

**Untersuchungen zur Bildung von
D-Aminosäuren mit
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural – Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Norma Christine Stäbler

aus Recklinghausen

Oktober 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. Oktober 2007 bis zum 30. September 2010 am Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH unter der Leitung von Herrn Universitäts-Professor Dr. Michael Bott durchgeführt.

Die Finanzierung dieser Arbeit erfolgte durch die Amino GmbH (Frellstedt, Deutschland).

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

Korreferent: Prof. Dr. V. Urlacher
Institut für Biochemie II
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Teile dieser Arbeit erschienen in folgenden Publikationen:

Matsui D, Oikawa T, Arakawa N, Osumi S, Lausberg F, Stähler N, Freudl R, Eggeling L (2009) A periplasmic pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid racemase in *Pseudomonas taetrolens*. *Appl Microbiol Biotechnol* (83) 1045-1054

Stähler N, Oikawa T, Eggeling L. *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-amino acids. *J Bac* (in Vorbereitung)

Patentanmeldung:

Eggeling L, Stähler N, Bott M, Oikawa T (2010) Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren, Mikroorganismus, sowie Vektor (DPA 102010025124.0-41)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Produktion von Aminosäuren mit <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
1.2 D-Aminosäuren	6
1.2.1 Rolle von D-Aminosäuren in der Natur	6
1.2.2 D-Aminosäuren als Produkt für die Industrie	8
1.2.3 Produktion von D-Aminosäuren	9
1.3 Racemasen.....	11
1.4 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Enzyme	14
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	14
2.3 Oligonukleotide	17
2.4 Konstruktion von Plasmiden	18
2.5 Kultivierungsbedingungen	20
2.5.1 Nährmedien	20
2.5.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	21
2.5.3 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	22
2.5.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen.....	22
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.7 Rekombinante DNA-Techniken.....	24
2.7.1 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.7.2 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.7.3 Herstellung elektro-kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	25
2.7.4 Transformation elektro-kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	26
2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion.....	26
2.8.1 <i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA-Fragmenten	26
2.8.2 Kolonie-PCR	27
2.8.3 Quantitative Real-Time PCR.....	27
2.9 DNA-Microarray-Technologie.....	28

2.9.1	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	28
2.9.2	DNA-Chip-Hybridisierung.....	29
2.9.3	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	30
2.10	DNA-Sequenzanalyse	30
2.11	Biochemische Methoden	31
2.11.1	Zellaufschluss mittels Ultraschall	31
2.11.2	Nachweis von Proteinen im Kulturüberstand von <i>C. glutamicum</i>	31
2.11.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	32
2.11.4	Chromatographische Methoden	32
2.11.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.11.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	33
2.11.7	Gelretardationsanalysen	34
2.12	Messung von Enzymaktivitäten	35
2.12.1	Messung der Racemaseaktivität.....	35
2.12.2	Messung der Aktivität der Tryptophan-Synthase.....	35
2.13	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels RP-HPLC.....	36
2.13.1	Quantitativer Nachweis von L-Aminosäuren.....	36
2.13.2	Trennung und quantitativer Nachweis von Enantiomeren.....	37
2.13.3	Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen.....	38
2.13.4	Bestimmung von Exportraten.....	39
2.14	Nachweis der Bindung eines Effektors an ein Zielprotein.....	39
2.14.1	Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz.....	39
2.14.2	Gelretardationsexperimente.....	40
2.14.3	Nachweis der Ganz-Zell-Fluoreszenz mittels FACS	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Verhalten von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 gegenüber D-Aminosäuren.....	42
3.1.1	Wachstum mit verschiedenen D-Aminosäuren.....	42
3.1.2	Abbau verschiedener D-Aminosäuren	43
3.1.3	Untersuchungen zum Abbau von D-Serin.....	44
3.2	Bildung von D-Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	46
3.2.1	Chemische Racemisierung von Serin.....	46
3.2.2	Enzymatische Racemisierung.....	47
3.2.3	Bildung von D-Serin mit <i>C. glutamicum</i> Ser4- <i>argR</i>	51
3.2.4	Abbau von L-Serin über die Tryptophan-Synthase.....	56
3.2.5	Bildung von D-Arginin, D-Lysin und D-Ornithin	59
3.3	Transport von D-Aminosäuren in <i>C. glutamicum</i>	61
3.3.1	Identifizierung von LysE als Exporter von D-Lysin.....	61
3.3.2	Heterologe Expression von <i>lysG</i>	64
3.3.3	Eingrenzung des Bindebereiches von LysG in der Promotorregion von <i>lysE</i>	66
3.3.4	Untersuchungen zur Spezifität der Effektorbindung an LysG	69

4	Diskussion	76
4.1	Verhalten von <i>C. glutamicum</i> gegenüber D-Aminosäuren	76
4.2	Bildung von D-Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	78
4.3	Transport von D-Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	80
4.4	Ausblick.....	83
	Literaturverzeichnis	84
	Danksagung	103
	Erklärung	104

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
%	Prozent
Ω	Ohm
∅	Durchmesser
μ	mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenin
A	Ampere
ABS	<i>activation binding site</i>
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BocC	Boc-L-Cystein
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cystein
CAPS	3-Cyclohexamino-propan-Sulfonsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cm	Chloramphenicol
CP	<i>crossing point</i>
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleotid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> bzw. <i>et alii</i> (lat., „und andere“)
F	Farad

f	femto (10^{-15})
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fw	<i>forward</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
Glu	Glutamat
h	<i>hour</i>
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IBT	Institut für Biotechnologie
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
l	Liter
LB	Luria Broth
Lys	Lysin
LTTR	<i>LysR-type transcriptional regulator</i>
m	milli (10^{-3})
m	Meter
M	molar
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minute
mol	Mol
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optische Dichte

OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
ORF	<i>open reading frame</i>
Orn	Ornithin
p	pico (10^{-12})
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	Konzentration des Wasserstoffs
pI	isoelektrischer Punkt
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
RBS	<i>ribosome binding site</i>
RBS	<i>recognition binding site</i>
Rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Spec	Spectinomycin
ss	<i>single stranded</i>
T	Thymin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
Thr	Threonin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transport RNA
Trp	Tryptophan
w/v	<i>weight/volume</i>
U	<i>unit</i>
U	Uracil
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>

Zusammenfassung

Obwohl sie in der Natur relativ selten vorkommen, spielen D-Aminosäuren für die Industrie, zum Beispiel zur Synthese von Antibiotika und anderen Pharmazeutika, eine große Rolle. Im Gegensatz zu den L-Aminosäuren, die im Wesentlichen fermentativ aus Zuckern gewonnen werden, sind die Produktionswege für D-Aminosäuren durch die Kombinationen enzymatischer und chemischer Schritte aufwendig und kostenintensiv. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Potential von *Corynebacterium glutamicum* zur Bildung von D-Aminosäuren untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Die Zugabe von 100 mM der D-Aminosäuren D-Threonin, D-Lysin, D-Arginin, D-Alanin, D-Serin, D-Asparagin oder D-Methionin führte nur zu einer geringen Reduktion der Wachstumsrate. Ein Abbau konnte nur für D-Alanin und D-Serin festgestellt werden.
- (2) Die Racemase ArgR aus *Pseudomonas taetrolens* war bei Bildung einer um das N-terminale Signalpeptid verkürzten Variante in *C. glutamicum* cytoplasmatisch lokalisiert und zeigte sowohl mit Lysin, Arginin und Ornithin als auch mit Serin als Substrat Aktivität.
- (3) Die Expression von *argR* in einem L-Serin-Produktionsstamm von *C. glutamicum* führte überraschenderweise zur Bildung eines Überschusses von D- gegenüber L-Serin. Nach 120 Stunden Fermentation wurden dabei 81 mM D- und 26 mM L-Serin gebildet. Zusätzlich erhöhte sich die Gesamt-Serinausbeute um 50 %.
- (4) Im Gegensatz dazu führte die Expression von *argR* in einem L-Lysin-, L-Arginin- oder L-Ornithin-Produktionsstamm zur Bildung äquimolarer Mischungen der jeweiligen Enantiomere. Dabei wurden, in Abhängigkeit von der Produktionskapazität der Ausgangsstämme, 29 mM D-Lysin, 3 mM D-Arginin und 48 mM D-Ornithin gebildet.
- (5) D-Aminosäuren wie D-Serin, D-Lysin, D-Arginin und D-Ornithin wurden aus den Zellen von *C. glutamicum* exportiert. Über Dipeptid-Experimente konnte dabei der spezifische Lysin-Transporter LysE als Exporter von D-Lysin identifiziert werden. Die Affinitäten für beide Enantiomere schienen vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurde D-Serin mit einer Exportrate von $16 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ mehr als doppelt so schnell exportiert als das entsprechende L-Enantiomer, was auf einen spezifischen Exporter hinweist.
- (6) LysG, der Transkriptionsregulator von *lysE*, bildet in Lösung ein Tetramer und bindet an ein 88 bp-großes Fragment im intergenischen Bereich von *lysE* und *lysG*. Die Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz deutet an, dass beide Enantiomere von Lysin als Effektoren von LysG dienen können.

Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass Bakterien auch direkt zur Produktion von D-Aminosäuren aus Zuckern eingesetzt werden können, und dass über die Beeinflussung des Exports extrazellulär möglicherweise sogar bevorzugt die Akkumulation des D-Enantiomers möglich ist.

Abstract

Although rare in nature, D-amino acids are of great importance for industry as they serve as building blocks for the synthesis of antibiotics and pharmaceuticals. In contrast to L-amino acids, which are produced mostly via fermentation from sugars, almost all processes for D-amino acid production combine chemical and enzymatical steps and therefore are both extensive and expensive. Consequently, the main objective of this study was to analyse the potential of *Corynebacterium glutamicum*, which is an important organism in white biotechnology, to produce D-amino acids. This yielded the following results:

- (1) The addition of 100 mM D-threonine, D-lysine, D-arginine, D-alanine, D-serine, D-asparagine or D-methionine led to only a slight reduction in the growth rate of *C. glutamicum*. Degradation could be observed for D-alanine and D-serine only.
- (2) The racemase ArgR from *Pseudomonas taetrolens* was shown to be localized in the cytoplasm of *C. glutamicum* when expressed without the N-terminal signal peptide. The enzyme is active with the substrates lysine, arginine and ornithine as well as with serine.
- (3) Surprisingly, expression of *argR* in an L-serine producing strain led to the formation of an excess of D-serine compared to L-serine. After 120 hours of fermentation 81 mM D- and 26 mM L-serine accumulated in the supernatant of the culture. Furthermore the total serine yield was extended to 150 %.
- (4) In contrast, expression of *argR* in an L-lysine, L-arginine or L-ornithine producing strain led to the formation of equimolar mixtures of both enantiomers. According to the production capacity of the initial strains, 29 mM D-lysine, 3 mM D-arginine and 48 mM D-ornithine were produced.
- (5) It is evident that D-serine, D-lysine, D-arginine and D-ornithine are excreted by *C. glutamicum*. For D-lysine the basic amino acid transporter LysE could be shown to participate in export and both enantiomers seem to be exported with comparable affinities. Nevertheless, with an export rate of $16 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ D-serine was excreted at a 2-fold increased rate although the cytosolic concentrations of D- and L-serine were almost identical. This suggests the existence of a specific exporter.
- (6) LysG, the transcriptional regulator of *lysE*, is a tetramer in solution and binds to an 88 bp fragment in the intergenic region of *lysE* and *lysG*. As determined by fluorescence spectroscopy LysG accepts both enantiomers of lysine as coinducers.

Therefore, for the first time it could be demonstrated that bacteria can be used for the production of D-amino acids from cheap precursors like sugars. Additionally, the preferential extracellular accumulation of the D-enantiomer seems to be possible by engineering the export of the specific enantiomer

1 Einleitung

1.1 Produktion von Aminosäuren mit *Corynebacterium glutamicum*

Als Bestandteil der Proteine, die vom Metabolismus über die Struktur bis zur Kommunikation an allen wichtigen Funktionen eines Organismus beteiligt sind, gehören Aminosäuren zu den Grundbausteinen des Lebens. Als Zusatzstoff für Futter- und Lebensmittel, sowie Baustein vieler Pharmazeutika spielen Aminosäuren zusätzlich auch in der Industrie eine große Rolle. Mit einer Jahresproduktion von etwa 1,8 Millionen Tonnen nimmt der Geschmacksverstärker L-Glutamat dabei den größten Marktanteil ein (Nakamura *et al.*, 2007). Ebenso wie die als Futterzusatz in der Tiermast genutzte essentielle Aminosäure L-Lysin, von der jährlich etwa 0,9 Millionen Tonnen produziert werden (Leuchtenberger *et al.*, 2005), wird auch L-Glutamat ausschließlich fermentativ aus Zucker hergestellt. Die dazu verwendeten Stämme leiten sich von *Corynebacterium glutamicum* ab, das damit einen der bedeutendsten Mikroorganismen der weißen Biotechnologie darstellt (Eggeling & Sahm, 1999).

C. glutamicum ist ein gram-positives Bodenbakterium, das von Udaka und Kinoshita auf der Suche nach einem Glutamat-Produzenten erstmals 1957 in Japan isoliert wurde (Kinoshita *et al.*, 1957) und zunächst *Micrococcus glutamicus* genannt wurde. Ausschlaggebend für den neuen Namen waren schließlich die keulenförmige Gestalt einiger *Corynebacteriaceae*, sowie die Fähigkeit zur Bildung von L-Glutamat. *C. glutamicum* gehört zu den Actinomyceten, ist unbeweglich, schnell wachsend und biotin-auxotroph (Abe *et al.*, 1967; Pascual *et al.*, 1995). Obwohl die *Corynebacteriaceae* zu den gram-positiven Eubakterien gezählt werden, besitzen sie eine äußere Membran, die der der gram-negativen Bakterien ähnelt (Chami *et al.*, 1995). Allerdings ist diese äußere Membran aus Mykolsäuren aufgebaut, die ausschließlich in *Corynebacteriaceae* vorkommen (Zuber *et al.*, 2008). Ferner besitzen diese Organismen Arabinogalaktan in der Zellwand, sowie auf Mannose aufbauende Glykolipide (Alderwick *et al.*, 2007). Dieser einzigartige Zellwandaufbau ist eine Besonderheit der *Corynebacteriaceae* und unter anderem Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Antibiotika. Neben apathogenen Arten wie *C. glutamicum*, gehören nämlich auch pathogene Arten wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae* oder *Corynebacterium urealyticum* zu den *Corynebacterineae* (Eggeling *et al.*, 2005). Da diese Arten nur mit deutlich höherem Aufwand kultiviert werden können, wird *C. glutamicum* neben der Rolle als Aminosäureproduzent auch als Modellorganismus zur biochemischen Charakterisierung der Zellwandsynthese dieser Organismengruppe genutzt (Bhowruth *et al.*, 2008).

