Wachstums der beiden Citrat-Synthase-Mutanten *C. glutamicum* DM1800-CS-T RhtC und *C. glutamicum* DM1730 *2xlysC mgo*^{red}-CS-T RhtC wurde für diese beiden Stämme nur eine Exportrate von circa $8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ erreicht. Trotz der deutlich verzögerten Akkumulation bei DM1730 *2xlysC mgo*^{red}-T RhtC betrug kurzfristig die Exportrate $11,7 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$.

Anhand dieser Ergebnisse konnte deutlich gezeigt werden, dass die maximale Akkumulation nicht ausschlaggebend für die maximal berechnete Exportrate ist, da neben der Akkumulation sowohl die Zeit als auch die Zellmasse in die Berechnung einfließen. Dies ist auch ersichtlich daraus, dass trotz der relativ niedrigen L-Threonin-Endkonzentration von 48 mM mit dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-PC-T RhtC verglichen zu 66 mM, die mit dem Stamm *C. glutamicum* DM1730 *2xlysC mgo*^{red}-T RhtC akkumuliert wurden, die maximale Exportrate von $13,3 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ erzielt werden. Somit sind die bestimmten Exportraten nur noch um den Faktor 2 niedriger als in bereits bekannten *E. coli* L-Threonin-Produzenten (Kruse et al., 2002). Wie in den Experimenten anschaulich gezeigt werden konnte, ist dabei der Export als limitierender Faktor durch Nutzung heterologer Transporter beseitigt worden.

3. Überproduktion des Transporters RhtC aus *E. coli* und der Decaprenyl-Transferase UbiA aus *M. tuberculosis*

Um Zugang zum Protein RhtC zu bekommen, mit dem großen Ziel strukturelle Untersuchungen zu ermöglichen, sollten vorbereitende Experimente zu dessen Nachweis und Isolation durchgeführt werden. Zusätzlich wurde das Protein UbiA aus *M. tuberculosis* in diese Untersuchungen mit einbezogen. UbiA kodiert für die Decaprenyl-Transferase, die am ersten Syntheseschritt des Zellwandbestandteils Arabinan beteiligt ist. Dieses Protein ist ebenfalls ein Membranprotein und koppelt sehr wahrscheinlich die Transferasefunktion mit einer Transportfunktion für ihr Substrat, die Decaprenyl-Arabinose (Tatituri et al., 2007). Die

Expression und Aufreinigung von UbiA in der Membranfraktion würde enzymatische Untersuchungen mit diesem Protein ermöglichen. Dazu wurde zum einen von dem Protein UbiA aus *M. tuberculosis* die *Codon Usage* an die von *E. coli* adaptiert und zum Anderen das entsprechenden Gen über PCR aus dem Genom von *M. tuberculosis* amplifiziert. Im Anschluss wurde jeweils *rhtC* sowie *ubiA* in den Vektor pET-52b(+) kloniert, durch den bei Expression einen abspaltbarer, C-terminaler His-Tag an das Protein zur Aufreinigung und Detektion fusioniert wird. Zusätzlich wurden beide Gene in den Vektor pRc-Exp1I kloniert, einem Derivat von pET-22b(+), durch den bei Expression einen C-terminaler His-Tag an das Protein zur Aufreinigung und Detektion fusioniert wurde. Der Vektor pRc-Exp1I repliziert auch in *Rhodobacter capsulatus* und wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Drepper (IMET) verwendet um die Möglichkeit zu eröffnen die beiden Proteine mit *R. capsulatus* zu bilden. *R. capsulatus* ist ein gram-negatives, fakultativ anaerobes, schwefelfreies Purpurbakterium, das unter speziellen Kultivierungsbedingungen in der Lage ist verstärkt Membranen zu bilden. Daher könnte es ein geeignetes System zur Expression von Membranproteinen sein.

3.1. Überproduktion der Proteine RhtC und UbiA mit *E. coli*

Zur Expression von *rhtC* und *ubiA* in *E. coli* wurden die Stämme BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, C43(DE3) und C43(DE3) pLysS verwendet. Diese Stämme unterscheiden sich bezüglich ihrer Fähigkeit Membranen zu bilden (Miroux and Walker 1996). Der Stamm *E. c.* C43(DE3) ist durch mehrfach ungerichtete Mutagenese aus dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) entstanden und eignet sich in vielen Fällen besonders zur Expression von Membranproteinen. Diese Stämme wurde zum einen durch die Plasmide pET-52b(+), pET-52b(+) *rhtC* und pET-52b(+) *ubiA*^{Mt} transformiert und zum anderen durch die Plasmide pRc-Exp1I, pRc-Exp1I *rhtC* und pRc-Exp1I *ubiA*^{Mt}. Die erhaltenen Stämme wurden entweder über Nacht bei 20°C, 25°C oder 37°C unter Zugabe von 0, 0,1 oder 1 mM IPTG in LB-Medium inkubiert oder nach einer Vorkultivierung über Nacht in LB-Medium mit 0,5% Glukose 4 h bis 5 h bei einer anfänglichen OD von 1 bei 20°C, 25°C oder 37°C unter Zugabe von 0, 0,1 oder 1 mM IPTG in LB-Medium angezogen. Als repräsentatives Beispiel für die Protein-Auftrennung nach der Expression ist in Abbildung 28 ein denaturierendes Gel gezeigt, auf dem sowohl der Ganzzellaufschluss als auch die Membranfraktion der Stämme C43(DE3) und C43(DE3) pLysS, die zusätzlich pET-52b(+) bzw. pET-52b(+) *ubiA*^{Mt} enthielten, aufgetrennt wurde. In diesem Falle fand die Kultivierung der jeweiligen Stämme

bei 37°C, über einen Zeitraum von vier Stunden und Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG statt.

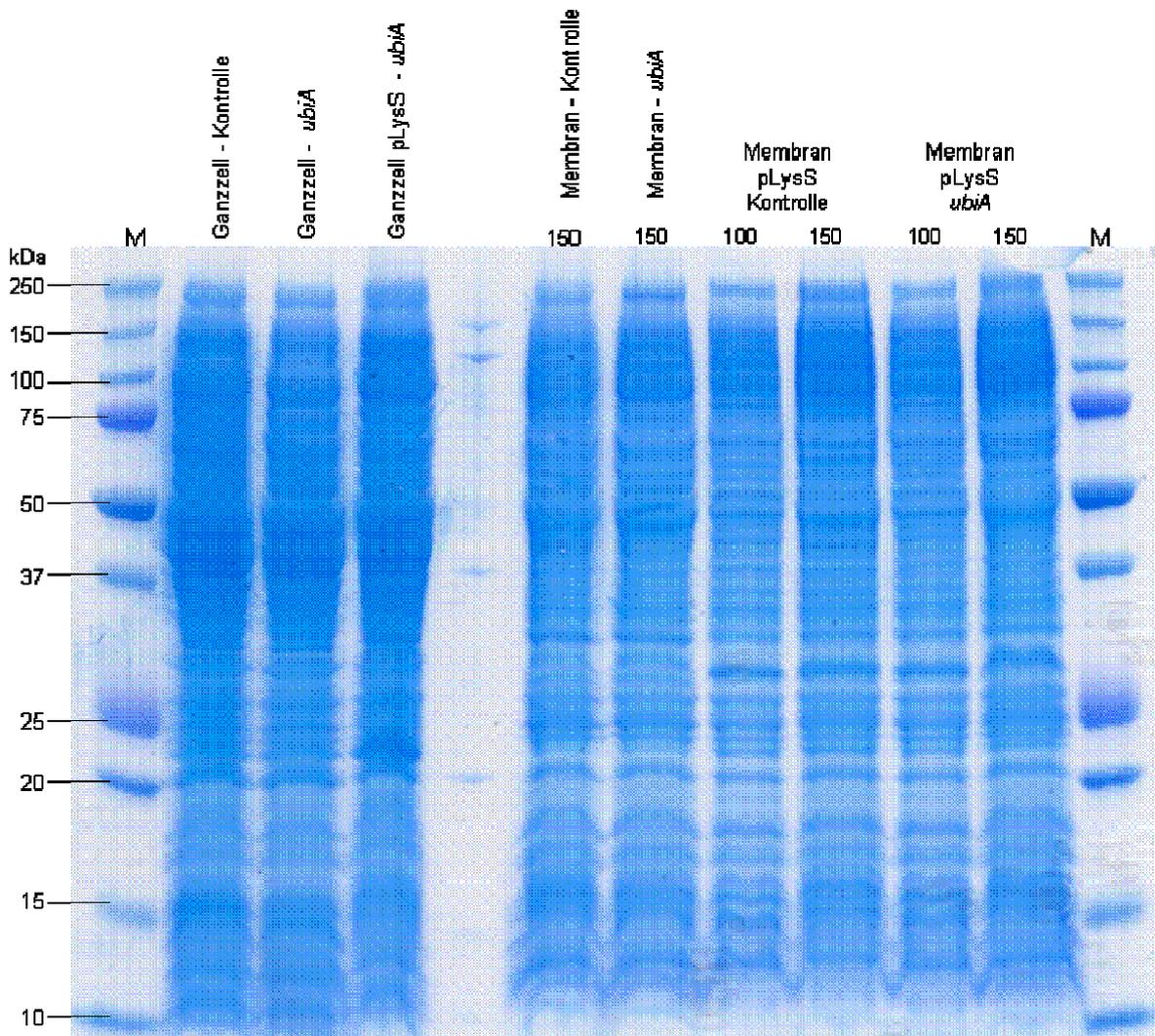


Abbildung 28: Auftrennung des Ganzzellaufschlusses und der Membranfraktion der Stämme C43(DE3) und C43(DE3) pLysS, die zusätzlich pET-52b(+) bzw. pET-52b(+) *ubiA*^{Mt} enthielten, auf einer 12 %igen SDS-PAGE. In den Spuren der Membranfraktionen wurden wie angegeben entweder 100 oder 150 µg Protein aufgetragen.

Der Vergleich der Kontrollen mit den Spuren der *ubiA* Expressionen zeigte, dass in allen Spuren ein nahezu identisches Auftrennungsmuster des Gesamtproteins zu erkennen war. Jedoch konnten keine zusätzlich auftretenden Banden detektiert werden. Alle angefertigten SDS-Gele ergaben ein zur Abbildung 28 im Wesentlichen vergleichbares Bild, sodass über diese Analyse kein Nachweis der Bildung des jeweiligen Proteins möglich war. Es ist bekannt, dass Membranproteine verglichen zu cytosolischen Proteinen schwer zu exprimieren sind und das Auffinden der richtigen Bedingungen oft erst durch "Versuch-und-Irrtum" möglich ist (Korepanova et al., 2005). Daher wurden neben Coomassie-Färbung der Gele parallel Gele zur Western Blot Analyse zum spezifischen Nachweis der Zielproteine über

Antikörper, die gegen deren His-Tag gerichtet sind, angefertigt. Dazu wurden zuerst Maus-Antikörper gegen den His-Tag der Proteine auf die Membran gegeben. Im Anschluss daran wurden die gebundenen Maus-Antikörper mit einem spezifischen, zweiten Anti-Maus-Antikörper detektiert, an dem eine alkalische Phosphatase gekoppelt war. Diese katalysierte eine chemische Farbreaktion wodurch die detektierten Proteine sichtbar gemacht wurden. Während Expressionen bei Verwendung des Plasmides pET-52b(+) mit Expression des jeweiligen Proteins auch in Western Blot Analysen keine Banden zeigten, konnte bei Nutzung des Plasmids pRc-Exp1I *rhtC* eine spezifische Bande nachgewiesen werden (Abbildung 29). Dabei wurde zur Synthese der Proteine RhtC und UbiA *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pRc-Exp1I *rhtC* und *E. coli* BL21(DE3) pRc-Exp1I *ubiA*^{Mt} 4 h bei 20°C inkubiert. Offensichtlich beeinflusst der kürzere, C-terminal angefügte Bereich ohne die Thrombin-Erkennungssequenz durch den Vektor pRc-Exp1I die Expression von *rhtC*.

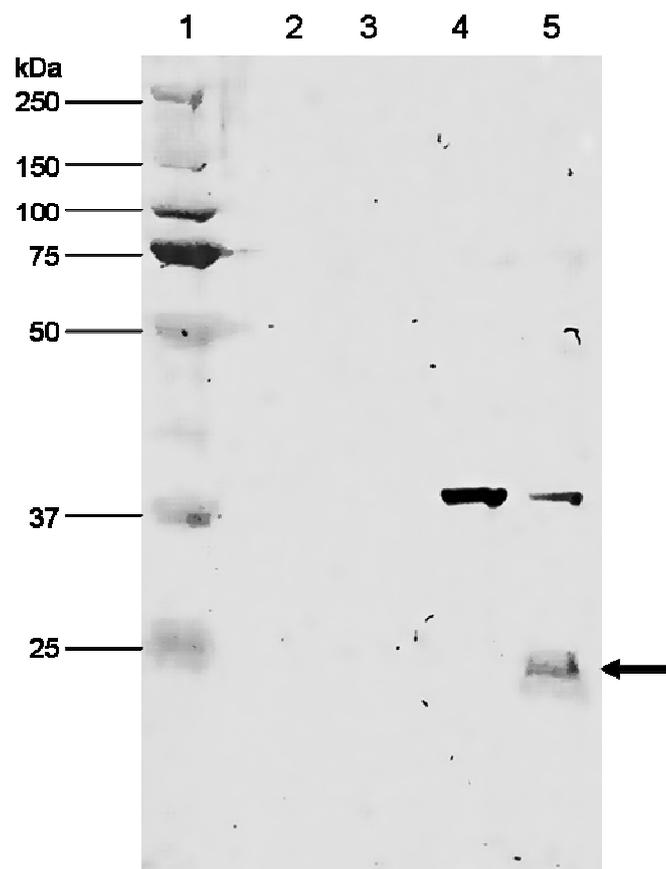


Abbildung 29: Western Blot Analyse zur Detektion His-markierter Proteine. In Spur 1 ist der Precise Plus Protein Standard aufgetragen. In Spur 2 und 3 befinden sich die cytosolischen Fraktionen, in Spur 4 und 5 die Membranfraktion der Kontrolle und der *rhtC* Expression. Die spezifische Bande der RhtC-Expression ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen und Abtrennung der Zelltrümmer wurde die Membranfraktion über Ultrazentrifugation präpariert. In allen Western Blot Analysen war eine unspezifische Bande in der Membranfraktion auf Höhe von circa 37 kDa detektierbar. Während aber in der Spur der Kontrolle keine weiteren Banden gefunden wurden, konnte in der Spur der *rhtC* Expression eine weitere Bande nachgewiesen werden. Die Position der Bande entspricht einer Proteingröße von circa 25 kDa, was mit der vorhergesagten Größe von RhtC übereinstimmt. Es ist somit gelungen das Protein RhtC in der Membranfraktion zu bilden und nachzuweisen. Jedoch sind weitere Kultivierungs-Optimierungen zur Bildung ausreichender Mengen Protein notwendig um weiterführende Analysen mit RhtC durchzuführen.

3.2. Überproduktion der Proteine RhtC und UbiA in einem *in vitro* System

Parallel zu den Versuchen zur *in vivo* Expression wurden *in vitro* Untersuchungen entsprechend der Vorgabe mit dem Kit „EasyXpress Protein Synthesis“ (Qiagen) durchgeführt. Neben der normalen Expression wurde getestet ob die Zugabe von 0,5 % Triton X-100 die Expression beeinflusst, da bekannt ist, dass in einigen Fällen die Zugabe von Detergenzien die *in vitro* Expression von Membranproteinen positiv beeinflussen kann (Klammt et al., 2004).

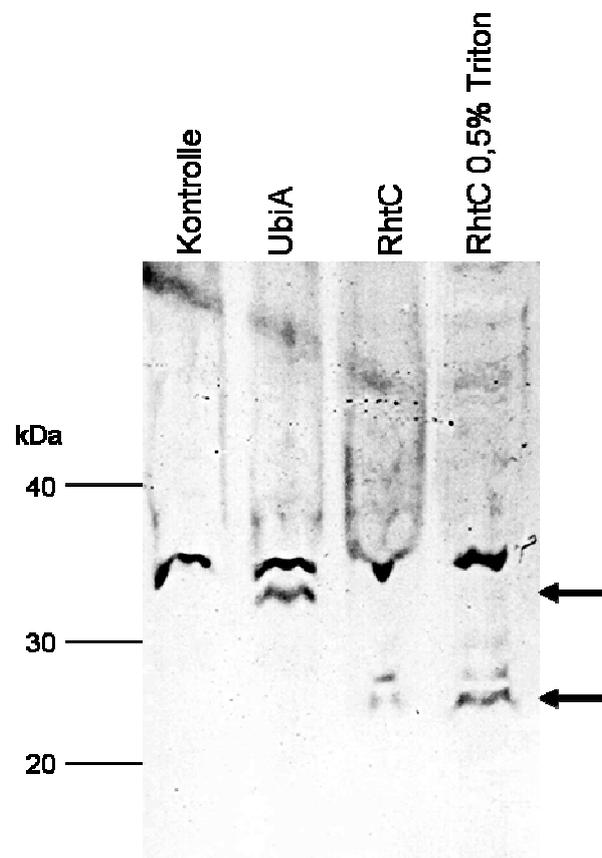


Abbildung 30: Western Blot der *in vitro* Expressionen von RhtC und UbiA. Zur Kontrolle wurde der Ansatz des Leerplasmids geblottet. Die Größe in kDa ist links angezeigt. Die spezifischen Banden in der UbiA- und RhtC-Expression sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Nachdem Plasmid-DNA entsprechend den Angaben des Herstellers mit den Komponenten des Kits zusammengegeben worden war, und die Reaktion zur Expression von *rhtC* und *ubiA* durchgeführt wurde, sind die kompletten Ansätze mittels SDS-Gelen aufgetrennt worden. Der Vergleich der Kontrollen mit den Spuren der *rhtC* und *ubiA* Expressionen nach Coomassie-blue Färbung zeigte, dass in allen Spuren ein nahezu identisches Auftrennungsmuster des

Gesamtproteins zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte jedoch auf Grund der Vielzahl der gebildeten Proteine keine zusätzlich auftretende Banden detektiert werden. Jedoch wurden in Western Blot Analysen spezifische Banden sowohl bei der *ubiA* Expression als auch der *rhtC* Expression detektiert, die in der Kontrolle nicht vorhanden waren (Abbildung 30). Für UbiA wurde eine Bande auf der Höhe von etwa 35 kDa und für RhtC eine schwächere Bande auf der Höhe zwischen von 25 kDa gezeigt. Die Zugabe von 0,5 % Triton X-100 beeinflusste die Expression positiv, was eine stärkere Bande zur Folge hatte. Beide Banden entsprachen in etwa der vorhergesagten Proteingröße.

Es konnte somit gezeigt werden, dass es möglich ist das Protein RhtC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Mengen die durch Antikörper nachweisbar waren zu bilden. Jedoch sind diese Mengen für weiterführende Analysen, oder sogar für Strukturuntersuchungen mittels NMR bei weitem zu gering, da in diesen Untersuchungen zwischen fünf bis fünfzig Milligramm Protein nötig sind (Peti et al., 2007). Darüber hinaus wäre ein weiterer Verlust der Proteinkonzentration in folgenden, zwingend notwendigen Aufreinigungsschritten die Folge. Für Festkörper-NMR werden Proteinkonzentrationen von mindestens 1 mM benötigt. Des Weiteren bestätigten die Untersuchungen im Fall von UbiA, dass die *in vivo* Expression oftmals toxisch für die Wirtszelle ist (Miroux and Wagner 1996), was durch Nutzung eines *in vitro* Systems ausgeglichen werden kann. Um weitere Untersuchungen mit den Proteinen RhtC oder UbiA durchführen zu können, müssten in weiteren Experimenten die Versuchsbedingungen optimiert werden um entsprechend ausreichende Konzentrationen des jeweiligen Proteins zu erhalten.

VI. Diskussion

1. Globale Transkriptionsanalyse zur Identifizierung von Transportern

Durch Zugabe spezifischer Aminosäuren zum Medium, deren Untersuchung zur Verstoffwechslung und anschließender Transkriptomanalyse, sollten unbekannte Aminosäure-Importer identifiziert werden. Grund der Suche war die Kenntnis, dass bei der Tryptophan-Produktion die Inaktivierung des Tryptophan Aufnahmesystems von *C. glutamicum* die Produktbildung verbessert (Ikeda et al., 1994). Der Ansatz mittels Microarray-Analysen solche Transporter zu identifizieren, war insofern hoffnungsvoll, da für den Transporter verzweigtkettiger Aminosäuren BrnFE (Kennerknecht et al., 2002), auch dessen Beteiligung am Methionin Export über Microarray-Analysen entdeckt wurde (Trötschel et al., 2005). Jedoch sind keinerlei Daten, die die Stärke der Expressionsänderung angeben dazu gezeigt. Bei der zusätzlichen Gabe von L-Aspartat ins Medium ergab sich in dieser Arbeit allerdings durch die Transkriptomanalyse kein Hinweis auf einen an der L-Aspartat-Aufnahme beteiligten Transporter. Die einzigen Gene, die eine deutlich erhöhte Transkription zeigten, waren die Gene *NCgl 1340 – NCgl 1345*, die für Enzyme der L-Arginin Biosynthese kodieren. Da dieses Operon durch den Regulator FarR in seiner Expression kontrolliert wird (Hänssler et al., 2007), und dieser möglicherweise in Abhängigkeit interner Aminosäure-Konzentrationen die Expression der *arg* Gene kontrolliert, ist es denkbar, dass darüber ein bisher noch unbekannter Zusammenhang zur L-Aspartat-Verfügbarkeit besteht. Auf Grund einer durch L-Aspartat vermehrten Verfügbarkeit von Oxalacetat könnte auch die verringerte Expression der Gene *sdhABCD* stehen, die für den Succinat-Dehydrogenase-Komplex kodieren. Jedoch ist bei diesen Genen, wie auch den Genen des *nar* und *glu* Operons, sowie denen des ABC-Transporters unbekannter Funktion ein rationaler Zusammenhang zum L-Aspartat nicht erkennbar.