Aufgrund der großen Bedeutung von *C. glutamicum* wurde das 3,3 Millionen Basenpaar-große Genom im Jahr 2003 parallel an der Universität in Bielefeld und der Kitasato Universität in Japan sequenziert (Ikeda & Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003; Tauch *et al.*, 2002b). Während früher die Optimierung von Produktionsstämmen hauptsächlich auf klassischer Mutagenese beruhte, können Stämme heute aufgrund der Kenntnis des gesamten Genoms und vielfältiger Methoden zur graduellen Genexpression und Gendeletion (Eikmanns *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1990; Schafer *et al.*, 1994), sowie der Kenntnisse vieler Stoffwechselwege und -flüsse rational entwickelt werden. Dies ist nicht nur im Hinblick auf den immer weiter steigenden Druck zur Optimierung der Produktivität schon bestehender Produktionen interessant, sondern eröffnet auch Möglichkeiten zur Bildung weiterer wertvoller Substanzen. Schon heute sind Prozesse zur Bildung von Succinat (Okino *et al.*, 2008a), Lactat (Okino *et al.*, 2008b), Cadaverin (Kind *et al.*, 2010), Putrescin (Schneider & Wendisch, 2010) oder Isobutanol (Smith *et al.*, 2010) mit *C. glutamicum* bekannt.

1.2 D-Aminosäuren

Aufgrund des asymmetrischen α -C-Atoms können alle proteinogenen Aminosäuren (außer Glycin) in zwei spiegelbildlichen Konformationen vorliegen, die als Enantiomere bezeichnet werden. Da in Proteinen ausschließlich die L-Form der Aminosäuren nachzuweisen ist, wurde der Analyse der D-Aminosäuren für lange Zeit kaum Beachtung geschenkt. Erst durch die Identifikation von D-Aminosäuren in Lebensmitteln und der daraus resultierenden Notwendigkeit, den Einfluss von D-Aminosäuren auf den Organismus des Menschen näher zu untersuchen, entstanden hoch-sensible enantioselektive Nachweismethoden. Diese basieren meist auf Gas-Chromatographie (GC) (Liardon *et al.*, 1991) oder „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) (Bruckner *et al.*, 1995; Buck & Krummen, 1984) und ermöglichten die Erforschung der Bedeutung von D-Aminosäuren auch über den Bereich der Lebensmittelindustrie hinaus. Es zeigte sich dabei, dass D-Aminosäuren sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten von entscheidender Bedeutung sind (Friedman, 1999; Friedman, 2010; Martinez-Rodriguez *et al.*, 2010).

1.2.1 Rolle von D-Aminosäuren in der Natur

Zur am besten untersuchten Aufgabe von D-Aminosäuren zählt dabei wohl die Beteiligung einiger D-Aminosäuren am Aufbau der bakteriellen Zellwand (van Heijenoort, 2001a; van Heijenoort, 2001b). In den allermeisten Bakterien findet man die beiden D-Aminosäuren D-Alanin und D-Glutamat in den Peptidbrücken des Peptidoglykans, die für die Quervernetzung der Glykanketten aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure verantwortlich sind. Der Einbau der D-Aminosäuren in die Querverbindungen führt dabei

zu einer erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau (Reynolds, 1998). Die Bedeutung besonders von D-Alanin, das für die Synthese des Peptidoglykans fast aller Eubakterien essentiell ist (Thompson *et al.*, 1998), zeigt sich auch dadurch, dass die für die Bildung von D-Alanin aus dem L-Enantiomer verantwortliche Racemase, die über das Gen *alr* kodiert wird, in allen Eubakterien vertreten ist (Ju *et al.*, 2005). Neben D-Alanin und D-Glutamin können aber auch andere D-Aminosäuren Bestandteile der bakteriellen Zellwand sein. So konnten bei einigen *Enterococcus*-Stämmen Disaccharid-Pentapeptide mit C-terminalem D-Alanin-D-Serin-Dipeptid nachgewiesen werden (Billot-Klein *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 1994). Als Grundbausteine der Peptidoglykan-Synthese verleihen solche veränderten Peptide eine Resistenz gegenüber antibakteriellen Glykopeptiden wie Vancomycin (Arias *et al.*, 1999).

Ein weiteres wichtiges Vorkommen von D-Aminosäuren sind bakterielle natürliche Peptidantibiotika wie Penicillin G (Martin *et al.*, 1999), Vancomycin (Hubbard & Walsh, 2003), Mycobacillin (Banerjee, 1977), Gramicidin (Katz & Demain, 1977), Seromycin (Kuehl *et al.*, 1955) oder Cyclosporin (Kobel & Traber, 1982), um nur einige wenige zu nennen. Der Einbau von D-Aminosäuren wie zum Beispiel D-Valin, D-Leucin, D-Phenylalanin, D-Serin oder D-Alanin, führt dabei zu einer verstärkten Stabilität der Peptide gegenüber Proteolyse (Hamamoto *et al.*, 2002).

Aber das Vorkommen von D-Aminosäuren ist nicht nur auf Bakterien beschränkt. Auch in Pilzen (Bruckner *et al.*, 2009), Algen (Yokoyama *et al.*, 2003), höheren Pflanzen (Robinson, 1976), Amphibien (Kreil, 1994) und Säugern (Hashimoto *et al.*, 1992a) konnten D-Aminosäuren nachgewiesen werden, wobei die Bedeutung und Funktion oftmals noch ungewiss ist. Gut untersucht ist jedoch die Rolle von D-Serin im Gehirn von Säugern. Nachdem Anfang der 90er Jahre D-Serin im Hirn von Ratten nachgewiesen wurde (Hashimoto *et al.*, 1992a), konnte kurz darauf auch eine Serin-Racemase identifiziert werden (Wolosker *et al.*, 1999a; Wolosker *et al.*, 1999b). Die bis dato verbreitete Annahme, dass die Verbreitung von D-Aminosäuren auf Bakterien beschränkt ist und D-Aminosäuren in Eukaryoten keine besonderen Aufgaben erfüllen, musste damit verworfen werden. Neuere Untersuchungen zeigen sogar, dass D-Serin eine entscheidende Rolle in der Signalübertragung an den Neuronen hat (Miller, 2004; Wolosker *et al.*, 2008). Als Coaktivator der NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren, die ein Subtyp der komplexen Gruppe der Glutamat-Rezeptoren darstellen, ist D-Serin an zahlreichen Vorgängen im zentralen Nervensystem, wie beim Lernen und dem Gedächtnis, bei der Regulation von Wachstum und Tod von Neuronen, und auch bei Neuropathien und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt (Mothet *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2010). Damit ist D-Serin und die Aufdeckung des D-Serin-Metabolismus im Gehirn der Säuger mittlerweile auch für die pharmazeutische Industrie ein attraktives Forschungsgebiet.

1.2.2 D-Aminosäuren als Produkt für die Industrie

Wie zuvor erwähnt, werden D-Aminosäuren hauptsächlich in der pharmazeutischen Industrie benötigt (Martinez-Rodriguez *et al.*, 2010). Wie in Tabelle 1.1 dargestellt, beinhalten zum Beispiel sowohl die weit verbreiteten β -Lactam-Antibiotika, zu denen unter anderem Ampicillin, Penicillin und Amoxicillin gehören, als auch die Cephalosporine, wie Cephalexin, D-Aminosäuren (Kalman & Barriere, 1990; Rolinson & Geddes, 2007). Um besonders auch das Problem der resistenten und multi-resistenten Stämme zu umgehen, wurden in den letzten Jahrzehnten dabei auf der Basis der bekannten Grundstrukturen immer wieder neue synthetische Varianten entwickelt (Garcia-Rodriguez *et al.*, 1995; Oshiro, 1999; Petrauskas & Svedas, 1991). Eine weitere Strategie zur Bildung neuer Antibiotika ist auch die Überführung bekannter natürlicher L-Peptide mit antimikrobieller Wirkung in die entsprechenden D-Isomere (Merrifield *et al.*, 1996; Wade *et al.*, 1990).

Zum Teil werden D-Aminosäure-haltige Antibiotika aber auch für andere Zwecke benutzt. So wird das als Seromycin bekannte Antibiotikum D-Cycloserin, das zur Behandlung von Tuberkulose eingesetzt wird, auch in Deodorants benutzt (Hayden & Goldman, 2000). Cyclosporine werden als Immunsuppressiva (Thali, 1995) und Tadalafil und Analoge unter dem Namen Cialis[®] (Lilly Pharma, USA) zur Behebung der erektilen Dysfunktion eingesetzt (Argiolas & Deghenghi, 2001). Auch in der Behandlung von Diabetes werden D-Aminosäure-haltige Wirkstoffe (Nateglinid) verwendet (Tentolouris *et al.*, 2007). Schließlich dienen die analogen Dipeptide Thymodepressin (γ -D-Glu-D-Trp) und SCV-07 (γ -D-Glu-L-Trp) als Immunmodulatoren zur Behandlung der Schuppenflechte beziehungsweise aufgrund der zusätzlichen antimikrobiellen Wirkung auch der Behandlung von Hepatitis C (Rose *et al.*, 2008; Sapuntsova *et al.*, 2002).

Tabelle 1.1: Ausgewählte D-Aminosäure-haltige Produkte. D-Ala: D-Alanin, D-Glu: D-Glutamat, D-PG: D-Phenylglycin; D-pHPG: D-*para*-Hydroxyphenylglycin, D-Ser: D-Serin, D-Trp: D-Tryptophan, D-Val: D-Valin.

Produkt	D-Aminosäure	Verwendung
Alitam	D-Ala	Süßstoff, Lebensmittelindustrie
Amoxicillin	D-Val, D-pHPG	Antibiotikum
Ampicillin	D-Val, D-PG	Antibiotikum
Cephalexin	D-PG	Antibiotikum
Fluvalinat	D-Val	Insektizid
Nateglinid	D-PG	Pharmazeutikum
Penicillin G	D-Val	Antibiotikum
Seromycin	D-Ser	Antibiotikum
SCV-07	D-Glu	Pharmazeutikum
Tadalafil	D-Trp	Pharmazeutikum

Neben diesen weitreichenden Einsatzmöglichkeiten in der pharmazeutischen Industrie werden D-Aminosäuren aber auch in anderen Bereichen eingesetzt. D-Alanin dient zum Beispiel zum Aufbau von Alitam, einem kalorienarmen Süßstoff, dem eine 2000-fach stärkere Süßkraft als Zucker nachgesagt wird (Janusz, 1987). Und D-Valin wird zur Produktion von Fluvalinat benötigt, das als Insektizid zum Beispiel unter dem Namen Apistan[®] (Sandoz Agro, USA) zur Bekämpfung der Bienen-befallenden Milbe *Varroa jacobsoni* verkauft wird (Senn *et al.*, 2003).

Abschließend haben auch freie D-Aminosäuren eine große Bedeutung. So wird D-Methionin als Biopharmaka zur Behandlung von Hörschäden (Sunkara, 2006) und D-Phenylalanin als Antidepressivum genutzt (Heller, 1982). D-Alanin und D-Serin werden auch als Therapeutika zur Behandlung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Alzheimer oder Schizophrenie getestet (Javitt, 2000; Tsai & Coyle, 2001).

1.2.3 Produktion von D-Aminosäuren

Die Nachfrage nach D-Aminosäuren ist demnach groß, was auch die Entwicklung geeigneter Produktionswege notwendig macht. Prinzipiell kann man bei der Produktion von D-Aminosäuren dabei zwischen chemischer Synthese und Bildung durch Biokatalyse unterscheiden, wobei oftmals erst eine Kombination beider Techniken zum Ziel führt (Breuer *et al.*, 2004).

Obwohl asymmetrische Synthesen prinzipiell möglich sind (Yet, 2001), ist bislang kein chemischer Prozess bekannt, der zur Bildung einer enantiomer-reinen Aminosäure kommerziell genutzt wird (Breuer *et al.*, 2004). Die chemische Produktion von D-Aminosäuren beruht immer auf der Synthese eines Racemats. Dabei können D, L-Hydantoine (Bucherer & Steiner, 1934), *N*-Acyl-D,L-Aminosäuren (Beller & Eckert, 2000) oder D, L-Aminosäure-Amide gebildet werden. Zur Auftrennung der Racemate in die einzelnen Enantiomere werden dann in einem weiteren Schritt zumeist enantioselektive Enzyme genutzt (Abbildung 1.1). Über diese Form der Biotransformation werden industriell aus Hydantoin-Racematen mit spezifischen D-Hydantoinasen und D-Carbamoylasen reine D-Aminosäuren wie D-Phenylglycin, D-*para*-Hydroxyphenylglycin und D-Serin produziert (Ogawa & Shimizu, 1997). D-Valin und D-Phenylalanin werden hingegen aus *N*-Acyl-D/L-Aminosäuren mit spezifischen D-Amino-Acylasen gewonnen (Wakayama *et al.*, 2003), während die Auftrennung der Aminosäure-Amid-Racemate über spezifische D-Aminosäure-Amidasen erfolgt (Asano *et al.*, 1989; Breuer *et al.*, 2004).

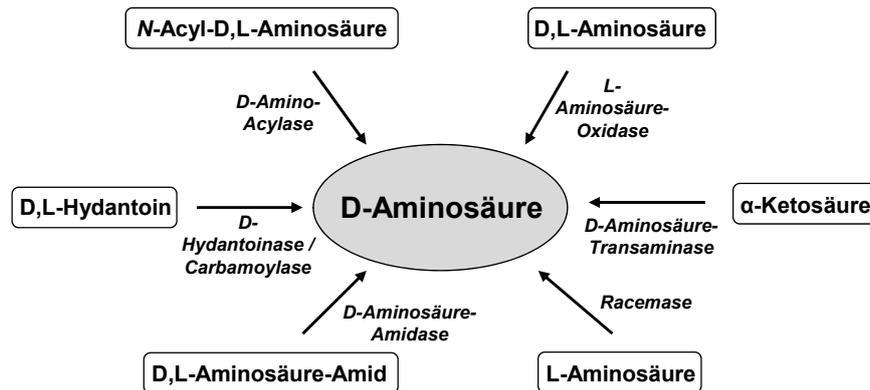


Abbildung 1.1: Verschiedene Wege zur Produktion von D-Aminosäuren

Im Gegensatz zur chemischen Synthese können biokatalytische Synthesen unter milden Reaktionsbedingungen wie atmosphärischem Druck, gemäßigten Temperaturen und neutralen pH-Bereichen durchgeführt werden (Yamada & Shimizu, 1988). Deswegen und weil die Spezifitäten von Enzymen sowohl in Bezug auf das Substrat als auch die Konformation zumeist sehr hoch sind, werden enzymatische Verfahren auch zur Produktion von D-Aminosäuren bevorzugt eingesetzt. Wie oben schon beschrieben, sind selbst in der chemischen Synthese biokatalytische Schritte notwendig, um D-Aminosäuren zu produzieren. Eine andere Möglichkeit zur Produktion von D-Aminosäuren wurde 1988 von Nakajima *et al.* beschrieben (Nakajima *et al.*, 1988). Dabei werden als Substrate die entsprechenden α -Ketosäuren der Aminosäuren eingesetzt (Abbildung 1.1). Durch die Kombination der Reaktionen der Glutamat-Dehydrogenase und der Glutamat-Racemase wird beständig D-Glutamat aus α -Ketoglutarat, Ammonium und NADH synthetisiert, das dann als Aminogruppen-Donor in der durch die D-Aminosäure-Aminotransferase katalysierte Transaminierungs-Reaktion mit der α -Ketosäure dient. Problematisch bleiben dabei die Regeneration von NADH, für die zusätzlich noch die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase notwendig ist, und die Notwendigkeit der Isolation von insgesamt vier verschiedenen Enzymen. Um das letztere Problem zu umgehen, wurde einige Jahre später ein Verfahren beschrieben, bei dem die Gene der vier Enzyme heterolog in *Escherichia coli* exprimiert werden und ganze Zellen zur Biotransformation eingesetzt werden (Galkin *et al.*, 1997). Beide System werden industriell aber nicht angewendet. Eine von Mitsui Chemicals (Japan) patentierte Methode zur Produktion von D-Serin über Biotransformation wird industriell dagegen bereits genutzt (Araki *et al.*, 2007). Dabei wird die Aktivität einer aus *Xanthomonas* isolierten und in *E. coli* produzierten D-Threonin-Aldolase (EC 4.1.2.42) genutzt, um enantioselektiv D-Serin aus Glycin und Formaldehyd zu produzieren.

Fermentative Prozesse, bei denen der Syntheseapparat lebender Zellen und günstige Ausgangsprodukte wie Glukose genutzt werden, sind bislang nur für die Produktion von L-Aminosäuren bekannt. Eine Ausnahme bildet dabei ein von Monsanto patentierter Fermentationsprozess zur Produktion verschiedener D-Aminosäuren, der mit unterschiedlichen Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis*, aber auch *Corynebacterium*

glutamicum oder *Escherichia coli*, durchführbar ist (Fotheringham *et al.*, 1998). Das Prinzip beruht erneut auf einer Transaminierungs-Reaktion innerhalb der Zelle. Für die Produktion von D-Phenylalanin werden dabei zum Beispiel extern zugesetzte L-Aminosäuren wie L-Alanin, L-Glutamat oder L-Aspartat intern über eine spezifische, heterolog produzierte Racemase in das entsprechende D-Enantiomer umgewandelt und dienen als Aminodonor. Eine heterolog produzierte L-Aminosäure-Desaminase stellt durch die Abspaltung der Aminogruppe einer weiteren supplementierten oder intern produzierten L-Aminosäure, in diesem Fall L-Phenylalanin, dabei das Kohlenstoffgerüst zur Verfügung. Über eine D-Aminosäure-Transaminase erfolgt dann die Bildung der D-Aminosäure. Auch wenn dieser Prozess aufgrund des weiten Substratspektrums sowohl der L-Aminosäure-Desaminase als auch der D-Aminosäure-Transaminase für die Produktion verschiedener D-Aminosäuren verwendet werden könnte, scheint er aufgrund der Notwendigkeit zur heterologen Expression von drei Genen und der Notwendigkeit zur Supplementation mit mindestens einer L-Aminosäure umständlich und kostenintensiv.

D-Aminosäuren können aber auch aus zuvor gebildeten racemischen Aminosäuren durch von Mikroorganismen katalysierten asymmetrischen Abbau gewonnen werden (Abbildung 1.1). Aufgrund der Eigenschaft einiger Mikroorganismen, bestimmte L-Aminosäuren spezifisch abzubauen, sind solche Prozesse zur Gewinnung von D-Aspartat mit *Pseudomonas dacunhae* (Senuma *et al.*, 1989), D-Lysin mit *Comamonas testosterioni* (Takahashi *et al.*, 1997b; Takahashi *et al.*, 1997c) sowie D-Methionin und D-Valin mit *Proteus vulgaris* (Takahashi *et al.*, 1997a; Takahashi *et al.*, 1997d) zwar bereits bekannt, sie werden für die industrielle Produktion allerdings vermutlich nicht genutzt. Generell scheint der Einsatz von racemischen Aminosäuren zur Produktion von D-Aminosäuren aufgrund der Tatsache, dass viele L-Aminosäuren bereits kostengünstig und in großen Mengen fermentativ aus Glukose gebildet werden können und die Racemisierung von Aminosäuren sowohl chemisch als auch enzymatisch möglich ist, aber sinnvoll.

1.3 Racemasen

Die Racemisierung kann sowohl spontan erfolgen, als auch enzymatisch katalysiert werden (Friedman, 1999). Begünstigende Faktoren der spontanen, chemischen Racemisierung sind dabei basische pH-Werte, hohe Temperaturen und Katalysatoren wie Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), aromatische Aldehyde oder Kombinationen aus organischen Säuren und Ketonen oder Aldehyden (Chibata *et al.*, 1983; Ishiwata *et al.*, 1989; Jacewicz & Victor W., 1987; Mirviss & Stanley B., 1988). Im Gegensatz dazu läuft die enzymatisch katalysierte Racemisierung bei neutralem pH und gemäßigten Temperaturen ab (Schnell *et al.*, 2003). Das Prinzip der Deprotonierung des asymmetrischen C-Atoms, der daraus resultierenden Bildung eines instabilen Carbanion-Intermediates und der anschließende

Reprotonierung, ist dabei in beiden Fällen gleich (siehe auch Abbildung 1.2) (Friedman, 1999).

In natürlichen Systemen wird die Racemisierung durch Racemasen katalysiert (Yoshimura & Esak, 2003). Diese können abhängig oder unabhängig vom Cofaktor Pyridoxal-5'-Phosphat, der aktiven Form des Vitamin B₆, sein. PLP-unabhängige Racemasen, wie die Glutamat- (Diven, 1969), Aspartat- (Lamont *et al.*, 1972) oder Prolin-Racemasen (Cardinale & Abeles, 1968), benutzen als katalytische Basen Cystein-Reste im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Mehrheit der Racemasen, wie zum Beispiel die weit verbreiteten Alanin-Racemasen (Esaki & Walsh, 1986; LeMagueres *et al.*, 2005; Uo *et al.*, 2001), sowie die in dieser Arbeit untersuchten Serin- und Arginin-Racemasen (Arias *et al.*, 1999; Soda & Osumi, 1969), sind allerdings PLP-abhängig. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, ist das PLP bei Abwesenheit des Substrates kovalent über eine Schiff-Base an die ε-Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes im aktiven Zentrum der Racemase gebunden (Abbildung 1.2, A) und wird bei Anwesenheit des Substrates auf den α-Amino-Rest der Aminosäure übertragen (Abbildung 1.2, B) (Yoshimura & Goto, 2008). Das so gebildete Aldimin bleibt aufgrund vielfältiger nicht-kovalenter Verbindungen dabei aber eng mit dem Enzym verbunden. Durch De- und Reprotonierung (Abbildung 1.2, C+D) am asymmetrischen α-C-Atom der Aminosäuren erfolgt dann die Racemisierungsreaktion an deren Ende die Aminosäure wieder abgespalten wird. Da alle Schritte der Racemisierung reversibel sind und die Orientierung der Reprotonierung zufällig erfolgt, führt die Racemisierung zu einem Gleichgewicht zwischen den beiden Enantiomeren.

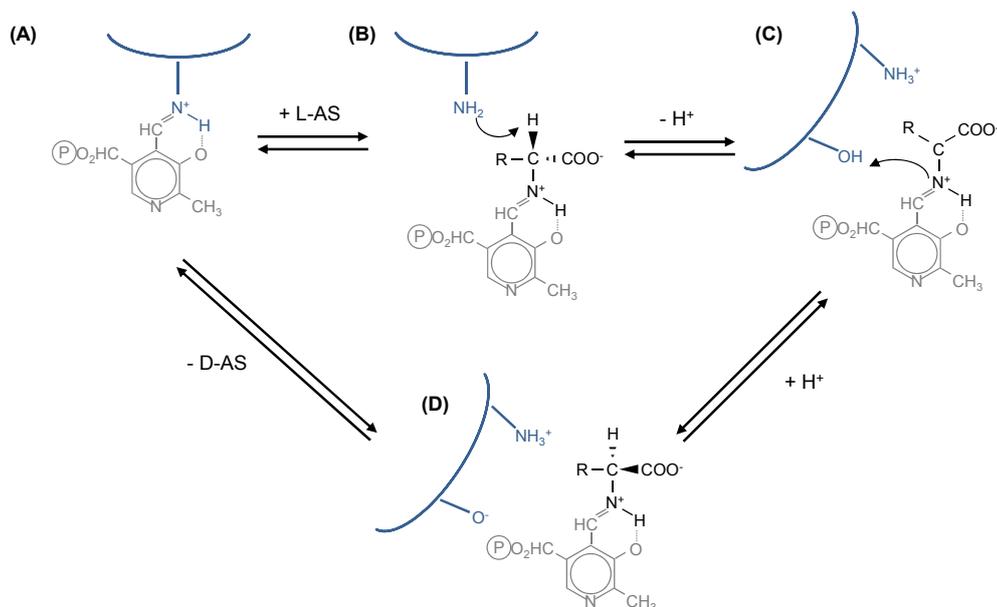


Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus einer PLP-abhängigen Racemase.

Aber Racemasen können nicht nur aufgrund der Abhängigkeit von einem Cofaktor unterteilt werden. Auch das Substratspektrum ist sehr unterschiedlich. Während der Großteil der Racemasen, wie zum Beispiel die Alanin-Racemasen Alr aus *Bacillus psychrosaccharolyticus* (Okubo *et al.*, 1999) oder die Ornithin-Racemase aus *Clostridium sticklandii* (Chen *et al.*, 2000), sehr spezifisch nur mit einem Substrat aktiv sind, zeigen nur einige wenige Racemasen, wie zum Beispiel die Arginin-Racemase aus *Pseudomonas graveolens* (Yorifuji *et al.*, 1971) oder eine Aminosäure-Racemase aus *Pseudomonas putida* (Kino *et al.*, 2007), ein weites Substratspektrum.

In *Corynebacterium glutamicum* sind bislang zwei Racemasen bekannt. Die Alanin-Racemase Alr (NCgl0563) wurde erstmals 2002 von Tauch *et al.* beschrieben (Tauch *et al.*, 2002a). Es handelt sich hierbei um ein etwa 78 kDa-großes Dimer, das spezifisch nur mit Alanin aktiv ist und eine PLP-Abhängigkeit zeigt (Oikawa *et al.*, 2006). Sequenzvergleiche zeigten eine enge Verwandtschaft mit den biosynthetischen Alanin-Racemasen. Da die Deletion von *alr* zur D-Alanin-Auxotrophie führt, ist davon auszugehen, dass *C. glutamicum* keine weitere Racemase besitzt, die mit Alanin aktiv ist (Tauch *et al.*, 2002a). Die Glutamat-Racemase aus *C. glutamicum* (NCgl2423) wurde bislang noch nicht näher untersucht. Allerdings ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie zur Glutamat-Racemase MurI aus *M. tuberculosis* (62 % identische Aminosäuren) davon auszugehen, dass sie, wie MurI, spezifisch für Glutamat und unabhängig von einem Cofaktor wie PLP ist (Sengupta *et al.*, 2006). Da die beiden Racemasen an Schritten der Peptidoglykan-Synthese beteiligt sind, die im Cytoplasma lokalisiert sind (Barreteau *et al.*, 2008), und durch SignalP (CBS, Technical University of Denmark) für keine der beiden Enzyme eine Signalsequenz für den Export vorhergesagt wurde (Emanuelsson *et al.*, 2007), ist von einer cytoplasmatischen Lokalisation der beiden Racemasen auszugehen.