Auch für L-Threonin und L-Serin konnte mittels Microarray kein spezifischer Transporter identifiziert werden. Die auffälligen, als Membranproteine annotierten Gene waren jedoch keine guten Kandidaten für die jeweiligen Aufnahmesysteme, da für sie nur drei bzw. eine Transmembranhelix vorhergesagt werden, und sie vor allem nach 30 min wieder verringerte Transkriptmengen aufwiesen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass das kleinste bekannte Transportergen, *emrE* aus *E. coli*, für ein Peptid mit 4 Transmembran-Helices kodiert, und der aktive Transporter aus 3 Peptiden zusammengesetzt ist (Schuldiner et al., 1997). Die verstärkte Expression von *serA* und *aceA* bei L-Threonin Zugabe könnte auf

sekundäre Effekte zurückgeführt werden. Interessant ist, dass einige Gene des L-Cystein- und L-Methionin-Stoffwechsels niedrigere Transkriptlevel unter diesen Bedingungen zeigten. Es ist aber bekannt, dass diese durch den Regulator McbR vom TetR-Typ kontrolliert werden, der an der Regulation Schwefel-haltiger Aminosäuren beteiligt ist (Rey et al., 2005). Es ist durchaus vorstellbar, dass L-Serin an der Regulation von Genen der L-Cystein- und L-Methionin-Synthese beteiligt ist, und L-Threonin wegen seiner Strukturähnlichkeit in höheren Konzentrationen unspezifisch genau wie L-Serin in die Regulation eingreift. Tatsächlich werden bei Zugabe von L-Serin Gene der L-Cystein und L-Methionin-Synthese auch verändert exprimiert. Unter den bei L-Serin-Zugabe schwächer transkribierten Genen waren *serA* und *glyA*. Für die durch *serA* kodierte 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase konnte bisher nur eine Feedback-Inhibierung durch L-Serin gezeigt werden (Peters-Wendisch et al., 2002) und auch für die durch *glyA* kodierte Serinhydroxymethyltransferase konnte nur eine geringere Enzymaktivität während des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase bei Deletion des Regulators GlyR nachgewiesen werden (Schweitzer et al., 2008). Deswegen liegt bei beiden Genen sehr wahrscheinlich eine bislang unbekannt transkriptionelle Regulation durch L-Serin vor.

Schlussfolgernd muss die Aussage getroffen werden, dass die Möglichkeiten einen Importer mittels Microarrays zu identifizieren offensichtlich begrenzt sind. Trotz Zugabe von L-Aspartat, L-Serin oder L-Threonin und der nachgewiesener Metabolisierung dieser Substanzen, sowie der RNA Präparierung nach verschiedenen Zeitpunkten gelang es nicht einen guten Kandidaten für ein spezifisches Aufnahmesystem zu erhalten.

2. Nutzung heterologer Threonin-Exporter aus *E. coli* in *C. glutamicum*

Mit dem Transporter ThrE aus *C. glutamicum* konnte nur eine sehr mäßige L-Threonin Steigerung mit einem Derivat von MH20-22B erreicht werden (Simic et al., 2002), und möglicherweise transportiert er L-Threonin auch nur als Seitenaktivität (Yen et al., 2002). ThrE ist ohnehin untypisch für einen Aminosäure-Transporter, da dieses Protein eine zusätzliche Domäne besitzt die wahrscheinlich Hydrolaseaktivität bewirkt (Simic et al., 2001). Von denen in dieser Arbeit untersuchten heterologen Transportern aus *E. coli* konnten RhtA, RhtC und YeaS erfolgreich in *C. glutamicum* exprimiert und ihre Funktion als effektiver L-Threonin-Exporter gezeigt werden. Auch in *S. cerevisiae* konnten zur Aufnahme von Xylose entsprechende Importer aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert und genutzt werden

(Hector et al., 2008). Ferner ist auch LysE aus *C. glutamicum* in *Methylophilus methylotrophus* benutzt worden um den Export aus Methanol gebildeten L-Lysin zu ermöglichen (Gunji et al., 2006a). Allerdings gelang das in diesem Fall nur mit einem zufällig entstandenen Konstrukt, bei dem LysE in zwei getrennten Hälften gebildet wird. Es wird diskutiert, dass dies mit einem besonderen Membranaufbau von *M. methylotrophus* gegenüber *C. glutamicum* in Zusammenhang stehen könnte (Gunji et al., 2006b).

Darüber hinaus ist neben der nativen Funktion eines Transporters die Spezifität von erheblichem Interesse. Bei Importern ist Spezifität zum Teil sehr gut untersucht. So wurde für den Glutamat-Importer GluABCD aus *C. glutamicum* gezeigt, dass dieser spezifisch L-Glutamat importiert (Kronmeyer et al., 1995) und für AroP konnte der Import aromatischer Aminosäuren belegt werden (Wehrmann et al., 1995). Demgegenüber gibt es bei Exportern erheblich weniger Information, was auch mit der *in vivo* schlechten, bzw. nur teilweise möglichen Variationsmöglichkeit des zellinternen Substrates zusammenhängt. Für LysE aus *C. glutamicum* konnte über Peptidzugabe und mit Mutanten, die Veränderungen im L-Lysin-Biosyntheseweg hatten, gezeigt werden (Vrljic et al., 1996), dass dieser Exporter spezifisch basische Aminosäuren transportiert. Von dem Transporter YfiK aus *E. coli*, der wie LysE, YeaS, RhtC und RhtB Mitglied der LysE-Superfamilie ist (Vrljic et al., 1999), ist durch Analyse von Franke et al., (2003) gezeigt, dass er sowohl O-Acetylserin als auch L-Cystein transportiert. Auch der in dieser Arbeit untersuchte Transporter RhtA aus *E. coli* besitzt offensichtlich ein sehr breites Substrat-Spektrum. Dies wurde durch die *rhtA*-vermittelte erhöhte Resistenz gegen L-Serin, L-Homoserine, L-Threonin und der Purin-Base Azaadenin geschlossen (Livshits et al., 2003, Zakataeva et al., 2006). In dieser Arbeit konnte direkt durch die gesteigerte extrazelluläre Akkumulation von L-Serin, L-Homoserin und L-Threonin gezeigt werden, dass RhtA in *C. glutamicum* den unspezifischen Export dieser Aminosäuren katalysiert. Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Transporter Wirts-unabhängig ein breites Substratspektrum sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* besitzt. Unabhängig davon zeigten Untersuchungen, dass sich Promotormutationen von *rhtA* in *E. coli* L-Threonin-Produktionsstämmen positiv auf die Akkumulation ausgewirkt haben (Debabov et al., 2003, Livshits et al., 2003). Der Exporter RhtC soll in *E. coli* auch effizient L-Valin und L-Leucin exportieren (Livshits et al., 1999), was überraschend ist, da in dieser Arbeit keine derartige Seitenaktivität festgestellt wurde. Möglicherweise waren die internen Konzentrationen dieser Aminosäuren in den durchgeführten Versuchen zu niedrig, so dass kein Export dieser Aminosäuren stattfand. Allgemein kann durch die dargestellten Versuche dieser Arbeit es als bewiesen angesehen werden, dass die Expression heterologer

Aminosäure-Exporter aus *E. coli* Produktionsprozesse für Aminosäuren in *C. glutamicum* optimieren können.

In dieser Arbeit fand die Expression der heterologen Transporter in dem Plasmid pEKEx2 unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors statt. Da dieser Promotor keiner strikten Kontrolle unterliegt, war auch ohne IPTG-Zugabe eine deutliche Expression messbar, die bereits etwa 12-fach stärker als die des Referenzgens *ddh* war. Diese Expression war für die Aufhebung der Exportlimitation ausreichend und resultierte bei Expression des Transporters *rhtC* sogar in verzögertem Wachstum. Dies könnte auf die verstärkte Proteinbiosynthese, bzw. den verstärkten Einbau des Transporters in die Cytoplasmamembran, und eine damit einhergehende Destabilisierung der Zellmembran oder auch auf einen zu starken Export von L-Threonin und daraus resultierender zellinterner Limitation zurückgeführt werden (Wagner et al., 2008). Durch die Expression des Exporters RhtC in *C. glutamicum* wurden maximale Exportraten von $8,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ im Vergleich zu $2,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ mit der Kontrolle im Peptidsystem und $13,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ im Vergleich zu dem Kontrollstamm mit $5,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ in Kultivierungen im Schüttelkolben erzielt. In einem *E. coli* Stamm, der durch mehrere Runden ungerichteter Mutagenese entstanden ist, war der Anteil von RhtC an der erreichten absoluten Exportrate maximal 20% (Kruse et al., 2002). Unabhängig davon ob RhtC vorhanden war oder nicht akkumulierte dieser Stamm am Ende der Kultivierung 58 mM L-Threonin weshalb die Bedeutung von RhtC in diesem Stammhintergrund fraglich ist. Dabei zeigten Arbeiten in *E. coli*, dass vor allem auch die anderen Transporter RhtA und RhtB in diesem Organismus den L-Threonin-Export katalysieren und steigern können (Debabov 2003, Lee et al., 2007). Dennoch sind für die hohen L-Threonin Endkonzentrationen im Produktionsprozess, wo Konzentrationen von circa 100 g/l erreicht werden und Kristallisation im Fermenter auftritt (Eggeling et al., 2006, Rieping et al., 2006), zahlreiche Mutationen nötig um exzellente Produktionsausbeuten zu erzielen. Von außerordentlicher Bedeutung für die Bewertung des Nutzens von RhtC in *C. glutamicum* sind die extrem niedrigen, zellinternen Konzentrationen von L-Threonin als Folge der *rhtC* Expression. Verglichen zu den zellinternen 140 mM L-Threonin in der Kontrolle konnte bei Anwesenheit von RhtC nur 10,7 mM gemessen werden, was eine extrem hohe Effizienz des Transporters in *C. glutamicum* nahelegt. Dabei ist zu vermuten, dass RhtC unter den Versuchsbedingungen nicht gesättigt war. Es wird angenommen, dass Aminosäure-Exporter eine geringe Affinität besitzen (Burkovski und Krämer 2002). Für LysE in *C. glutamicum* wurde abgeschätzt, dass der K_m bei etwa 24 mM liegt (Bröer und Krämer 1991). Andernfalls könnte es sonst im Wildtyp unter normalen

Bedingungen schnell zum Mangel an der entsprechenden Aminosäure kommen. Allerdings wird *lysE* in Abhängigkeit der internen L-Lysin-Konzentration über den Regulator LysG kontrolliert (Bellmann et al., 2001), sodass dies neben der Affinität auch noch zur Kontrolle der intrazellulären Konzentration beiträgt. Bestimmungen des internen K_m -Wertes für RhtC sind nicht bekannt. Allerdings lässt die hohe Exportrate bei maximal 10,7 mM intern eine deutlich höhere Affinität von RhtC zum Substrat vermuten, als dies bei LysE der Fall ist, für den bei einem K_m -Wert von 20 mM eine Exportrate von $12 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ gemessen wurde (Bröer und Krämer, 1991).