1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach D-Aminosäuren besonders in der pharmazeutischen Industrie, war das Hauptziel dieser Arbeit, das Potential von *C. glutamicum* als Produzenten von D-Aminosäuren zu testen. Dazu sollte überprüft werden, wie sich *C. glutamicum* gegenüber D-Aminosäuren verhält, ob ein Abbau erfolgt und wie sich eine Racemisierung in *C. glutamicum* selbst oder extrazellulär erreichen lässt. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Bildung von D-Serin, sowie auf den Exportprozess der D-Aminosäure gerichtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 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.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit benutzten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*-Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
ATCC13032	Wildtyp, biotin-auxotroph	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
ARG1	ATCC13032 $\Delta argR$ $argB_{A49VM54V}$, Spec ^R	(Schneider <i>et al.</i>)
ARG2	Derivat von ARG1 (ATCC13032 $\Delta argR$ $argB_{A49VM54V}$), Tet ^R	diese Arbeit
DM1933	L-Lysin-Produktionsstamm, ATCC13032 Δpck $pyc(P458S)$ $hom(V59A)$ $2xlysC(T311I)$ $2xlysE$ $2xasd$ $2xdapA$ $2xdapB$ $2xddh$ $2xlysA$	(Blombach <i>et al.</i> , 2009), Evonik
Ser4	L-Serin-Produktionsstamm, ATCC13032 $\Delta sdaA$ $\Delta pabABC$ $pserABC$, Tet ^R	(Stolz <i>et al.</i> , 2007)
ORN1	ATCC13032 $\Delta argR$ $\Delta argF$, arginin- auxotroph	(Schneider <i>et al.</i>)
$\Delta argR$	ATCC13032 $\Delta argR$	dieses Institut
$\Delta lysEG$	ATCC13032 $\Delta lysEG$	(Vrljic <i>et al.</i> , 1996)

Tabelle 2.2: Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
B10	W3110 <i>tnaA⁻ trpR⁻ cysB⁻ ΔtrpED102</i> <i>trpB⁺ trpA⁺ /F⁻ ColVB cysB⁺ ΔtrpED102</i> <i>trpB⁺ trpA</i>	Amino GmbH (Frellstedt) (Bang <i>et al.</i> , 1983)
C41(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm hsdSB(rB- mB-)(DE3)</i> <i>plysS</i>	(Miroux & Walker, 1996)
DH5αMCR	<i>F⁻ endA1 supE44 thi⁻ λ⁻ recA1 gyrA96</i> <i>relA1 deoR Δ(lacZYA⁻argF) U169</i> <i>φ80dlacZM15 mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS⁻</i> <i>mcrBC)</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)

Tabelle 2.3: Die in dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEKEx2	Kan ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression (P _{tac} , lacI ^q , pBL1, oriV _{Cg} , pUC18 oriV _{Ec}), MCS im Vergleich zu pEKEx1 invertiert	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pEKEx2- <i>alr</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit <i>alr</i> -Gen (NCgl0563)	diese Arbeit
pEKEx2- <i>sdaA</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit <i>sdaA</i> -Gen (NCgl1583)	diese Arbeit
pEKEx2-TorA- <i>malE</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einer Fusion aus dem <i>malE</i> -Gen (<i>Escherichia coli</i>) und dem Signalpeptid von TorA	dieses Institut (F. Lausberg, AG Freudl, IBT-1)
pEKEx2-TorA- <i>argR</i>	Kan ^R , Derivat von pEKEx2-TorA- <i>malE</i> mit Austausch von <i>malE</i> gegen das Gen des reifen ArgR (Δ1-23) (<i>Pseudomonas taetrolens</i> , AB096176)	diese Arbeit
pEKEx2- <i>trpB</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit <i>trpB</i> -Gen (NCgl2931)	diese Arbeit
pEKEx2- <i>trpBA</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit <i>trpB</i> - (NCgl2931) und <i>trpA</i> -Gen (NCgl2932)	diese Arbeit
pEKEx3	Spec ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression (P _{tac} , lacI ^q , pBL1, oriV _{Cg} , pUC18 oriV _{Ec})	(Hoffelder <i>et al.</i> , 2010)
pEKEx3- <i>argB</i> _{A49VM54V}	Spec ^R , pEKEx3-Derivat mit dem <i>argB</i> -Gen (NCgl1342) mit den Aminosäure-Austauschen A49V und M54V	(Schneider <i>et al.</i> , 2010)
pEKEx3- <i>argR</i>	Spec ^R , pEKEx3-Derivat mit <i>argR</i> -Gen (<i>Pseudomonas taetrolens</i> , AB096176) ohne N-terminales Signalpeptid	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEKEx3- <i>SP-argR</i>	Spec ^R , pEKEx3-Derivat mit vollständigem <i>argR</i> -Gen (<i>Pseudomonas taetrolens</i> , AB096176)	diese Arbeit
pJC1	Kan ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor (oriV _{Cg} , oriV _{Ec})	(Cremer <i>et al.</i> , 1990)
pJC1 <i>lysGE'eYFP</i>	Kan ^R , pJC1-Derivat mit <i>lysGE'eYFP</i> -Kassette	(Wings, 2010)
pVWEx2	Tet ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur Genexpression (P _{tac} , lacI ^q , oriV _{Cg} , oriV _{Ec})	(Wendisch, 1997)
pVWEx2- <i>argB</i> _{A49VM54V}	Tet ^R , pVWEx2 mit <i>argB</i> -Gen (NCgl1342) mit den Aminosäure-Austauschen A49V und M54V	diese Arbeit
pXMJ19	Cm ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur Genexpression (P _{tac} , lacI ^q , oriV _{Cg} , oriV _{Ec})	(Jakoby <i>et al.</i> , 1999)
pXMJ19- <i>sdaA</i>	Cm ^R , pXMJ19 mit <i>sdaA</i> -Gen (NCgl1583)	(Netzer <i>et al.</i> , 2004)
pET11b	Amp ^R , Vektor zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i> (oriV _{Ec} , T7-Promotor), optional N-terminale T7-Tag-Sequenz	Novagen
pET11b- <i>argR</i>	Amp ^R , pET11b mit vollständiger Sequenz des <i>argR</i> -Gens (<i>Pseudomonas taetrolens</i> , AB096176)	(Matsui <i>et al.</i> , 2009)
pET22b(+)	Amp ^R , Vektor zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i> (oriV _{Ec} , T7-Promotor), optional C-terminale His-Tag-Sequenz	Novagen
pET22b(+)- <i>argR</i>	Amp ^R , pET22b(+) mit <i>argR</i> -Gen (<i>Pseudomonas taetrolens</i> , AB096176) ohne N-terminales Signalpeptid, C-terminale 6x His-Tag-Sequenz	diese Arbeit
pET28b(+)	Kan ^R , Vektor zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i> (oriV _{Ec} , T7-Promotor), N-terminale, Thrombinspaltbare 6x His-Tag-Sequenz, optional C-terminale His-Tag-Sequenz	Novagen
pET28b(+)- <i>lysG</i>	Kan ^R , pET28b(+) mit <i>lysG</i> -Gen (NCgl1215), N-terminale, Thrombinspaltbare 6x His-Tag-Sequenz	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Ribosomenbindestellen sind fett dargestellt, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonuklease sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
Konstruktion		
alr-SalI (Fw)	<u>GTC GAC</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGA ACT TGC TGA CCA	RBS, <i>SalI</i>
alr-EcoRI (Rev)	<u>GAA TTC</u> TTA AAC ATA TGC GCG GAC AG	<i>EcoRI</i>
argB-Cg-SalI (Fw)	GCT TAA <u>GTC GAC</u> AAG GAG ATA TAG ATG AAT GAC TTG ATC AAA GAT	RBS, <i>SalI</i>
argB-Cg-BamHI (Rev)	ATA TGT <u>GGA TCC</u> TTA CAG TTC CCC ATC CTT GTC GTC	<i>BamHI</i>
argR-Esp3I (Fw)	ATT <u>CGT CTC GAA TTC</u> GAT GCG CCA CCC CTG TCG ATG AC	<i>Esp3I</i>
argR-Esp3I (Rev)	CGG <u>CGT CTC GAA TTC</u> TCA TTA CTG ATC TTT CAG GAT TTT AGG	<i>Esp3I</i>
argR-PstI (Fw)	TTT <u>CTG CAG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGG CGC CAC CC	RBS, <i>PstI</i>
argR-SP-PstI (Fw)	TTT <u>CTG CAG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGC CCT TCT C	RBS, <i>PstI</i>
argR-BamHI (Rev)	GCA <u>GGA TCC</u> TCG TTC AAT ATA CGG	<i>BamHI</i>
argR-NdeI (Fw)	CAA <u>CAT ATG</u> GCG CCA CCC CTG TCG	<i>NdeI</i>
argR-XhoI (Rev)	CCC <u>CTC GAG</u> CTG ATC TTT CAG GAT TTT	<i>XhoI</i>
lysG-NdeI (Fw)	CGG CTT AAC <u>ATA TGA</u> ACC CCA TTC AAC TG	<i>NdeI</i>
lysG-EcoRI (Rev)	TTT <u>GAA TTC</u> CTA AGG CCG CAA TCC CTC	<i>EcoRI</i>
trpB-SalI (Fw)	<u>GTC GAC</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGA CTG AAA AAG AAA ACT	RBS, <i>SalI</i>
trpB-BamHI (Rev)	<u>GGA TCC</u> TCA TCG GTT GTC CTT CAG GAT	<i>BamHI</i>
trpBA-BamHI (Rev)	<u>GGA TCC</u> CTA AAC CTT CTT GGT CGC TGC	<i>BamHI</i>
Sequenzierung		
pEKEx-for2	CGG CGT TTC ACT TCT GAG TTC GGC	
pEKEx-rev2	GAT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC	
puniv	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	
rsp1	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TG	
pET16b-seq-fw	CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG	
pET16b-seq-rev	CAA GAC CCG TTT AGA GGC CCC	
argF-seq (Fw)	TAT CCG TTT GAC CCC GCC GCT GG	
argF-seq (Rev)	TGG CGT GCA GTG CGA GTC ACG GG	
argB-seq (Fw)	ACC ACT GAC CTG AGC TTC TCC TAC GTG	
argB-seq (Rev)	CCC TTG CCG GAC ACC AGC TCA AC	
argR-seq (Fw)	TTC GAT GAA GCA GAA AAC CGC CTC C	
argR-seq (Rev)	CGT GGT GGA CAG CAA GGA TGT TTA AAG A	

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
quantitative Real-Time-PCR		
ddh-fw	ACG TGC TGT TCC TGT GCA TGG	
ddh-rev	GCT CGG CTA AGA CTG CCG CT	
Cg0701-RT (Fw)	GGC TGT TCA TCG CAG GCT TGA TCA TG	
Cg0701-RT (Rev)	GGC TAA CAC CGC GGA GAA AAT CAG G	
Gelretardationsanalysen		
lysGE (Fw)	TTA AAC ACA CGA GAA GAA CCG CAA TGA GTC	
lysGE (Rev)	AAC ACT CGA CCC ACG TGA TGC TCG AGA	
lysGE_422 (Fw)	CGT GAC CTA TGG AAG TAC TTA AGT AAA ATG ATT	
lysGE_510 (Rev)	GCA AAG TGT CCA GTT GAA TGG GGT TCA	
lysGE_372 (Fw)	AGA CTG GCC CCC AAA AGC AGA CC	
lysGE_560 (Rev)	GGA AAG GGC TAA GGA GGC GCC TT	
lysGE_482 (Rev)	GAA GCT ATA TTA AAC CAT GTT AAG AAC CAA TCA	
lysGE_437 (Rev)	CTT CCA TAG GTC ACG ATG GTG ATC ATG	
lysGE_449 (Fw)	AAT GAT TGG TTC TTA ACA TGG TTT AAT ATA GCT TCA TG	
lysGE_498 (Fw)	CTG GAC ACT TTG CTC TCA ATC ATT GAT GAA G	

2.4 Konstruktion von Plasmiden

pEKEx2-*alr*

Zur Expression des Gens der Alanin-Racemase *Alr* in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden *alr*-*SalI* (Fw) und *alr*-*EcoRI* (Rev) amplifiziert. Das mit *SalI* und *EcoRI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *SalI* und *EcoRI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pEKEx2-*sdaA*

Zur Expression des Gens der Serin-Dehydratase *SdaA* in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich mittels *XbaI* und *EcoRI* aus dem Vektor pXMJ19-*sdaA* geschnitten und die Enden über Klenow-fill-in aufgefüllt. Das Fragment wurde in den mit *EcoRI* eröffneten und ebenfalls mit Klenow-fill-in behandelten Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pEKEx2-TorA-argR

Zur Expression des Gens der Racemase mit einem Tat-abhängigen Signalpeptid in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich der Racemase ohne das native N-terminale Signalpeptid aus dem Vektor pEKEx3-argR mit den Oligonukleotiden argR-Esp3I (Fw) und argR-Esp3I (Rev) amplifiziert. Das *Esp3I*-geschnittene Fragment wurde in den mit *EcoRI* geschnittenen Vektor pEKEx2-TorA-*malE* ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pEKEx2-trpB

Zur Expression des Gens der β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden trpB-SalI (Fw) und trpB-BamHI (Rev) amplifiziert. Das mit *SalI* und *BamHI* geschnittene Fragment wurde in den ebenfalls mit *SalI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pEKEx2-trpBA

Zur Expression der Gene der β -Untereinheit und der α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich beider Gene aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden trpB-SalI (Fw) und trpBA-BamHI (Rev) amplifiziert. Das mit *SalI* und *BamHI* geschnittene Fragment wurde in den ebenfalls mit *SalI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pEKEx3-argR

Zur Expression des Gens der Racemase ohne N-terminales Signalpeptid in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich des reifen ArgR aus dem Vektor pET11b-argR mit den Oligonukleotiden argR-PstI (Fw) und argR-BamHI (Rev) amplifiziert. Das mit *PstI* und *BamHI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *PstI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pEKEx3 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pEKEx3-SP-argR

Zur Expression des Gens der Racemase mit dem N-terminalen Signalpeptid in *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich von ArgR aus dem Vektor pET11b-argR (Matsui, 2009) mit den Oligonuklotiden argR-SP-PstI (Fw) und argR-BamHI (Rev) amplifiziert. Das mit *PstI* und *BamHI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *PstI*

und *Bam*HI geschnittenen Vektor pEKEx3 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pVWEx2-*argB*_{A49VM54V}

Zur Expression von *argB* mit den Aminosäuren-Austauschen A49V und M54V wurde der kodierende Bereich aus dem Vektor pEKEx3-*argB*_{A49VM54V} (Schneider, 2010) mit den Oligonukleotiden *argB*-Cg-SalI (Fw) und *argB*-Cg-BamHI (Rev) amplifiziert. Das mit *SalI* und *Bam*HI geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *SalI* und *Bam*HI geschnittenen Vektor pVWEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

pET22b(+)-*argR*

Zur Reinigung der Racemase aus *E. coli* wurde der kodierende Bereich der Racemase ohne das N-terminale Signalpeptid und ohne das Stopcodon aus dem Vektor pEKEx3-*argR* mit den Oligonukleotiden *argR*-NdeI (Fw) und *argR*-XhoI (Rev) amplifiziert. Das mit *NdeI* und *XhoI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pET22b(+) ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Expression war so mit einem C-terminalen 6xHis-Tag möglich.

pET28b(+)-*lysG*

Zur Reinigung des Transkriptionsregulators aus *E. coli* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden *lysG*-NdeI (Fw) und *lysG*-EcoRI (Rev) amplifiziert. Das mit *NdeI* und *EcoRI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *NdeI* und *EcoRI* geschnittenen Vektor pET28b(+) ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Expression war so mit einem N-terminalen, Thrombin-spaltbaren 6xHis-Tag möglich.

2.5 Kultivierungsbedingungen

2.5.1 Nährmedien

Alle Medien wurden mit H₂O dest. angesetzt und 15-20 min bei 121°C autoklaviert

BHI-Medium: 37 g/l BHI (Menkel *et al.*, 1989)

BHIS-Medium: 37 g/l BHI, 182 g/l Sorbitol (Menkel *et al.*, 1989)

CGIII-Medium:	10 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 2,5 g/l NaCl, nach dem Autoklavieren 20 g/l Glukose zugeben (Menkel <i>et al.</i> , 1989)
CGXII-Glukose-Medium:	20 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g/l Harnstoff, 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l K ₂ HPO ₄ , 0,25 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 10 mg/l CaCl ₂ , 42 g/l MOPS, 0,2 mg/l Biotin, pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l in verd. NaOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml/l Spurensalzlösung und 40 g/l Glukose zugeben (Keilhauer <i>et al.</i> , 1993)
LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl (Bertani, 1951)
SOB-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, nach dem Autoklavieren 1 g/l MgCl ₂ und 1 g/l MgSO ₄ (jeweils sterilfiltriert) zugeben (Hanahan, 1983)
Spurensalzlösung:	10 g/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O, 10 g/l MnSO ₄ x H ₂ O, 1 g/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,2 g/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 20 mg/l NiCl ₂ x 6 H ₂ O, zum Lösen mit HCl auf pH 1 ansäuern und mit H ₂ O dest. auffüllen (Keilhauer <i>et al.</i> , 1993)

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Zur selektiven Kultivierung antibiotikaresistenter Bakterienstämme wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das entsprechende Antibiotikum in der in Tabelle 2.5 aufgeführten Konzentration zugesetzt.

Tabelle 2.5: Die in den Kultivierungen verwendeten Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Kanamycin	50 µg/ml	25 µg/ml
Tetracyclin	5 µg/ml	5 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml	250 µg/ml
Carbenicillin	50 µg/ml	50 µg/ml

Zur Anzucht mit L- oder D-Aminosäuren wurden die entsprechenden Aminosäuren in Konzentrationen von 1 M oder 500 mM in H₂O bidest. gelöst, steril filtriert und in Aliquots bei -20 °C oder 4 °C gelagert. Die entsprechende Menge der Stock-Lösung wurde dem Medium zu Beginn der Kultivierung zugesetzt.

2.5.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, in 50 – 100 ml LB-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen oder in 5 ml Medium in Reagenzgläsern. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde SOB-Medium benutzt. Alle *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C inkubiert und im Falle von Flüssigkulturen bei 120 Upm (Erlenmeyerkolben) oder 170 Upm (Reagenzgläser) geschüttelt. Zur Proteinexpression wurde den Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 0,4

mM IPTG zugegeben und sie danach zur Vermeidung von Einschlusskörperchen (inclusion bodies) bei 30 °C für 4 - 6 h inkubiert.

2.5.3 Kultivierung von *C. glutamicum*

Die Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte standardmäßig in 50 – 100 ml Nährmedium in Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen oder in 5 ml Medium in Reagenzgläsern. Alle *C. glutamicum*-Stämme wurden bei 30 °C inkubiert und im Falle von Flüssigkulturen bei 120 Upm (Erlenmeyerkolben) oder 170 Upm (Reagenzgläser) geschüttelt. Für die Kultivierung wurden, wenn nicht anders vermerkt, Vorkulturen in 50 ml CGIII-Medium von Platten angeimpft, die nicht älter als 7 Tage waren. Aus diesen wurden nach Kultivierung bei 30 °C und 120 Upm für 15 h nach dem Waschen der Zellen in steriler Saline (0,9 % NaCl) die Hauptkulturen in 50 ml CGXII-Glukose-Medium angeimpft. Zur Proteinexpression wurden den Hauptkulturen bei einer OD₆₀₀ von 1 0,1 mM IPTG zugegeben. Für die Anzucht zur Herstellung kompetenter Zellen und die Regeneration der Zellen nach der Transformation wurde BHIS-Medium verwendet.

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurde 5 ml BHIS-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 15-20 h bei 30 °C und 170 Upm inkubiert. 2 ml der Kultur wurden pelletiert, in 1 ml BHIS-Medium resuspendiert und mit 30 % sterilem Glycerin versetzt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei -75 °C gelagert.

2.5.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Ultrospec 3300 *pro* Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der optischen Dichte ist bis zu einer Extinktion von 0,5 gegeben. Lag die gemessene Extinktion über dieser Grenze, wurde die Probe mit dem entsprechenden Medium verdünnt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *C. glutamicum*

Zur Isolation genomischer DNA aus *C. glutamicum* wurde 1 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des DNeasyTM Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) behandelt.

2.6.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Ausgehend von 5 ml Übernachtskulturen erfolgte die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im kleinen Maßstab mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden), das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht (Birnboim & Doly, 1979). Aufgrund des besonderen Zellwandaufbaus erforderte die Isolation von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* zunächst eine Inkubation mit 15 mg/ml Lysozym bei 37 °C für 1-2 h. Danach wurde nach Herstellerangaben verfahren. Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 50 ml Übernachtskulturen und das QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt.

2.6.1.3 Isolierung von RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde 1 ml der Bakterienkultur in gekühlten Reaktionsgefäßen geerntet und sofort pelletiert (1 min, 16.100 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde dann entweder direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -75 °C gelagert (Bernstein *et al.*, 2002; Khodursky & Bernstein, 2003). Die Pellets wurden mechanisch mit dem Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen und mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgearbeitet (Lange *et al.*, 2003). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.6.1.5).

2.6.1.4 Reinigung von DNA

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen, zur Reinigung von PCR-Produkten und zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktionsansätzen wurde das MN NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben benutzt.

2.6.1.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

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

ds-DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml.

ss-DNA und RNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml.

Die Reinheit der DNA wurde anhand der Quotienten OD_{260}/OD_{280} bzw. OD_{260}/OD_{230} bestimmt, die zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen oder Polysacchariden liegt der Wert unter 1,8.

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleinsäuren wie DNA und RNA genutzt. Sie diente der Kontrolle der DNA- und RNA-Isolation, der

Kontrolle der PCR, der Kontrolle der Restriktionsenzymspaltung und der Konzentrationsbestimmung. Soweit nicht anders angegeben, wurden 1 % ige (w/v) Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8 mit Essigsäure einstellen) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM Na₂EDTA, 34 % (v/v) Glycerin) gemischt. Als Größenstandard diente je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente der Größenstandard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus oder GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Auftrennung erfolgte je nach der Größe des Gels bei einer Spannung von 70 – 100 V für etwa 1 h. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und das in die Doppelstränge interkalierte Ethidiumbromid durch UV-Anregung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Quantum (Peq-Lab, Erlangen).

Zur Auftrennung von Gesamt-RNA wurde die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Üblicherweise wurden 1,5 % ige (w/v) Agarose-Gele in MOPS-Puffer (50 mM MOPS, 1 mM EDTA, 1,5 % (v/v) Formaldehyd) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem 4-fachen Probenvolumen an RNA-Ladepuffer (50 mM MOPS, 50 % (v/v) Formamid, 7 % (v/v) Formaldehyd, 15 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei 60 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Die Auswertung erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Quantum (Peq-Lab, Erlangen).

2.7 Rekombinante DNA-Techniken

Zur Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot bzw. Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben benutzt. Die Ansätze (50 - 100 µl für präparative Arbeiten, 10 µl für analytische Arbeiten) enthielten in der Regel 200 ng – 10 µg DNA und 5 – 15 U des gewünschten Enzyms und wurden 2 h oder über Nacht bei der vorgeschriebenen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Der Erfolg der Spaltung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde durch Behandlung linearer Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektoranteils bei der Ligationsreaktion vermieden. Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Zur Dephosphorylierung der 5'-Stränge wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase („Shrimp alkaline phosphatase“, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 10 min bei 72 °C.

Für Ligationen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim oder Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet.

2.7.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine RbCl_2 -Behandlung erhielten *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen (Hanahan, 1985). Zur Herstellung wurden einige große Kolonien von einer frischen LB-Platte in 1 ml SOB-Medium resuspendiert und damit 50 ml SOB-Medium inokuliert. Bei Plasmid-tragenden Stämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 120 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Falcontubes überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 15 min bei 3500 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) und 4 °C geerntet, in eiskalter RF1-Lösung (100 mM RbCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl_2 , 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in eiskalter RF2-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl_2 , 75 mM CaCl_2 , 15% Glycerin, pH 6,8) resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

2.7.2 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 µl der Zellen mit etwa 0,5 µg Plasmid oder dem kompletten Ligationsansatz gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Plasmids wurde der Ansatz auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

2.7.3 Herstellung elektro-kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Zur Herstellung elektro-kompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde eine Vorkultur aus 50 ml BHIS-Medium von einer frischen BHIS-Platte angeimpft und 15 h bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Bei Plasmid-tragenden Stämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. 10 ml der Vorkultur wurden dann zur Inokulation der Hauptkultur in 500 ml vorgewärmtem BHIS-Medium eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 120 Upm bis zu einer OD_{600} von 1,75 (van der Rest *et al.*, 1999). Die Zellen wurden dann 15 min bei 3500 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) und 4 °C geerntet, in 25 ml TG-Puffer (1 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift mit TG-Puffer wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 10 %-igen (v/v) Glycerin gewaschen, in 1 ml

10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Portionen von 150 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C gelagert.

2.7.4 Transformation elektro-kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Transformation der elektro-kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock durchgeführt (Tauch *et al.*, 2002c). Dazu wurden 150 µl kompetente Zellen mit etwa 1 µg Plasmid in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette gemischt und mit 800 µl 10 %-igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 4 ml BHIS-Medium suspendiert, 6 min bei 46 °C inkubiert, 1 h bei 30 °C regeneriert und auf BHIS-Platten mit dem passenden Antibiotikum ausplattiert.

2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Definierte DNA-Fragmente wurden sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanten und Deletionsmutanten, 2.8.1) als auch für präparative Zwecke (*in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten, 2.8.2) mittels der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert (Mullis & Faloona, 1987). In abgewandelter Form wurde die PCR in Form der quantitativen Real-Time PCR auch zur Kontrolle der Expression einzelner Gene genutzt (2.8.3). Falls im Text nicht anders vermerkt, wurde für präparative PCR-Ansätze die KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt) und für analytische PCR-Ansätze die Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Reaktionen wurden in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert (Tabelle 2.4). Zur Reinigung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macharey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

2.8.1 *In vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Diese Ansätzen enthielten 0,1 – 0,75 µg Matrizen-DNA, je 300 nM vorwärts- und rückwärts-Oligonukleotide, 0,02 U KOD Hot Start DNA Polymerase, 1,5 mM MgSO₄, sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C wurden 35 Zyklen nach Herstellerangaben

durchlaufen: Die Anlagerungs-Temperatur wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide gewählt. Die Schmelztemperatur T_m der DNA kann mit der Formel $T_m [^\circ\text{C}] = [(G + C) \cdot 4] + [(A + T) \cdot 2]$ abgeschätzt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Als Elongationszeit wurden 30 s pro 1 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.8.2 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von *E. coli*-Transformanden wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte abgenommen und direkt dem PCR-Ansatz als Matrize zugesetzt. Der an der Pipettenspitze verbliebene Rest der Zellen wurde auf einer frischen LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Die PCR erfolgte in Ansätzen von 25 µl Gesamtvolumen, die neben der Kolonie als Matrizen-DNA je 400 nM vorwärts- und rückwärts-Oligonukleotide, 1,25 U Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP enthielten. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz zunächst 5 min bei 95 °C inkubiert und danach 35 Zyklen nach Herstellerangaben durchlaufen. Die Berechnung der Anlagerungs-Temperatur und der Elongationszeit erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben.

2.8.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Weiterentwicklung der klassischen PCR, die nicht nur die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, sondern gleichzeitig auch die Quantifizierung der Produkte nach jedem Zyklus erlaubt. Mittels dieser Methoden ist es möglich, die Ausgangskonzentration des Templates zu berechnen und damit Rückschlüsse zum Beispiel auf die relative Expression spezifischer Gene zu gewinnen. Dabei wird zum Beispiel der Fluoreszenzfarbstoff Sybr[®] Green I genutzt, der nach Interkalieren in doppelsträngige DNA-Fragmente und UV-Bestrahlung eine spezifische Fluoreszenzstrahlung zeigt.