Auf Grund der vorhandenen Daten ist stark davon auszugehen, dass nicht der RhtC-vermittelte Export für hohe Threoninbildung limitierend war. Dies wird unterstützt durch die nahezu völlige Abwesenheit von Glycin und L-Lysin im Kulturüberstand. Auch der eigentliche L-Threonin-Syntheseweg ist vermutlich nicht limitierend, da er von der L-Lysin-Synthese abzweigt und nur durch drei Enzyme katalysiert wird. Deswegen muss die Vorstufenbereitstellung betrachtet werden, wie es bei weit entwickelten Stämmen für die L-Lysin-Synthese der Fall ist (Ikeda et al., 2006). Ein interessanter Punkt ist dabei die NADPH Verfügbarkeit. Zur L-Lysin Synthese werden vier NADPH benötigt und spezifische Mutationen, die die NADPH Verfügbarkeit erhöhen, wirken sich positiv auf die Ausbeute der L-Lysin-Produktion aus (Kelle et al., 2005). Obwohl zur L-Threonin Synthese nur drei NADPH anstatt vier wie zur L-Lysin Synthese verbraucht werden, könnten steigende Effekte auch für die L-Threonin-Produktion unter Verwendung dieser Mutationen auftreten. Vor allem deutet aber die in dieser Arbeit vorgenommene, stöchiometrische Analyse des Stoffwechselflusses primär auf die begrenzte Verfügbarkeit von Oxalacetat hin. Dieser Erwartung entsprechend führte eine L-Aspartat *Feedback*-resistente Mutation der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, die durch das Gen *ppc* kodiert wird, zu einer gesteigerten L-Threonin-Ausbeute in *E. coli* (Debabov, 2003). Gleichmaßen förderte die durch Mutation gesteigerte Aktivität der Pyruvat-Carboxylase, kodiert durch das Gen *pyc*, und die Deletion des Gens *pck*, das für die am Rückfluss beteiligte Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodiert, die Oxalacetat Bereitstellung und die L-Lysin Synthese (Riedel et al., 2001), was dementsprechend auch die L-Threonin Synthese positiv beeinflussen sollte. Auch die durchgeführten Flussanalysen ließen auf weitere Erhöhung des Stoffwechselflusses über Oxalacetat durch zusätzliche Steigerung der Pyruvat-Carboxylase schließen. Um dies zu erreichen wurde der native Promotor des Gens *pyc* durch den starken *glyA*-Promotor in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-T ausgetauscht. Dies resultierte vor allem in einer um 13,5% gesteigerten L-Threonin-Ausbeute in den ersten 24 Stunden verglichen zu der Referenz, die

allerdings auf 5,6% nach 48 Stunden sank. Auf Grund der schnellen L-Threonin-Akkumulation wurde mit diesem Stamm die höchste Exportrate von $13,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ bestimmt. Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Oxalacetat Verfügbarkeit war die Reduktion des Stoffwechselflusses über den Citrat-Zyklus durch Veränderung der Citrat-Synthase Aktivität (Radmacher et al., 2007). Bereits durch die zuvor durchgeführten Flussanalysen wurde ein starker Effekt durch Reduktion der Citrat-Synthase Aktivität in Bezug auf die Umlenkung des Stoffwechselflusses in Richtung L-Threonin erwartet. Um dies zu erreichen wurde parallel ein 160 Basenpaar-Fragment im Promotorbereich des Gens *gluA* sowohl in dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-T als auch in dem Stamm *C. glutamicum* DM1730 *mgo*^{red} *2xlysC*-T deletiert. Diese Veränderung resultiert vor allem im sehr langsamen Wachstum. Dabei akkumulierte das Derivat des Stammes *C. glutamicum* DM1800-T RhtC mit 51,4 mM 15% mehr L-Threonin nach 48 Stunden als die Referenz mit 44,7 mM. Als die Kultivierung nach 48 Stunden gestoppt wurde hatte das Derivat von *C. glutamicum* DM1730 *mgo*^{red} *2xlysC*-T RhtC mit der *gluA*-Promotor-Mutation auf Grund des langsamen Wachstums die maximale L-Threonin-Akkumulation wahrscheinlich noch nicht erreicht. Dieser Stamm wuchs mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,08 \text{ h}^{-1}$ in allen Versuchen am langsamsten verglichen zu den anderen untersuchten Stämmen. Die Deletion des 160 Basenpaar-Fragments führt in beiden untersuchten Stammhintergründen zu verzögertem Wachstum da durch Umlenken des Stoffwechselflusses offensichtlich weniger C-Quelle für die Biomasse vorhanden ist. Auch bei der L-Lysin-Produktion zeigte sich, dass schlechteres Wachstum häufig in besserer Ausbeute resultiert (Ikeda et al., 2006). Von den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen besaß der Stamm *C. glutamicum* DM1730 *mgo*^{red} *2xlysC*-T RhtC die höchste Ausbeute mit $0,3 \text{ mol L-Threonin mol Glukose}^{-1}$ mit der maximalen L-Threonin-Akkumulation von 66 mM, obwohl zu erwarten ist, dass die Ausbeute des Derivats *C. glutamicum* DM1730 *mgo*^{red} *2xlysC*-CS-T RhtC diese sogar übersteigt. Schlussfolgernd konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen Mutationen in dem Stammhintergrund *C. glutamicum* DM1730 *mgo*^{red} *2xlysC*-T verglichen mit dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-T sich nicht nur positiv auf die L-Lysinbildung auswirken (Bathe, Evonic), sondern auch die L-Threonin-Ausbeute deutlich steigern. Dabei wurde von den Derivaten des Stammes *C. glutamicum* DM1800-T die höchste Ausbeute mit dem Stamm *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC mit $0,25 \text{ mol L-Threonin mol Glukose}^{-1}$ erzielt. Neben der höchsten Ausbeute der DM1800-T Derivate wurde mit diesem Stamm die zweithöchste Akkumulationsrate aller untersuchten Stämme von $12,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ gemessen. Interessanterweise wurde trotz der relativ geringen und verglichen mit dem Ausgangsstamm gleichen Ausbeute von $0,22 \text{ mol (L-Threonin) mol (Glukose)}^{-1}$ die maximale L-Threonin-

Akkumulationsrate mit $13,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ für *C. glutamicum* DM1800-PC-T bestimmt. Entsprechend Beobachtungen bei *E. coli* (Kruse et al., 2002), war auch in den dort untersuchten Stämmen eine Korrelation der Akkumulationsrate an die exponentielle Wachstumsphase zu beobachten, wobei nicht erwartet wurde, dass sich Akkumulationsrate und Ausbeute in einzelnen Stämmen so stark unterscheiden. Auf Grund der Mutation des Gens *ilvA*, die zu einer inaktiven L-Threonin-Dehydratase und damit zur L-Isoleucin-Auxotrophie in *C. glutamicum* DM1800-96-T RhtC führte, konnte gezeigt werden, dass neben der Vorstufenbereitstellung auch die Reduktion des L-Threonin-Abbaus die Ausbeute, die um 20% nach 48 Stunden stark gesteigert wurde, verbessert werden konnte. Dies ist vor allem wichtig für die Produktion von Aminosäuren, die nicht am Ende eines Stoffwechselwegs stehen, sondern auch als Vorstufe dienen, wie dies auch für L-Serin der Fall ist (Stolz et al., 2006). Eine zusätzliche Limitierung bei der Umwandlung von L-Aspartat-Semialdehyd zu L-Threonin war durch die Plasmid-bedingte verstärkte Transkription der Gene *hom* und *thrB* nicht zu erwarten. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen eindeutig, dass die Nutzung heterologer Transporter aus *E. coli* Exportlimitationen in *C. glutamicum* beseitigen können.