In einem ersten Schritt muss dazu RNA (2.6.1.3) in cDNA umgeschrieben werden, die dann als Template für die quantitative Real-Time PCR dient. Die Synthese der cDNA erfolgte ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, die durch reverse Transkription mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 2.4) und reverser Transkriptase (Omniscript Reverse Transkriptase, Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde vor der Synthese für 5 min bei 70 °C denaturiert, 1 min bei 57 °C inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989) und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der vorbereitete Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden und reverser Transkriptase nach Herstellerangaben zugegeben. Die Synthese erfolgte für 1 h bei 37 °C. und wurde durch Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C abgebrochen. Verdünnungen der synthetisierten cDNA (1:10) wurden ohne weitere Reinigung als Template in der Real-time PCR eingesetzt.

Als Reagenzien für die quantitative Real-Time PCR dienten die Bestandteile des DyNAmo Capillary SYBR® Green qPCR Kits (Finnzymes, Espoo, Finnland). Pro Ansatz wurden 10 µl 2 x Master Mix, je 1 µl vorwärts- und rückwärts Oligonukleotid, 2 µl Template (1:10 verdünnte cDNA) und 6 µl H₂O zusammengegeben und im Light Cycler 1.0 mit dem Standardprogramm amplifiziert und ausgewertet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (Invitrogen, Karlsruhe) bindet doppelsträngige DNA und hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 521 nm. Bei der Messung der cDNA-Konzentration erfolgte eine Anregung der in speziellen Kapillaren (LightCycler Capillaries, Roche, Mannheim) vorliegenden Proben durch eine blaues Licht emittierende Diode (LED) mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem Kanal F1 bei einer Wellenlänge von 530 nm nach Herstellerangaben. Nach einer Vorinkubation erfolgte die Amplifikation und das Produkt wurde fortlaufend per Fluoreszenzmessung analysiert. Die Spezifität der PCR-Reaktion erfolgte anhand der Schmelzkurvenanalyse. Parallel zu den Proben wurde das Referenzgen *ddh* (*meso*-Diaminopimelatdehydrogenase) zur Normierung amplifiziert, um so eventuelle Ungenauigkeiten durch abweichende PCR-Effizienz oder Template-Konzentration zu berücksichtigen. Darüber hinaus sollten sich die Transkriptionsstärken der zu untersuchenden Gene und des Referenzgens nicht zu stark unterscheiden.

Die Quantifizierung basierte auf der Steigung der Geraden in der exponentiellen Phase und diese korrelierte mit dem Ursprungsgehalt an cDNA in der Probe. Der Wert wurde für jedes Gen mit Standardwerten (1 pg/µl – 0,1 fg/µl) berechnet, wobei die spezifische Standardkurve aus mindestens fünf Werten erstellt wurde. In dieser Arbeit wurde der Crossing Point (CP) herangezogen, um die DNA-Konzentration der Probe anhand der Standardgeraden zu berechnen, weil in dieser Phase der PCR die Effizienz konstant war. Der CP war der Zyklus der Real-Time PCR, an dem die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz überstieg.

2.9 DNA-Microarray-Technologie

2.9.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen (20 - 25 µg) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum Standardprotokoll wurden für die DNA-Microarrays in dieser Arbeit nicht RNA-Proben aus *C. glutamicum* Zellen isoliert, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase, sondern in der stationären Phase befanden, benutzt. Die cDNA-Sonden wurden aus präparierter RNA mittels reverser Transkriptase 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 nm, grün, Amersham Biosciences) und Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 670 nm, rot, Amersham Biosciences) verwendet. Die RNA (20- 25 μg Gesamt-RNA in 14 μl H_2O gelöst) wurde mit 1 μl einer 500 ng/ μl pdN6 Zufallshexanukleotid-Primer-Lösung (in bidest. H_2O gelöst, Amersham Biosciences) für 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Die reverse Transkription wurde mit 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 MgCl_2 , 10 mM DTT), 3 μl DTT (0,1 M), 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; Invitrogen, Groningen) durchgeführt (Wendisch *et al.*, 2001). Der Ansatz wurde 10 min bei RT und anschließend 110 min bei 42 °C inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde die RNA durch Zusatz von 10 μl NaOH (0,1 N) 10 min bei 70°C hydrolysiert. Die Lösung wurde mit 10 μl HCl (0,1 N) neutralisiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Ultrazentrifugationseinheiten (Microcon YM-30, Millipore). Der Ansatz wurde mit Wasser auf 500 μl aufgefüllt, durch Zentrifugation (10 min, 13000 g) auf etwa 20 μl eingengt und dieser Schritt nochmals wiederholt. Danach wurden die für eine Hybridisierung vorgesehenen Cy3- bzw. Cy5-markierten Sonden vereinigt und es erfolgte, wie oben beschrieben, eine weitere Ultrafiltrationszentrifugation (10 min, 13000 g). Die so erhaltene cDNA-Sonde (\sim 5 μl) wurde sofort für die DNA-Chip-Hybridisierungen eingesetzt.

2.9.2 DNA-Chip-Hybridisierung

Die DNA-Chips wurden von der Firma Operon (Köln) nach den Vorgaben des IBT hergestellt. Auf die DNA-Chips wurden spezifische, synthetisierte Oligonukleotide gespottet (u.a. 3057 offene Leseraster (ORFs), 1176 intergenische Regionen, 60 tRNA-Gene und 15 rRNA-Gene). Als Matrize für die Synthese der Oligonukleotide (ORFs und intergenische Regionen) diente das Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032.

Vor der Bestimmung der relativen mRNA-Spiegel wurde der DNA-Chip 1 h bei 42 °C in OpArray Pre-Hyb Lösung (Operon, Köln), im Anschluss 5 min bei 37 °C in Waschlösung 1 (6,25 ml OpArray Wash B ad 250 ml mit bidest. Wasser) und in Wasser gewaschen und getrocknet (Wendisch *et al.*, 2001). Die aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden wurden vereinigt (\sim 5 μl) und 50 μl OpArray Hyb Lösung (Operon, Köln) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Vor der Hybridisierung wurde ein Spezialdeckglas (MAUI Mixer AO, BioMicro) auf den DNA-Chip befestigt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung sicherzustellen und Austrocknung der Probenlösung zu vermeiden. Die Sonden wurden auf den Chip gegeben und dieser in einer MAUI-Hybridisierungskammer (BioMicro, Salt Lake City, USA) über Nacht bei 42 °C inkubiert. Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte cDNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen des DNA-Chips für je 10 min in Waschlösung 2 (40 ml OpArray Wash A, 20 ml OpArray Wash B ad 400 ml mit bidest. Wasser) bei

42 °C und in Waschlösung 3 (25 ml OpArray Wash A ad 250 ml mit bidest. Wasser) im Dunkeln bei 37 °C. Nun wurde der Chip noch 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur in Waschlösung 4 (5 ml OpArray Wash A ad 250 ml mit bidest. Wasser) gewaschen. Durch Zentrifugation (5 min, 1600 g, RT, Zentrifuge 4K15, Rotor 11150, Einsätze 13220 von Sigma) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

2.9.3 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen

Um die relativen mRNA-Spiegel der zu vergleichenden Proben zu bestimmen, wurde die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Da das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots unter geeigneten Bedingungen direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben korreliert, ist es ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon *et al.*, 1996; Wendisch *et al.*, 2001). Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der Axon GenePix 6000 Laser Scanner (Axon Instruments, Sunnydale, USA) verwendet. Die DNA-Chip-Oberfläche wurde zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppen mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen bestrahlt, eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und die andere für Cy5-dUTP (635 nm). 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. Die gemessene Stromstärke korreliert somit 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 6.0 Software). Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die 'GenePix Array List' (erstellt von Dr. T. Polen, IBT-1) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen und die Resultate wurden im GPR-Format gespeichert. Im Anschluss wurden die DNA-Microarray-Daten normiert und statistisch ausgewertet. Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit *p*-Werten >0,05 wurden als statistisch nicht signifikant verändert betrachtet. Die DNA-Chip-Daten wurden mit Hilfe einer von T. Polen entwickelten Software (Polen *et al.*, 2003; Polen & Wendisch, 2004) erfasst und auf dem Zentralrechner des Instituts in der IBT Microarray Datenbank hinterlegt.

2.10 DNA-Sequenzanalyse

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde die durch QIAprep Spin Miniprep Kit oder Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isolierte hochreine DNA mit den

entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 2.4) bei der Firma LGC Genomics (Berlin) sequenziert. Pro Reaktion waren dabei 1 µg Plasmid-DNA und 20 pmol Oligonukleotide notwendig.

2.11 Biochemische Methoden

2.11.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zum Aufschluss der Zellen wurde das Pellet von 50 ml Kultur in 1,8 ml Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend in 2 ml-Reaktionsgefäßen in einem Eisbad mit Ultraschall behandelt. Zellpellets von *E. coli* wurden dabei für 4 min mit einer Pulslänge von 20 % und einer Beschallintensität von 2 mit dem Ultraschalldesintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA) behandelt. Aufgrund der Zellwandstruktur wurden Zellpellets von *C. glutamicum* für 10 min unter den oben genannten Bedingungen beschallt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.11.2 Nachweis von Proteinen im Kulturüberstand von *C. glutamicum*

Zum Nachweis von Proteinen im Kulturüberstand von *C. glutamicum* wurde mit einer Einzelkolonie des Stamms zunächst eine 5 ml-Kultur in CGIII-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Nach Kultivierung für etwa 8 h (30 °C, 170 Upm) wurde mit dieser die Vorkultur in 50 ml CGIII mit dem entsprechenden Antibiotikum inokuliert und für weitere 15 h bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Die Hauptkultur wurde daraufhin nach Zentrifugation der Zellen (10 min, 6100 g, 4 °C) auf eine OD₆₀₀ von 1 in 50 ml CGIII mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft, die Genexpression sofort durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und die Zellen bei 30 °C und 120 Upm kultiviert. Nach 5 h und 24 h wurden Proben für den Proteinnachweis genommen. Dazu wurden insgesamt 4 ml der Kultur in einem 2 ml-Reaktionsgefäß nacheinander zentrifugiert (10 min, 16000 g, RT). Die Überstände wurden abgenommen, in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, zum Fällern der Proteine mit je 200 µl 100 % Trichloressigsäure (TCA, Endkonzentration 10 %) versetzt und für mindestens 15 h bei 4 °C inkubiert. Die so ausgefällten Proteine wurden durch erneute Zentrifugation pelletiert (30 min, 16000 g, 4 °C) und nacheinander in 100 % und 80 % Aceton gewaschen. Das jeweils erste Pellet jeder Probe wurde in 80 µl 50 mM Tris (pH 7,5) gelöst, komplett ins

zweite Pellet überführt und auch dieses gelöst. Um das Lösen zu verbessern wurden die Proben schüttelnd auf 37 °C erhitzt. Die Zellpellets der Kulturen wurden in 200 µl Lysepuffer (10 mM Tris (pH 8,0), 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl) gelöst und in 2 ml-Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss und 500 µg Zirkonium/Silica-Perlen (Ø 0,1 mm, ROTH, Karlsruhe) überführt. Der Aufschluss erfolgte mechanisch für 3 min im Homogenisator Speedmill P12 (Analytik Jena, Jena). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt benutzt. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Überstandsproben und die Rohextrakte mit 1/6 des Volumens mit 6x SDS-Ladepuffer (2.11.5) versetzt und 10 min auf 95 °C erhitzt. Für die Elektrophorese wurden Volumen der Rohextrakte aufgetragen, die einer OD₆₀₀ von 0,5 entsprachen. Von den Überstandsproben wurden Volumina aufgetragen, die einer OD₆₀₀ von 1,5 entsprachen.

2.11.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Hierbei wurden 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) versetzt, zunächst 30 min bei 60 °C, dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 3300 pro Spectrophotometer, Amersham Biosciences). Als Standard wurden definierte Konzentrationen von Rinder-Serumalbumin (BSA) verwendet.

2.11.4 Chromatographische Methoden

2.11.4.1 Größenausschluss-Chromatographie

Das apparente, native Molekulargewicht von Proteinen wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert. Hierfür wurde das Protein mittels einer Superdex™ 200 10/300 Säule (GE Healthcare), welche an ein ÄKTA™ Explorer-System (GE Healthcare) angeschlossen war, aufgetrennt. Die Säule wurde zuvor mit dem jeweiligen Puffer äquilibriert. Für die Größenbestimmung wurde 1 mg Protein im entsprechenden Puffer auf die Säule gegeben und bei 4 °C mit einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Zur Kalibrierung wurden Molekulargewichtsmarker (MWGF200, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) unter den gleichen Bedingungen analysiert. Die durch die Auftragung von V_E/V_0 (V_E : Elutionsvolumen (ml), V_0 : Totvolumen (ml)) gegen das Molekulargewicht (kDa) erhaltene Ausgleichsgerade wurde zur Bestimmung des Molekulargewichtes des untersuchten Proteins benutzt. Für die Standardläufe wurden β -Amylase (200 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa) und Carbon-Anhydrase (29 kDa) nach Herstellerangaben in H₂O gelöst und chromatographisch aufgetrennt. Für präparative Zwecke wurden die Elutionsfraktionen in 1 ml-Aliquots gesammelt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Kontrolle der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.11.5).

2.11.4.2 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit einem Polyhistidin-Tag erfolgte über an Agarose gebundene Nickel-Nitrilotriessigsäure (Hochuli, 1988). Dazu wurden Säulen mit einem Bettvolumen von 1 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden) vorbereitet und mit 25 ml des in 2.11.1 erwähnten Lysispuffer äquilibriert. Soweit nicht anders beschrieben wurde der komplette Rohextrakt auf die Säule geladen und schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit 2 ml Waschpuffer-60 (wie Lysispuffer, aber 60 mM Imidazol) und 4 ml Waschpuffer-100 (wie Lysispuffer, aber 100 mM Imidazol) entfernt. Zur Elution des spezifisch gebundenen Proteins wurden 5 x 1 ml Elutionspuffer-250 (wie Lysispuffer, aber 250 mM Imidazol) aufgetragen und einzeln aufgefangen. Alle Elutionsfraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Kontrolle der Reinigung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.11.5).