VII. Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K., and Kinoshita, S.** (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13:279-301.
- Aleshin V.V., Zakataeva N.P., Livshits V.A.** (1999). A new family of amino-acid-efflux proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 1999; 24:133-135.
- Bellmann A., Vrljić M., Pátek M., Sahn H., Krämer R., Eggeling L.** (2001). Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 2001; 147:1765-1774.
- Bergemeyer H.U., Bernt B., Schmidt F. and Stork H.** (1974). Glucosetest. In *Methoden der enzymatischen Analysen II*, Bergemeyer H.U., ed. VCH Weinheim, pp. 359-366.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.H., Lin-Chao, S., Cohen, S.N.** (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 9697-9702.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bröer S., Krämer R.** (1991). Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur J Biochem* 1991; 202:137-143.
- Burkovski A., Krämer R.** (2002). Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 58:265-274.
- Cremer J., Eggeling L., Sahn H.** (1991). Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in *Corynebacterium glutamicum* as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Jun; 57(6):1746-1752.
- Dassler T., Maier T., Winterhalter C., Böck A.** (2000). Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol Microbiol* 2000; 36:1101-1112.
- Davanloo P., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Studier F.W.** (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Apr;81(7):2035-9.
- Debabov V.G.** (2003). The threonine story. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003;79:113-36.
- Demain A.L.** (2000). Small bugs big business: the economic power of the microbe, *Biotechnol. Adv.* **18** (6) (2000), pp. 499–514

- Diesveld R.** (2005). Untersuchungen zum Serinhydroxymethyltransferase / p-Aminobenzoatsynthase Gencluster in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Diesveld R., Tietze N., Fürst O., Reth A., Bathe B., Sahn H., Eggeling L.** (2008). Activity of Exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and Their Use to Increase L-Threonine Production. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2008 Jul 1.
- Doeven M.K., Kok J., Poolman B.** (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbiol.* 2005 Aug; 57(3):640-9.
- Doroshenko V., Airich L., Vitushkina M., Kolokolova A., Livshits V., Mashko S.** (2007). YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 275:312-318.
- Eggeling L., Morbach S. and Sahn H.** (1997). The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* 56 (1997) 167-182.
- Eggeling, L. and Sahn, H.** (1999). L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.
- Eggeling L., Pfefferle W. and Sahn H.** (2001). Amino acids. In: C. Ratledge and B. Kristiansen, Editors, *Basic Biotechnology* (second ed), Cambridge University Press, Cambridge (2001).
- Eggeling L., Sahn H.** (2003). New ubiquitous translocators: amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. *Arch Microbio.* 2003; 180:155-160.
- Eggeling L., Bott M.** (2005). Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Taylor Francis Group, 2005.
- Eggeling L., Pfefferle W., Sahn H** (2006). Amino acids. In: Basic Biotechnology, pp359-380. Ratledge C, Kristiansen B, eds. 2006; Cambridge University Press
- Eikmanns, B.; Metzger, M.; Reinscheid, D.; Kircher, M.; Sahn, H.** (1991). Amplification of three biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991; 34:617-622.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., und Botstein, D.** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868.
- Franke I., Resch A., Dassler T., Maier T., Böck A.** (2003). YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine. *J Bacteriol* 2003; 185:1161-1166.

- Fürst, O.** (2007). Ortsgerichtete Mutagenese der Threonin-Dehydratase in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena.
- Georgi T., Rittmann D., Wendisch V.F.** (2005). Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng* 2005; 7:291-301.
- Grant S.G.N., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4645-4649.
- Gunji Y., Ito H., Masaki H., Yasueda H.** (2006a). Characterization of a unique mutant lysE gene, originating from *Corynebacterium glutamicum*, encoding a product that induces L-lysine production in *Methylophilus methylotrophus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006 Dec; 70(12):2927-34.
- Gunji Y., Yasueda H.** (2006b). Enhancement of L-lysine production in methylotroph *Methylophilus methylotrophus* by introducing a mutant LysE exporter. *J Biotechnol.* 15; 127(1):1-13.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- Hanahan D.** (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA cloning* 1, pp. 109-136, Glover, D.M. (Ed.). IRL Press, Oxford
- Hänssler E., Müller T., Jessberger N., Völzke A., Plassmeier J., Kalinowski J., Krämer R., Burkovski A.** (2007). FarR, a putative regulator of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Sep; 76(3):625-32.
- Hector R.E., Qureshi N., Hughes S.R., Cotta M.A.** (2008). Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Jul 16.
- Hüser A.T., Becker A., Brune I., Dondrup M., Kalinowski J., Plassmeier J., Pühler A., Wiegräbe I., Tauch A.** (2003). Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J Biotechnol.* 2003 Dec 19;106(2-3):269-86.
- Ikeda, M., Katsumata R.** (1994). Transport of aromatic amino acids and its influence on overproduction of the amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ferment. Bioeng.* 78:420–425.
- Ikeda M., Ohnishi J., Hayashi M., Mitsuhashi S.** (2006). A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006 Jul; 33(7):610-5.

- Ishida M., Sato K., Hashiguchi K., Ito H., Enei H., Nakamori S.** (1993). High fermentative production of L-threonine from acetate by a *Brevibacterium flavum* stabilized strain transformed with a recombinant plasmid carrying the *Escherichia coli thr* operon. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993; 57:1755-1756.
- Jäger W., Schäfer A., Pühler A., Labes G., Wohlleben W.** (1992). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 174: 5462-5465.
- Jones B.N., Gilligan J.P.** (1983). *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr.* 1983 Aug 26; 266:471-82.
- Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Kramer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Mockel B., Pfeufferle W., Puhler A., Rey D.A., Ruckert C., Rupp O., Sahn H., Wendisch V.F., Wiegrabe I., Tauch A.** (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104: 5-25
- Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya A.** (1984). Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 159: 306-311
- Keilhauer C., Eggeling L., Sahn, H.** (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 175: 5595-5603.
- Kelle R., Hermann T., Bathe B.** (2005). L-Lysine production. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, pp. 465-488. eds Eggeling L, Bott M. Taylor and Francis, Boca Raton, London, New York, Singapore.
- Kennerknecht N., Sahn H., Yen M.R., Pátek M., Saier Jr. M.H. Jr., Eggeling L.** (2002). Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol* 2002; 184:3947-3956.
- Khodursky A.B., Bernstein J.A.** (2003). Life after transcription – revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet.* 19: 113-115.
- Kinoshita S., Udaka S., Shimono M.** (1957). Studies of the amino acid fermentation I. Production of L-glutamic-acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3: 193-205.

- Klammt C., Löhr F., Schäfer B., Haase W., Dötsch V., Rüterjans H., Glaubitz C., Bernhard F.** (2004). High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem.* 2004 Feb; 271(3):568-80.
- Korepanova A., Gao F.P., Hua Y., Qin H., Nakamoto R.K., Cross T.A.** (2005). Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 2005 Jan;14(1):148-58.
- Krämer R.** (2004). Production of amino acids: physiological and genetic approaches. *Food Biotechnol.* 2004; 18:171-216.
- Kronemeyer W., Peekhaus N., Krämer R., Sahn H., Eggeling L.** (1995). Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 1995 Mar; 177(5):1152-8.
- Kruse D., Krämer R., Eggeling L., Rieping M., Pfefferle W., Tchieu J.H., Chung Y.J., Jr Saier M.H., Burkovski A.** (2002). Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59:205-210.
- Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Ziyatdinov M.H., Tokmakova I.L., Zakataeva N.P.** (2005). The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett* 2005; 579:4629-4634.
- Lange C., Rittmann D., Wendisch V. F., Bott M., Sahn H.** (2003). Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69, 2521-2532.
- Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., Kim H.U., Lee S.Y.** (2007). Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol.* 2007; 3:149.
- Lehnen D., Blumer C., Polen T., Wackwitz B., Wendisch V.F., Uden G.** (2002). LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45: 521-532.
- Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K.** (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 69:1-8.
- Lindroth P., Mopper K.** (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51: 1167-1174.
- Livshits V.A., Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Vitushkina M.V.** (2003). Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 2003; 154:123-135.

- Marx A., Eikmanns B.J., Sahm H., de Graaf A.A., Eggeling L.** (1999). Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metab Eng.* 1999 Jan;1(1):35-48.
- Mateos L.M., Pisabarro A., Pátek M., Malumbres M., Guerrero C., Eikmanns B.J., Sahm H., Martín J.F.** (1994). Transcriptional analysis and regulatory signals of the *hom-thrB* cluster of *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol* 1994; 176:7362-7371.
- McGee J. und Doudoroff M.** (1954). A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *J. Biol. Chem.* 210: 617-626.
- Miller E.M., Nickoloff J.A.** (1995). *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol.* 1995;47:105-13.
- Minnikin D.E., Goodfellow M., Collins M.D.** (1978) Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. In: Bousfield, I. J., Calley, A. G., Editors, *Coryneform bacteria*, Academic Press, London, pp. 85–159.
- Miroux B., Walker J.E.** (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 1996 Jul 19; 260(3):289-98.
- Mitsuhashi S., Hayashi M., Ohnishi J., Ikeda M.** (2006). Disruption of malate:quinone oxidoreductase increases L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006 Nov;70(11):2803-6.
- Möckel B., Sahm H., Eggeling L.** (1994). Threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* with altered allosteric control: their generation and biochemical and structural analysis. *Mol Microbiol* 1994; 13:833-842.
- Mullis K.B. and Faloona F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350
- Nakamori S., Ishida M., Takagi H., Ito K., Miwa K., Sano K.** (1987). Improved L-threonine production by the amplification of the gene encoding homoserine dehydrogenase and homoserine kinase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 87-91.
- Nakamura J., Hirano S., Ito H., Wachi M.** (2007). Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCg11221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbio* 2007; 73: 4491-4498.
- Netzer R., Peters-Wendisch P., Eggeling L., Sahm H.** (2004). Cometabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Dec; 70(12):7148-55.

- Norrander J., Kempe T., Messing J.** (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. 1983 Dec;26(1):101-6.
- Ozaki A., Katsumata R., Oka T. and Furuya A.** (1984). Functional expression of genes of *Escherichia coli* in grampositive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* 96: 175-178.
- Palmieri L., Berns D., Krämer R., Eikmanns M.** (1996). Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch Microbiol* 1996; 165:48-54.
- Pascual C., Lawson P.A., Farrow J.A., Gimenez M.N. and Collins M.D.** (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. Syst. Bacteriol.* 45: 724-728
- Peters-Wendisch P., Netzer R., Eggeling L., Sahn H.** (2002). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 437-441.
- Petersen S., Mack C., de Graaf A.A., Riedel C., Eikmanns B.J., Sahn H.** (2001). Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanisms in vivo. *Metab Eng.* 2001 Oct; 3(4):344-61.
- Peti W., Page R.** (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr Purif.* 2007 Jan;51(1):1-10.
- Polen T.** (2002). Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Radmacher E., Eggeling L.** (2007). The three tricarboxylate synthase activities of *Corynebacterium glutamicum* and increase of L-lysine synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Sep;76(3):587-95. Epub 2007 Jul 26.
- Reinscheid D.J., Kronemeyer W., Eggeling L., Eikmanns B.J., Sahn H.** (1994). Stable Expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and Its Effect on the Carbon Flux to Threonine and Related Amino Acids. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:126-132.
- Rey D.A., Nentwich S.S., Koch D.J., Rückert C., Pühler A., Tauch A., Kalinowski J.** (2005). The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in

- sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol Microbiol.* 2005 May; 56(4):871-87.
- Riedel C., Rittmann D., Dangel P., Möckel B., Petersen S., Sahn H., Eikmanns B.J.** (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.* 2001 Oct; 3(4):573-83.
- Rieping M., Hermann T.** (2006). L-Threonine. *In: Amino Acid Biosynthesis: Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, pp. 71-92. Wendisch V, ed. *Microbiol Monogr* 2006; 9. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Saier M.H. Jr., Beatty J.T., Goffeau A., Harley K.T., Heijne W.H., Huang S.C., Jack D.L., Jähn P.S., Lew K., Liu J., Pao S.S., Paulsen I.T., Tseng T.T., Virk P.S.** (1999). The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999; 1:257-79.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Santamaría R., Gil J.A., Mesas J.M., Martín J.F.** (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2237-2246
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A.** (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 1994; 145:69-73.
- Schuldiner S., Lebendiker M., Yerushalmi H.** (1997). EmrE, the smallest ion-coupled transporter, provides a unique paradigm for structure-function studies. *J Exp Biol.* 1997 Jan; 200(Pt 2):335-41.
- Schwarzer A., Pühler A.** (1991). Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* 9: 84-87.
- Schweitzer J.-E., Stolz M., Diesveld R., Etterich H., Eggeling L.** (2008). Regulation of *glyA* Expression Encoding Serine hydroxymethyltransferase of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* Submitted.
- Shalon D., Smith S.J., Brown P.O.** (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6: 639-645.

- Simic P., Sahn H., Eggeling L.** (2001). L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 2001; 183:5317-5324.
- Simic P., Willuhn J., Sahn H., Eggeling L.** (2002). Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:3321-3327. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:133-135
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. and Klenk D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85
- Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L.** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2): 479-491.
- Stolz M., Peters-Wendisch P., Etterich H., Gerharz T., Faurie R., Sahn H., Fersterra H., Eggeling L.** (2006). Reduced folate supply as a key to enhanced L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Feb; 73(3):750-5.
- Tatituri R.V., Alderwick L.J., Mishra A.K., Nigou J., Gilleron M., Krumbach K., Hitchen P., Giordano A., Morris H.R., Dell A., Eggeling L., Besra G.S.** (2007). Structural characterization of a partially arabinosylated lipoarabinomannan variant isolated from a *Corynebacterium glutamicum ubiA* mutant. *Microbiology.* 2007 Aug; 153(Pt 8):2621-9.
- Tietze N.** (2004). Untersuchungen Threoninexportcarriern aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Trötschel C., Deutenberg D., Bathe B., Burkovski A., Krämer R.** (2005). Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 2005 Jun; 187(11):3786-94.
- Vrljić M., Sahn H., Eggeling L.** (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* 1996; 22:815-826.
- Vrljić M., Garg J., Bellmann A., Wachi S., Freudl R., Malecki M.J., Sahn H., Kozina V.J., Eggeling L., Saier M.H. Jr., Eggeling L., Saier M.H. Jr.** (1999). The LysE superfamily: topology of the lysine exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; 1:327-336.

- Wagner S., Klepsch M.M., Schlegel S., Appel A., Draheim R., Tarry M., Högbom M., van Wijk K.J., Slotboom D.J., Persson J.O., de Gier J.W.** (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Wehrmann A., Morakkabati S., Krämer R., Sahn H., Eggeling L.** (1995). Functional analysis of sequences adjacent to *dapE* of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of *aroP*, which encodes the aromatic amino acid transporter. *J Bacteriol.* 1995 Oct; 177(20):5991-3.
- Wendisch V.F., Zimmer D.P., Khodursky A., Peter B., Cozzarelli N., Kustu S.** (2001). Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal Biochem.* 2001; 290:205-213.
- Wendisch V.F.** (2003) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* 104: 273-285.
- Winnen B., Felce J., und Saier M.H. Jr.** (2005). Genomic analyses of transporter proteins in *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebacterium efficiens*. In *Handbook on Corynebacterium glutamicum*. Edited by L. Eggeling & M. Bott. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Yen M.R., Tseng Y.H., Simic P., Sahn H., Eggeling L., Saier M.H. Jr.** (2002). The ubiquitous ThrE family of putative transmembrane amino acid efflux transporters. *Res Microbiol* 2002; 153:19-25.
- Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Tokmakova I.L., Troshin P.V., Livshits V.A.** (1999). The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett* 1999; 452:228-232.
- Zakataeva N.P., Kutukova E.A., Gronskii S.V., Troshin P.V., Livshits V.A., Aleshin V.V.** (2006). Export of metabolites by the proteins of the DMT and RhtB families and its possible role in intercellular communication. *Mikrobiologiya* 2006; 75:509-520.
- Zimmer D.P., Soupene E., Lee H.L., Wendisch V.F., Khodursky A.B., Peter B.J., Bender R.A., Kustu S.** (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14674-14679.

VIII. Anhang

Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Alle Sequenzen sind in 5' -> 3'-Richtung dargestellt. Die relevanten Merkmale der Oligonukleotide sind unterstrichen (Restriktionsschnittstellen) und die dazugehörigen Restriktionsanalysen aufgelistet.

	Name	Sequenz (5'-3')	Restriktions- endonuklease
1	pEKEEx2_MCS_for	TGCAGGTCGTAATCACTGC	
2	pEKEEx2_MCS_rev	TCGACTGAGCCTTTCGTTTT	
3	pEKEEx2_yahN_for	CCGTTTACCTGACCGTAGGA	
4	pEKEEx2_yahN_rev	ATTGATGCGAGCACAATCC	
5	pEKEEx2_yfiK_for	CCCTGATTACCGCTATGACG	
6	pEKEEx2_yfiK_rev	TGCCGTAACACCGTACAAAA	
7	pEKEEx2_yeaS_for	CGGTATGAAAGGCGGTTATC	
8	pEKEEx2_yeaS_rev	GCCGCCAGAATAAAGAATGA	
9	pEKEEx2_rhtA_for	CCTCATCGCGTTCCTTAAGC	
10	pEKEEx2_rhtA_rev	CACGAAAATTAACGCTGCAA	
11	pEKEEx2_rhtB_for	ACCTTAAATCGCTGGCCTCT	
12	pEKEEx2_rhtB_rev	GCTCCCACCAGCATAAACA	
13	pEKEEx2_rhtC_for	CTGGCTGCATACGCTGATTA	
14	pEKEEx2_rhtC_rev	ATCAATCCACTTCGCCAGAC	
15	gyrA-forward	GTCGGACGTGCCCTCCAG	
16	gyrA-reverse	GGCCGTCTACCAGCGGGTAT	
17	ddh-forward	ACGTGCTGTTCTGTGCATGG	
18	ddh-reverse	GCTCGGCTAAGACTGCCGCT	
19	LC_yahN_for	CCGGGTGGGTTTGTGGT	
20	LC_yahN_rev	GGGGCGCTAATCGGTTGTTG	
21	LC_yfiK_for	ATGACGCCAGGACCGAACAA	
22	LC_yfiK_rev	TTCCACGCCAGCCAGACAAT	
23	LC_yeaS_for	GGGCTGGAGTGGCGACATTA	
24	LC_yeaS_rev	CACCGTATTGGGGCTCATCG	
25	LC_rhtA_for	CGCTGATCCTCATCGCGTTC	
26	LC_rhtA_rev	CAAGAACCGCCAGCACAACC	
27	LC_rhtB_for	TCGCGTCGACATTTGTTCCA	
28	LC_rhtB_rev	CGTTGAGCAAGGGTGGCGTA	
29	LC_rhtC_for	CCCCGGTCCCGATTCTTTT	
30	LC_rhtC_rev	CACCGCCCACCATAATCAGC	
35	LC hom for	GCCACGTGAAGGCGTTGCAC	
36	LC hom rev	TTGCGCCTGCAACAGCAGCC	
37	LC thrB for	TCCTGGATTGCGAGTGGTGTG	
38	LC thrB rev	TCGATGTGAGTGACTTCAGTGG	

Tabelle 15(ff): In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Alle Sequenzen sind in 5' -> 3'-Richtung dargestellt. Die relevanten Merkmale der Oligonukleotide sind unterstrichen (Restriktionsschnittstellen) und die dazugehörigen Restriktionsanalysen aufgelistet.

	Name	Sequenz (5'-3')	Restriktionsendonuklease
39	LC rhtA for	GCGCTGCGTCTGGCATTAGG	
40	LC rhtA rev	AACCACAGACCAAGAACCGCC	
41	LC rhtC for	TTCTGCACCTGCGCCACAGG	
42	LC-rhtC-rev2	ACTTCGCCAGACGTTGATAACC	
43	LC rhtC rev	GGTTATCAACGTCTGGCGAAGT	
46	hom-Std-for	GTCGGAATTGCCCTTTTAGG	
47	thrB-Std-for	CGTCACGGTACCTGGATCTT	
48	rhtA-Std-for	GCCGGTCTGGTTACCAATAG	
49	rhtC-Std-for	GTTCCCGTAAAGAAGCGATG	
31	yahN_Ec_Bam_for	ACACGGATCCATCTCTCTCGCAC	BamHI
32	yahN_Ec_Eco_rev	CTTAGAATTCATAAGGACCACGC	EcoRI
33	rhtA_BamHI_for2	ATATAAGGATCCAATACGCATGT TTCCCTGTCA	BamHI
34	rhtA_BamHI_rev2	ATATAAGGATCCAAAGCGAGAA ATTCTGCATGGT	BamHI
44	rhtA-for-BamHI	GTATGGATCCTGTTTTCCCTGTCA TTCATCC	BamHI
45	rhtA-rev-BamHI	TAGAGGATCCGTAGCGAGAAATT CTGCATGG	BamHI
50	rhtC-NdeI-for	TTGCCATATGTTGATGTTATTTCT CACCGT	NdeI
51	rhtC-XhoI-rev	TGTGCTCGAGCCGCGAAATAATC AAATGAATGC	XhoI
52	rhtC-NcoI-for	TTGCCCATGGTGTGATGTTATTTCTC ACCGTCGCAATGGTG	NcoI
53	rhtC-NcoI-for2	GGTTGCCCATGGTGTGATGTTATTT CTCACCGTCGCGATGGTGCAC	NcoI
54	rhtC-SalI-rev	TGTGGTTCGACCCGCGAAATAATC AAATGAATGC	SalI
55	lysE-Mt-NdeI-for	TTGCCATATGGTGAACCTCACCAC TGGTCGTCGG	NdeI
56	lysE-Mt-XhoI-rev	TGTGCTCGAGGGTCACGGTCAGC GAGATTCCCAG	XhoI
57	lysE(MWG)-NdeI-for	GTTCCGGTTCATATGGTTAATTCG CCCTTGGTGGTTCGGG	NdeI
58	lysE(MWG)-XhoI-rev	GTTCCGGTTCGAGGGTCACGGT CAGGCTGATGCCGAGCGC	XhoI
59	ubiA-Mt-NdeI-for	TTGCCATATGAGTGAAGATGTGG TGACTCA	NdeI
60	ubiA-Mt-XhoI-rev	TGTGCTCGAGGCCGAAGGCAAC AGCGGCCCAAC	XhoI

Tabelle 15(ff): In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Alle Sequenzen sind in 5' -> 3'-Richtung dargestellt. Die relevanten Merkmale der Oligonukleotide sind unterstrichen (Restriktionsschnittstellen) und die dazugehörigen Restriktionsanalysen aufgelistet.