2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung löslicher Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970; Lewis *et al.*, 1970). Hierfür wurden 10 %ige oder 12 %ige Bis-Tris-Polyacrylamidgele (Invitrogen, Karlsruhe) in vertikalen Gelkammern (NuPAGE System, Invitrogen, Karlsruhe) und 1x MOPS-Puffer (2,5 mM MOPS, 2,5 mM Tris, 50 nM EDTA, 0,005 % SDS (pH 7,7)) verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x SDS-Ladepuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 60 mM DTT, 30 % (v/v) Glycerin, 0,175 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Protein Marker Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, München), der Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) oder der PageRuler Unstained Protein Ladder Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V.

Die Färbung der Proteine erfolgte mittels des kolloidalen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau. Zur Färbung wurden die Gele zunächst kurz in H₂O gewaschen, mit der Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie, 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) bedeckt, 1 min bei maximaler Stärke in der Mikrowelle erhitzt und dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von überschüssigem Farbstoff wurde die Färbelösung abgegossen, das Gel einmal mit H₂O gewaschen, mit Coomassie-Entfärbelösung (10 % Ethanol, 7,5 % Essigsäure) bedeckt, für 1 min bei maximaler Stärke in der Mikrowelle erhitzt und erneut mind. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine weitere Entfärbung wurden die Gele über Nacht in 10 %iger Essigsäure inkubiert.

2.11.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für die Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analyse wurden Proteinbanden aus Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelen ausgeschnitten, entfärbt und im Gel tryptisch verdaut

(Fountoulakis & Langen, 1997). Hierzu wurden die Gelstückchen zweimal für je 10 min in 350 μ l 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril gewaschen und für 20 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Rehydratisierung erfolgte in 4 μ l 3 mM Tris/HCl (pH 8,8) mit 10 ng/ μ l Trypsin (Promega, Mannheim). Nach 30 min wurden weitere 6 μ l 3mM Tris/HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 12 μ l H₂O, 15 min Inkubation bei Raumtemperatur, Zugabe von 10 μ l 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und weiterer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur eluiert. Anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der Peptide durch die Konzentrierung per ZipTip[®] C₁₈ standard bed (Millipore) erhöht, um die Auswertbarkeit der Proben zu verbessern. Danach wurden die Proteinfragmente mit gesättigter α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure in 50 % (v/v) Acetonitril und 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure eluiert und auf die Probenplatte aufgetragen. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des Sequazyme Peptide Mass Standard Kits (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Darmstadt) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurde die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datendank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen oder in einer benutzerdefinierten Datenbank mit Hilfe des MS-Fit-Programms (Clauser *et al.*, 1999) genutzt.

2.11.7 Gelretardationsanalysen

Um zu untersuchen, ob ein Protein an ein spezifisches DNA-Fragment bindet, wurden die Fragmente mittels PCR amplifiziert und mit dem MN NucleoSpin Extrakt II Kit (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt. Je 100 ng des PCR-Produktes wurden zusammen mit verschiedenen Protein-Konzentrationen in 50 mM NaH₂PO₄ und 150 mM KCl (pH 8,0) 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 4 μ l Ladepuffer (0,1 % (w/v) Xylencyanolblau, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin in 1x TBE) versetzt und in einem 10 %-igen nativen Gel (Acrylamid:Bisacrylamid 75:1) (2,44 ml 40 % (w/v) Acrylamid, 0,666 ml 2 % (w/v) Bisacrylamid, 1 ml 10x TBE, 5,78 ml H₂O, 40 μ l 25 % (w/v) APS und 10 μ l TEMED) aufgetrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1x TBE (5,5 g/l Borsäure, 0,74 g/l Na₂EDTA x 2 H₂O, 10,8 g/l Tris-HCl) (Schaaf & Bott, 2007). Die Elektrophorese erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 140 V. Anschließend wurden die DNA-Banden mittels Ethidiumbromid-Färbung und Belichtung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Quantum (PeqLab, Erlangen).

2.12 Messung von Enzymaktivitäten

2.12.1 Messung der Racemaseaktivität

Die Messung der Racemaseaktivität erfolgte entweder mit heterolog exprimiertem und gereinigtem Enzym oder mit Rohextrakten aus *C. glutamicum*. In einem ersten Schritt wurden die Proteinfractionen dazu über PD-10 Entsalzungs-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben in 10 mM CAPS (pH 10,0) umgepuffert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.11.3) wurden 2 - 200 µg gereinigtes Protein bzw. 30 – 800 µg Gesamtprotein im Rohextrakt für die Assays eingesetzt. Die entsprechende Menge Proteinlösung wurde dazu mit 50 mM Substrat (L-Arginin, L-Lysin, L-Ornithin oder L-Serin, gelöst in H₂O bidest.) und 250 nM Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) gemischt, mit 10 mM CAPS (pH 10,0) auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufgefüllt und der Ansatz bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden Aliquots á 150 µl entnommen, mit 50 µl 10 %iger Trichloressigsäure gemischt und bei -20 °C gelagert. Die Analyse der Enantiomerbildung erfolgte mittels RP-HPLC (2.13.2).

2.12.2 Messung der Aktivität der Tryptophan-Synthase

Die Aktivität der Tryptophan-Synthase wurde mit ganzen Zellen von *E. coli* oder *C. glutamicum* bestimmt. Zur Messung der Aktivität mit *E. coli*-Zellen wurden 2 x 100 ml LB-Medium von einer Platte angeimpft und bei 37 °C, 120 Upm für 15 h kultiviert. Zur Messung der Aktivität mit *C. glutamicum*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur in 50 ml CGIII-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum von einer Platte angeimpft und etwa 10 h bei 30 °C und 120 Upm kultiviert. Aus dieser wurden dann zwei Hauptkulturen in je 100 ml CGIII mit dem entsprechenden Antibiotikum auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft, mit 0,1 mM IPTG die Genexpression induziert und die Kultur für etwa 15 h bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf vier 50 ml-Falcons aufgeteilt, pelletiert (3500 g, 20 min, 4 °C), die einzelnen Pellets in je 2 ml Saline (0,9 % NaCl) resuspendiert, vereint, auf 50 ml mit Saline aufgefüllt und erneut pelletiert (3500 g, 20 min, 4 °C). Für jeden Ansatz wurden 0,5 g Feuchtmasse in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen eingewogen. In jeden Kolben wurden je 100 ml der Reaktionslösung (2 g/l L-Serin, 2 g/l Indol (Amino GmbH, Frellstedt), 10 ml Pyridoxal-5'-Phosphat-Lösung (1 mg/ml) in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0)) gegeben und bei 37 °C, 120 Upm inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots für die HPLC-Analyse entnommen, die Zellen pelletiert (16000 g, 10 min, RT) und der Überstand verdünnt in die HPLC eingesetzt. Die Analyse erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben.

2.13 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels RP-HPLC

2.13.1 Quantitativer Nachweis von L-Aminosäuren

Die Quantifizierung von Aminosäuren wurde mit Hilfe der *Reversed-Phase High-Performance-Liquid-Chromatography* (RP-HPLC) durchgeführt (Jones & Gilligan, 1983). Vor der säulenchromatographischen Auftrennung erfolgte eine Derivatisierung der Aminosäuren mit dem Reagenz *o*-Phthaldialdehyd, das mit der Aminogruppe der Aminosäuren reagiert (Jones & Gilligan, 1983; Lindroth & Mopper, 1979). Für die automatische Derivatisierung wurden je 1 µl der Probe mit 20 µl *o*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol-Lösung (Pierce Europe BV, Niederlande) vermischt und nach Inkubation für eine Minute bei Raumtemperatur im Probenraum zur Auftrennung auf eine RP-HPLC Säule (LiChrospher 100 RP 18 EC 5 µm, 125 x 4 mm) mit vorgeschalteter Vorsäule (LiChrospher 100 RP 18 EC 5 µm, 40 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe) injiziert. Die bei der Derivatisierung entstandenen thiosubstituierten Isoindolverbindungen wurden bei einer Flussrate von 0,8 ml/min mit einem Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration von der Säule eluiert (Tabelle 2.6). Als polarer Laufpuffer diente hierbei 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2). Die Detektion der fluoreszierenden Derivate erfolgte nach Anregung bei 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Zur säulenchromatographischen Auftrennung und Detektion wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP1100 (Hewlett Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet. Die Systemsteuerung und Datenauswertung erfolgte mit dem Programm HP-Chemstation (Hewlett Packard, Waldbronn). Die Konzentration der jeweils analysierten Aminosäure wurde über den Vergleich mit einem externen Standard der betreffenden Aminosäure ermittelt. Alle Aminosäuren wurden dazu in Konzentrationen von 1 M bis 1 mM in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Verdünnung der Standards erfolgte direkt vor der Messung ebenfalls in H₂O.

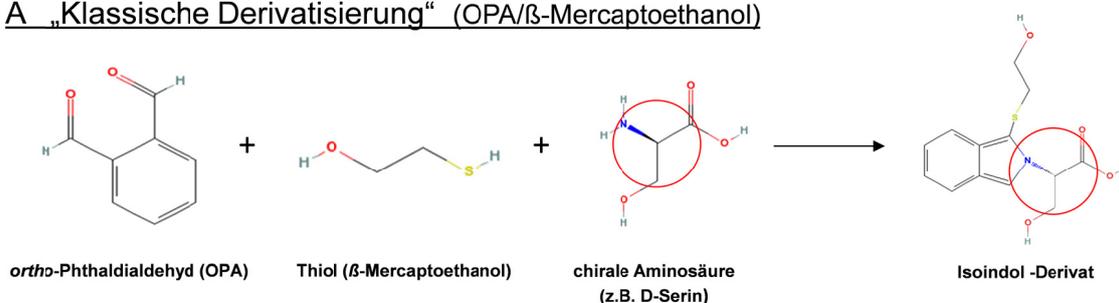
Tabelle 2.6: Nachweis verschiedener Aminosäuren mittels RP-HPLC

	L-Ser/L-Trp		D, L-Ser / D, L-Arg		D, L-Lys / D, L-Orn	
Derivatisierungs-Reagenz	OPA		OPA-BocC		OPA-BocC	
Gradient	min	% MeOH	min	% MeOH	min	% MeOH
	1,00	30	1,00	30	1,00	50
	14,00	50	12,00	47	14,00	70
	18,00	85	13,00	85	15,00	85
	25,00	85	16,00	85	16,00	85
	25,01	20	16,01	30	16,01	50

2.13.2 Trennung und quantitativer Nachweis von Enantiomeren

Zur Trennung und zum quantitativen Nachweis von Enantiomeren wurde die klassische RP-HPLC (2.13.1) mit einer abgewandelten Vorsäulenderivatisierung benutzt. Wie in Abbildung 2.1 zu sehen, führt die im vorherigen Kapitel beschriebene „klassische Derivatisierung“ mit *o*-Phthaldialdehyd und β -Mercaptoethanol zur Bildung fluoreszierender Isoindol-Derivate. Da diese allerdings nur ein chirales Zentrum besitzen, werden abhängig von der Konformation der derivatisierten Aminosäuren immer Enantiomere gebildet, die physikalisch gleiche Eigenschaften besitzen und damit in der RP-HPLC nicht voneinander getrennt werden können. Aus diesem Grund wird zur Trennung von Enantiomeren anstelle von β -Mercaptoethanol ein chirales Thiol wie Boc-L-Cystein (BocC) genutzt (Buck & Krummen, 1984; Hashimoto *et al.*, 1992b). Die gebildeten Isoindol-Derivate besitzen so zwei chirale Zentren, wobei eines abhängig von der Konformation der eingesetzten Aminosäure ist. Als Diastereomere besitzen die Isoindol-Derivate damit auch unterschiedliche physikalische Eigenschaften, was eine Trennung von D- und L-Aminosäuren über die in 2.13.1 genannten Säulen und Puffer ermöglicht. Für die Derivatisierung wurden dazu 5 ml Lösung A (0,4 M Borat-Puffer (pH 10,4)) mit 100 μ l Lösung B (75 mg/ml OPA, 75 mg/ml BocC in Methanol) gemischt, à 1 ml in HPLC-Reaktionsfläschchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Analog zur klassischen Derivatisierung wurden 2,5 μ l der Probe mit 20 μ l OPA-BocC-Lösung gemischt, 1 min inkubiert und anschließend injiziert. Alle weiteren Bedingungen sind identisch zu den in 2.13.1 genannten.

A „Klassische Derivatisierung“ (OPA/ β -Mercaptoethanol)



B Derivatisierung zur Trennung von Enantiomeren (OPA/Boc-L-Cystein)

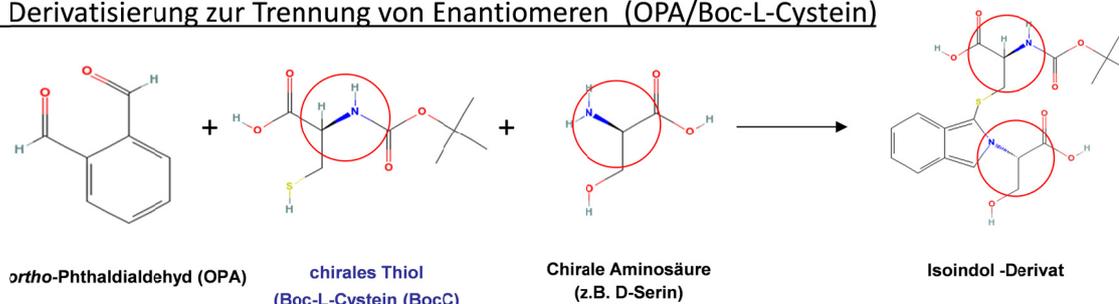


Abbildung 2.1: Vorsäulen-Derivatisierung bei der RP-HPLC. Chirale Zentren sind durch rote Kreise gekennzeichnet.