	Name	Sequenz (5'-3')	Restriktionsendonuklease
61	ubiA(MWG)-NdeI-for	GTTCGGTTCATATGGCAATGTCTG AGGATGTGGTGA <u>CTCAGC</u>	NdeI
62	ubiA(MWG)-XhoI-rev	GTTCGGTTC <u>TCGAGATCGACCCCA</u> AACGCCACTGCAGCTCC	XhoI
63	hom thrB-for-BamHI	CAAAGGGATCCGACAACAACGCT CGACCGCG	BamHI
64	hom thrB-rev-EcoRI	TAAGGCGAATTC <u>TTGATT</u> CGAAGG GGCCTTCC	EcoRI
65	rhtC-for-SalI	GAGCTCGT <u>CGACA</u> AAGGAGATATAG ATATGTTGATG	SalI
66	rhtC-rev-BamHI	GCCAGTGGATCC <u>TACCGCGAAAT</u> AATCAAATG	BamHI
67	PglA upstream	ATGAGTCCGAAGGTTGCTGCAT	
68	PglA rev (gltA downstream)	TCGAGTGGGTT <u>CAGCTGGTCC</u>	
69	glyA-Prom for	GTGTTGCCCGAAAACATTGAGAGA ACTCATGCGCGCGAAACGATGG	
70	glyA-Prom rev	GCGTTGAAGATGTGTGAGTCGACA CCAGGTCAGCTAACCTTTCACAAG ACG	
71	pyc-A-for	ATAGCGATAGCGAATTC <u>CACGCGC</u> CAAGATGCGTTCCTGC	EcoRI
72	pyc-A-rev	CTCTCAATGTTTTCGGGCAACAC	
73	pyc-B-for	GTGTCGACTCACACATCTTCAACG C	
74	pyc-B-rev	ATAGCGATAGCGAATTC <u>TCCGCCA</u> CCACCGGCAACTGCC	EcoRI
75	Ppyc-out-for	ACGCGCCAAGATGCGTTCCTGC	
76	Ppyc-out-rev	TCCGCCACCACCGGCAACTGCC	
77	Ppyc-in-for	AACTCATGCGCGCGAAACGATGG	
78	Ppyc-in-rev	CAGGTCAGCTAACCTTTCACAAGA CG	

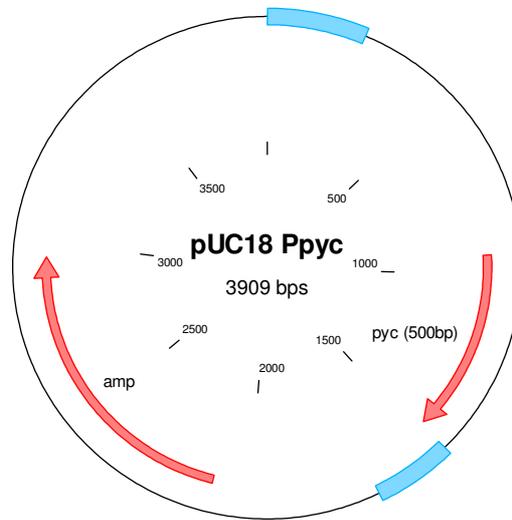


Abbildung 31: Plasmidkarte von pUC18 Ppyc. Das durch Crossover-PCR entstandene Konstrukt zum Austausch des nativen Promotors des Gens *pyc* durch den *glyA*-Promotor wurde in das durch *Sma*I linearisierte Plasmid kloniert.

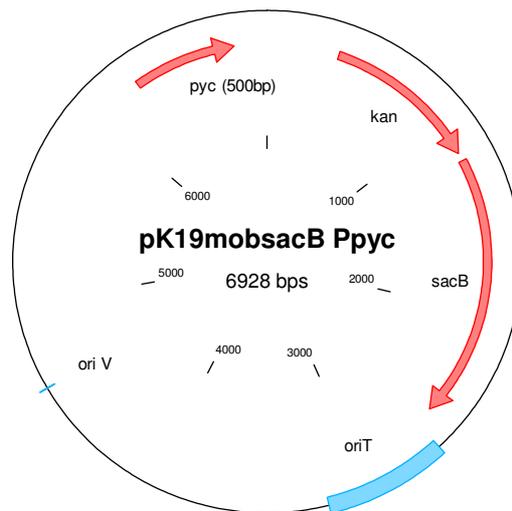


Abbildung 32: Plasmidkarte des Integrationsvektors pK19*obsacB* P_{pyc}. In den Vektor wurde zum chromosomalen Austausch des nativen Promotors des Gens *pyc* durch den *glyA*-Promotor, das aus pUC18 P_{pyc} über EcoRI gewonnene Fragment kloniert.

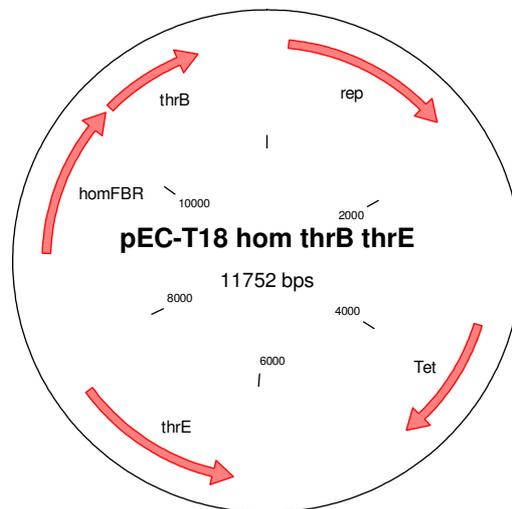


Abbildung 33: Plasmidkarte von pEC-T18 *hom^{fbr} thrB thrE*. Das Fragment *hom^{fbr} thrB* wurde über Sall aus dem Vektor pEK0 *hom^{fbr} thrB* gewonnen und in den in das Plasmid pEC-T18 *mob2 thrE* kloniert.

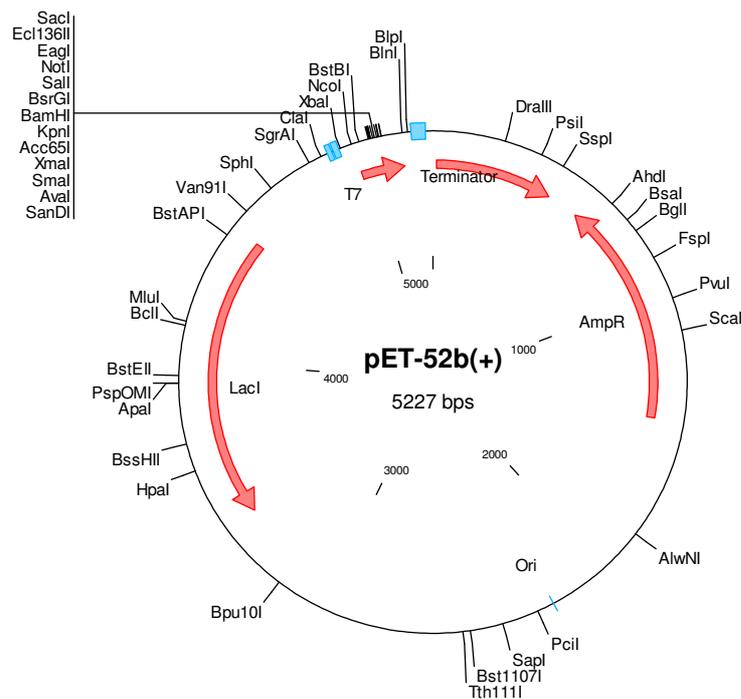


Abbildung 34: Plasmidkarte von pET-52b(+). Expressionsplasmid durch das N-terminal ein StrepII-Tag und C-terminal ein His-Tag und eine Thrombin-Schnittstelle angefügt werden können.

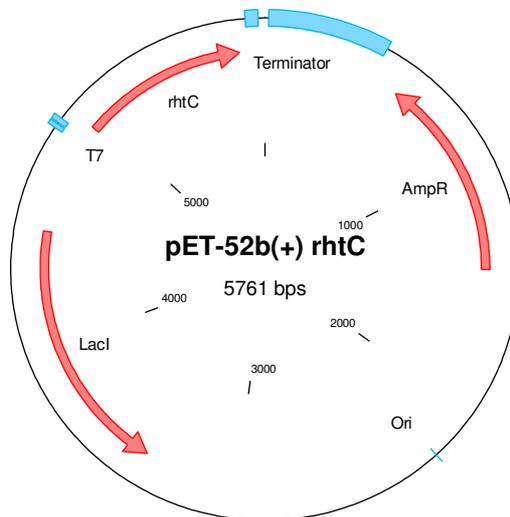


Abbildung 35: Plasmidkarte von pET-52b(+) *rhtC*. Das Gen *rhtC* wurde über die Schnittstellen NcoI und SalI in das Plasmid kloniert, so dass ein C-terminaler His-Tag und eine Thrombin-Schnittstelle an das gebildete Protein angefügt werden.

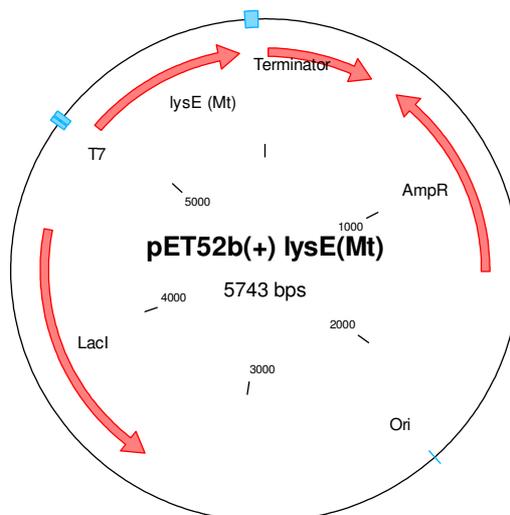


Abbildung 36: Plasmidkarte von pET-52b(+)*lysE*^{Mt}. Das Gen *lysE*^{Mt} wurde über die Schnittstellen NcoI und SalI in das Plasmid kloniert, so dass ein C-terminaler His-Tag und eine Thrombin-Schnittstelle an das gebildete Protein angefügt werden.

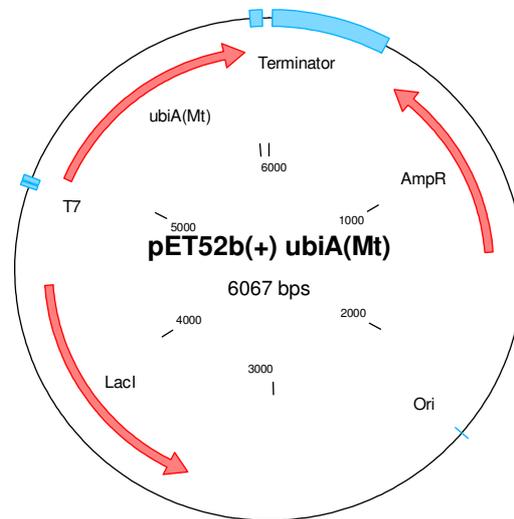


Abbildung 37: Plasmidkarte von pET-52b(+)*ubiA*^{Mt}. Das Gen *ubiA*^{Mt} wurde über die Schnittstellen NcoI und SalI in das Plasmid kloniert, so dass ein C-terminaler His-Tag und eine Thrombin-Schnittstelle an das gebildete Protein angefügt werden.

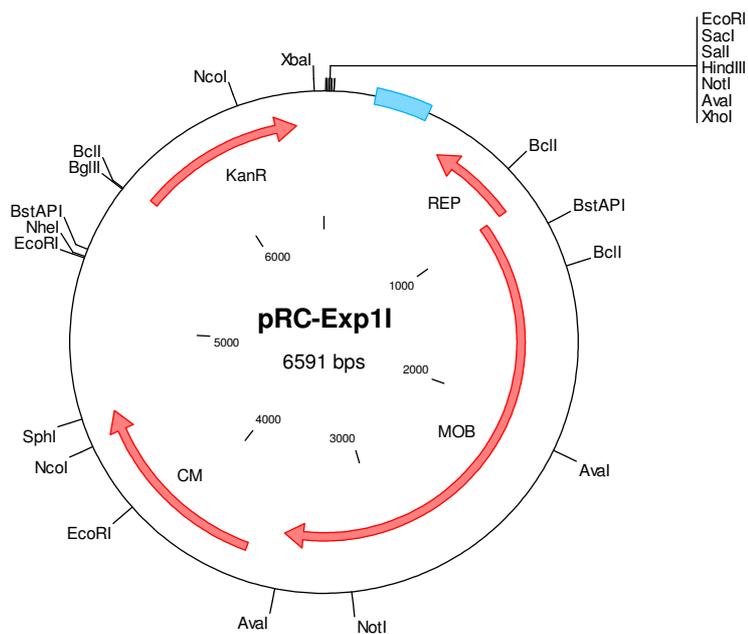


Abbildung 38: Plasmidkarte von pRC-Exp1I. Derivat des Expressionsplasmid pET-22b(+) durch das C-terminal ein His-Tag angefügt werden kann und das zusätzlich ein Replikon für *R. capsulatus* beinhaltet.

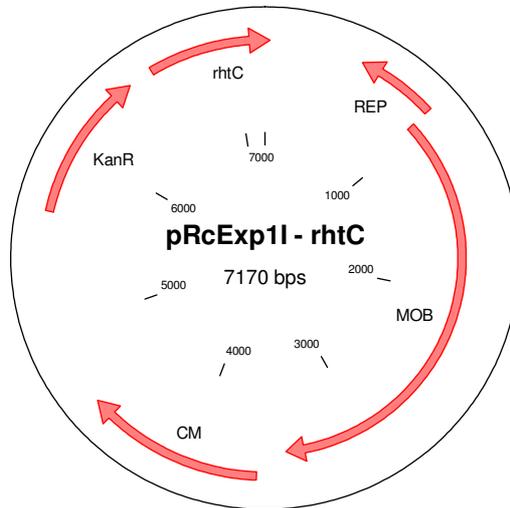


Abbildung 39: Plasmidkarte von pRC-Exp1I *rhtC*. Das Gen *rhtC* wurde über die Schnittstellen NdeI und XhoI in das Plasmid kloniert, so dass ein C-terminaler His-Tag an das gebildete Protein angefügt wird.

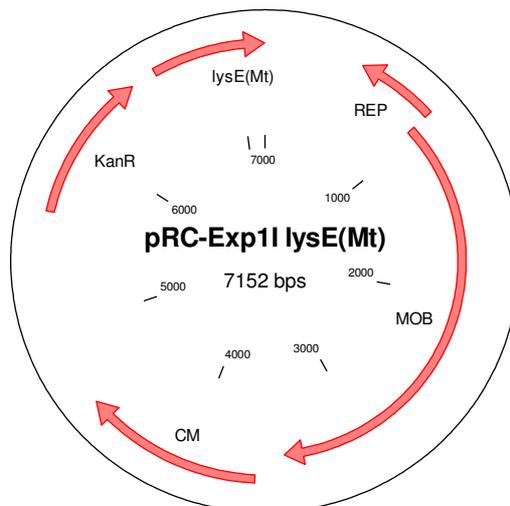


Abbildung 40: Plasmidkarte von pRC-Exp1I *lysE*^{Mt}. Das Gen *lysE*^{Mt} wurde über die Schnittstellen NdeI und XhoI in das Plasmid kloniert, so dass ein C-terminaler His-Tag an das gebildete Protein angefügt wird.

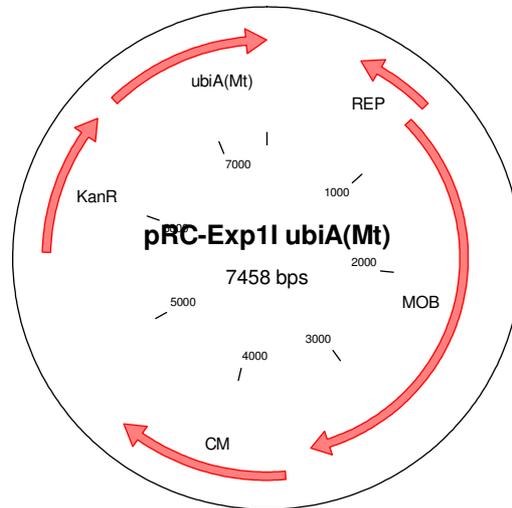


Abbildung 41: Plasmidkarte von pRC-Exp1I *ubiA*^{Mt}. Das Gen *ubiA*^{Mt} wurde über die Schnittstellen NdeI und XhoI in das Plasmid kloniert, so dass ein C-terminaler His-Tag an das gebildete Protein angefügt wird.

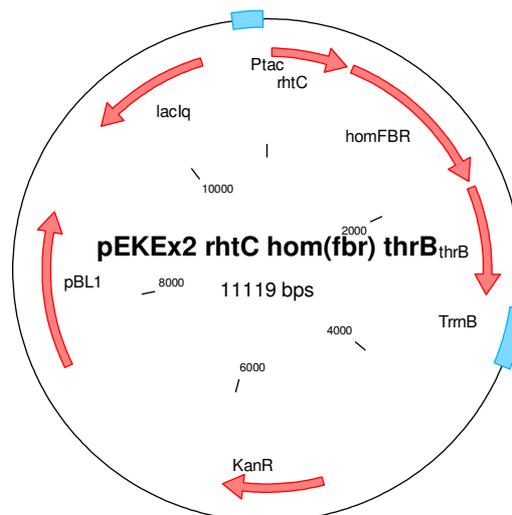


Abbildung 42: Plasmidkarte von pEKEEx2 *rhtC* *hom*^{fbr} *thrB*. Das Gen *rhtC* wurde mit den Schnittstellen SalI und BamHI und das Operon *hom*^{fbr} *thrB* mit den Schnittstellen BamHI und EcoRI generiert. Zusammen wurden die Fragmente in den Vektor pEKEEx2 kloniert.

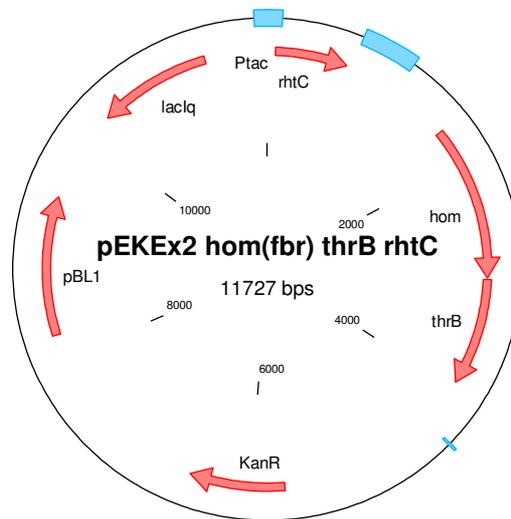


Abbildung 43: Plasmidkarte von pEKEEx2 *hom*^{fbr} *thrB* *rhtC*. Das Fragment *hom*^{fbr} *thrB* über die Schnittstelle SmaI aus dem Plasmid pEC-T18 *hom*^{fbr} *thrB* *thrE* präpariert und in den über die DraI Schnittstelle linearisierten Vektor pEKEEx2 *rhtC* kloniert.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seiner konstruktiven Kritik und seinem Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Eggeling möchte ich besonders danken für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft, seine Motivation und sein immer offenes (Hörr)Ohr.

Allen Mitgliedern des Instituts für Biotechnologie-1 danke ich für die gute und freundliche Atmosphäre im und auch außerhalb des Instituts.

Meinen Diplomanden Oliver Fürst und Peter Ilse möchte ich für fleißigen, unermüdlichen Einsatz, Begeisterung für das Thema und blauen Flecken auf dem Fußballfeld danken.

Danken möchte ich Karin Krumbach und Laure Botella, für die geteilte morgendliche Kaffee-Sucht.

Allen ehemaligen und aktuellen AG Eggelings bestehend aus Lothar Eggeling, Karin Krumbach, Helga Etterich, Michael Stolz, Roman Netzer, Jens Nickel, Jens Schweitzer, Jan Marienhagen, Oliver Fürst, Peter Ilse, Mathias Seidel, Christina Klein, Jan van Ooyen, Eva Radmacher, Roland Gande, Norma Stähler, Katharina Raasch, Laure Botella und Melanie Hoffelder danke ich für eine tolle Zeit und viel Spaß sowohl in Gebäude 15.4 als auch außerhalb. Dabei gilt mein besonderer Dank allen aus Raum 119, mit denen ich wohl die meiste Zeit verbracht habe.

Jens Nickel für zügige Fahrten zur und vor allem weg von der Arbeit und für viel Spaß Rund um Jülich und in Aachen.

Meinen Freunden, meinen Eltern und meiner Verlobten möchte ich ganz besonders für ihren grenzenlosen Rückhalt und ihr Vertrauen in mich danken.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese, in der vorgelegten oder in ähnlicher Form, noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Darüber hinaus habe ich noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Kleve, den

Ramon Pascal Diesveld