2.13.3 Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen

Zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen wurde die Methode der Silikonölzentrifugation nach Klingenberg und Pfaff (Klingenberg & Pfaff, 1977) eingesetzt. Hierbei kommt es zu einer schnellen Inaktivierung des Zellstoffwechsels sowie der raschen Abtrennung der Zellen vom Kulturüberstand. Es wurden 400 µl Beckman-Reaktionsgefäße (Beckman Instruments GmbH, München) mit 30 µl 20 %iger (v/v) Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl (Dichte = 1,04 g/cm³) befüllt. Um ausreichend Probenmaterial zu erhalten, wurde pro Messpunkt 3 x 200 µl Zellsuspension in insgesamt drei vorbereitete Beckman-Reaktionsgefäße überführt. Durch sofortige Zentrifugation für 45 s bei maximaler Geschwindigkeit (13750 Upm) in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) wurden die Zellen schnell vom Medium getrennt, während das nun zellfreie Medium aufgrund seiner geringeren Dichte als Überstand auf der Silikonölphase verblieb. Diese Überstände wurden direkt zur Bestimmung der extrazellulären Aminosäuren mittels RP-HPLC eingesetzt. Zur Quantifizierung der intrazellulären Aminosäuren wurden die in der Perchlorsäurephase vorliegenden, pelletierten Zellen zunächst nach der Methode von Hoischen und Krämer (Hoischen & Kramer, 1990) aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen nach Resuspendieren durch eine 5-minütige Inkubation im Ultraschallbad (Branson, Heusenstamm) aufgeschlossen und die erhaltene Suspension anschließend mit 5 M KOH und 1 M Triethanolamin neutralisiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 16000 g und 4 °C wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Die so erhaltenen Überstände wurden zur Bestimmung der Aminosäuren mittels RP-HPLC eingesetzt. Die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

$$c_{int} = \frac{(c_{int,gem} \cdot 100) - (c_{ex} \cdot 0,0599 \cdot OD_{600})}{0,04 \cdot OD_{600}}$$

c_{int} :	errechnete intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
$c_{int,gem}$:	gemessene intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
c_{ex} :	gemessene extrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
OD_{600} :	Zelldichte während der Kurzzeitfermentation

Nach dieser Formel erfolgte die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentration unter Berücksichtigung der bei der Aufarbeitung des Zellpellets durchgeführten Verdünnungsschritte ($c_{int,gem} \times 100$), eines Korrekturfaktors, der den Fehler einbezieht, der durch die Aminosäurekonzentration im an den Zellen anhaftenden Medium bedingt ist ($c_{ex} \times 0,0599 \times OD_{600}$) und des intrazellulären Volumens der eingesetzten Zellen ($0,04 \times OD_{600}$). Dabei wurde zugrunde gelegt, dass eine OD_{600} von 1 einem Zellrockengewicht von 0,3 mg/ml entspricht (Gutmann, 1993) und das Zellvolumen in *C. glutamicum* 1,6 µl/mg TG (Zittrich & Kramer, 1994) beträgt.

2.13.4 Bestimmung von Exportraten

Zur Bestimmung der Exportraten von D- und L-Serin durch den Serinproduktionsstamm *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-*argR* wurde zunächst eine erste Vorkultur in 50 ml CGIII-Medium mit 5 µg/ml Tetracyclin und 100 µg/ml Spectinomycin von einer frischen BHIS-Platte mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 30 °C und 120 Upm für etwa 15 h inkubiert. Aus dieser wurde dann die zweite Vorkultur in 100 ml CGXII-Glukose-Medium, 5 µg/ml Tetracyclin und 100 µg/ml Spectinomycin nach einmaligem Waschen der Zellen in Saline (0,9 % NaCl) auf eine OD₆₀₀ von 1,5 angeimpft und für etwa 10 h bei 30 °C und 120 Upm kultiviert. Die Hauptkultur in 50 ml CGXII-Glukose-Medium und 5 µg/ml Tetracyclin wurde aus der zweiten Vorkultur nach einmaligem Waschen in Saline auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft und bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Zur Bestimmung der Exportraten wurde nach etwa 15 h ein Aliquot aus dieser Hauptkultur entnommen, pelletiert (3500 g, 10 min, RT) und in frisches CGXII-Glukose-Medium mit 4 % Glukose und 5 µg/ml Tetracyclin auf eine OD₆₀₀ von 1 überführt. Für die Analyse von L- und D-Serin im Kulturüberstand wurden alle 20 min über einen Zeitraum von 4 Stunden Proben à 500 µl entnommen, pelletiert (16000 g, 10 min, RT), der Überstand erneut zentrifugiert (16000 g, 10 min, RT) und Verdünnungen in die RP-HPLC eingesetzt (siehe 2.13.2). Die Berechnung der Exportraten in nmol min⁻¹ (mg Trockengewicht)⁻¹ erfolgte anhand einer Ausgleichsgeraden und der Annahme, dass eine OD₆₀₀ von 1 bei *C. glutamicum* einem Zelltrockengewicht von 0,3 mg/ml entspricht (Gutmann, 1993).

2.14 Nachweis der Bindung eines Effektors an ein Zielprotein

2.14.1 Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz

Zum Nachweis der Bindung eines Effektors an den Transkriptionsregulator LysG wurde die intrinsische Proteinfluoreszenz von LysG in Abhängigkeit verschiedener bekannter oder putativer Effektoren gemessen. Die Proteinfluoreszenz beruht dabei auf den drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin und ist bei konstanten äußeren Bedingungen auch von der Proteinkonformation abhängig. Zur Messung wurde LysG heterolog exprimiert, mittels Ni²⁺-NTA-Chromatographie (2.11.4.2) und Größenausschluss-Chromatographie (2.11.4.1) gereinigt und in 50 mM NaH₂PO₄ + 150 mM KCl (pH 8,0) überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCTTM Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) (2.11.3) bestimmt. Für die Messungen wurden 5 µg/ml Protein mit 0,1 % Brij[®] 35 und 0 – 50 mM Effektor mit 50 mM NaH₂PO₄ + 150 mM KCl (pH 8,0) auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung von dreimal je 1 ml der Reaktionsmischung erfolgte bei 25 °C in Halb-Mikro-Küvetten (Quarzglas SUPRASIL[®],

10 mm x 4 mm, 1400 µl, Hellma, Müllheim) im Fluoreszenz-Spektrometer JASCO FP-6500/6600 (Jasco, Groß-Umstadt). Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm wurden die Spektren in einem Emissionsbereich von 300 – 380 nm mit der Spectra Manager™ Software (Jasco, Groß-Umstadt) dokumentiert.

2.14.2 Gelretardationsexperimente

Zum Nachweis der Bindung eines Effektors an den Transkriptionsregulator LysG mittels Gelretardationsexperimenten wurde das Protein heterolog exprimiert, mittels Ni²⁺-NTA-Chromatographie (2.11.4.2) und Größenausschluss-Chromatographie (2.11.4.1) gereinigt und in 50 mM NaH₂PO₄ + 150 mM KCl (pH 8,0) überführt. Die Gelretardationsexperimente erfolgten wie unter 2.11.7 beschrieben. Zusätzlich wurde den Ansätzen allerdings je 100 mM verschiedener Aminosäuren, die bekannte oder putative Effektoren sind, zugesetzt.

2.14.3 Nachweis der Ganz-Zell-Fluoreszenz mittels FACS

Zum Nachweis der Ganz-Zell-Fluoreszenz mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) wurde der BD FACSAria™ II Zellsortierer (BD Bioscience, San Jose, USA) mit den folgenden Einstellungen zur Messung der Fluoreszenz von *C. glutamicum*-Zellen benutzt (Davey & Kell, 1996).

PMT-Voltages	Forward scatter (FSC)	50 mV
	Side scatter (SSC)	550 mV
	eYFP (PMT 530/30)	600 mV
Thresholds	FSC	500
	SSC	500
	eYFP	250
Event rate	zwischen 1000 und 5000 pro Sekunde	
Flow rate	zwischen 1 und 6	
Nozzle size	70 µm	
Sheath pressure	70 psi	
Lösungsmittel für den Hüllstrom	BD FACSTFlow™ (PBS, steril filtriert, Ø 0,1 µm)	

Für die Analysen wurde *C. glutamicum* mit dem Plasmid pJC1_{lysGE'eYFP} (Wings, 2010) in einer ersten Vorkultur mit 50 ml CGIII-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin für 10 h bei 30 °C und 120 Upm kultiviert. Aus dieser ersten Vorkultur wurde eine zweite Vorkultur in 50 ml CGXII-Glukose-Medium mit 4 % Glukose und 25 µg/ml Kanamycin nach einmaligen Waschen der Zellen in Saline (0,9 % NaCl) auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft und erneut bei 30 °C und 120 Upm kultiviert. Nach 15 h Inkubation wurde die Hauptkultur in 15 ml CGXII-Glukose-Medium mit 4 % Glukose, 25 µg/ml und ggf. 50 mM Aminosäure als Effektor aus der zweiten Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft. Die

Inkubation erfolgte erneut bei 30 °C und 120 Upm. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in BD FACSTFlow™ in einem Volumen von 500 µl auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte unter den oben beschriebenen Parametern.

3 Ergebnisse

3.1 Verhalten von *C. glutamicum* ATCC13032 gegenüber D-Aminosäuren

3.1.1 Wachstum mit verschiedenen D-Aminosäuren

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob *Corynebacterium glutamicum* die Anwesenheit von D-Aminosäuren im Kulturmedium toleriert. Da für andere Mikroorganismen eine hemmende Wirkung von D-Aminosäuren (Sakinc *et al.*, 2009; Teeri, 1954; Tuttle & Gest, 1960; Yabu & Huempfer, 1974) auf das Wachstum gezeigt werden konnte, wurde in einem ersten Schritt das Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit von D-Aminosäuren betrachtet.

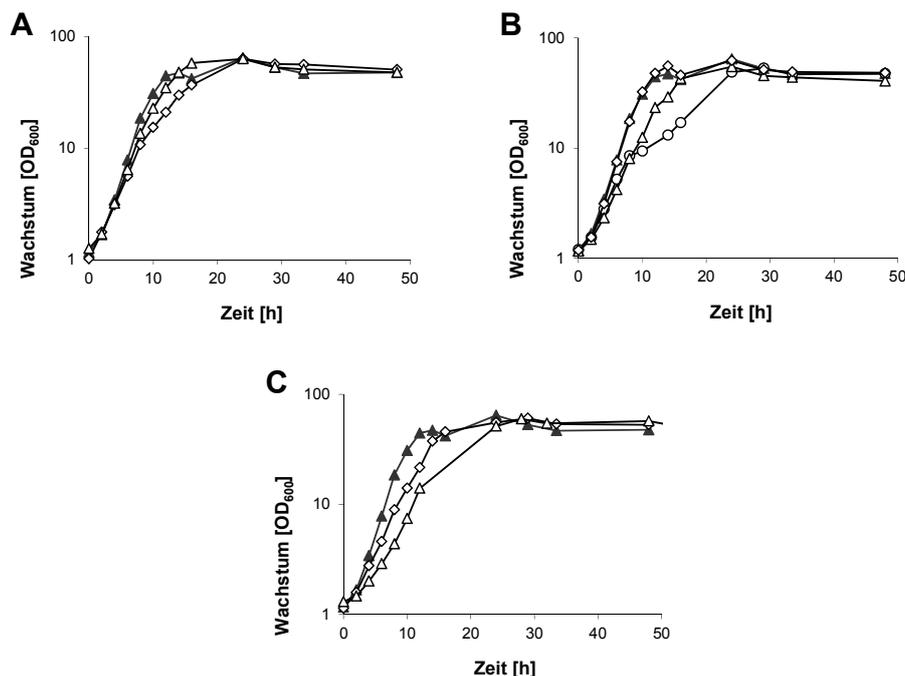


Abbildung 3.1: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Zugabe verschiedener D-Aminosäuren. Dargestellt ist das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Zugabe von 100 mM D-Aminosäure in CGXII-Glukose-Medium. (A) basische D-Aminosäuren (D-AS); ▲: ohne D-AS, △: D-Lysin, ◇: D-Arginin; (B) hydrophile D-AS; ▲: ohne D-AS, △: D-Serin, ◇: D-Threonin, ○: D-Asparagin; (C) hydrophobe D-AS; ▲: ohne D-AS, △: D-Methionin, ◇: D-Alanin

Hierzu wurde *C. glutamicum* ATCC13032 (Wildtyp) in einer Hauptkultur mit CGXII-Glukose-Minimalmedium und 100 mM verschiedener D-Aminosäuren bei 30 °C und

120 Upm kultiviert und das Wachstum aufgezeichnet. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, behinderte die Zugabe von bis zu 100 mM verschiedener D-Aminosäuren das Wachstum von *C. glutamicum* nur geringfügig oder wie im Falle von D-Threonin nicht. Die sich aus dem Wachstum der ersten 10 Stunden ergebenden Wachstumsraten sind in Tabelle 3.1 angegeben. Eine sehr starke, erst nach etwa 10 Stunden beginnende Wachstumsverzögerung zeigte sich bei Zugabe von D-Asparagin. Trotzdem war nach 24 Stunden Kultivierung in keiner der Kulturen, bei denen D-Aminosäuren zugesetzt wurden, ein Unterschied in der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp ohne D-Aminosäuren festzustellen.

Tabelle 3.1: Wachstumsraten von *C. glutamicum* mit D-Aminosäuren. Dargestellt sind die Wachstumsraten von *C. glutamicum* ATCC13032 in CGXII-Glukose-Minimalmedium und nach Zugabe von je 100 mM D-Aminosäure. Für die Berechnung wurde das Wachstum der ersten 10 h Kultivierung einbezogen. D-Thr: D-Threonin, D-Lys: D-Lysin, D-Arg: D-Arginin, D-Ala: D-Alanin, D-Ser: D-Serin, D-Asn: D-Asparagin, D-Met: D-Methionin.

	ohne	D-Thr	D-Lys	D-Arg	D-Ala	D-Ser	D-Asn	D-Met
μ (h^{-1})	0,38	0,39	0,33	0,28	0,28	0,28	0,24	0,20

3.1.2 Abbau verschiedener D-Aminosäuren

Es sollte weiterhin auch untersucht werden, ob die D-Aminosäuren durch *C. glutamicum* abgebaut werden. Dazu wurden die Konzentrationen der D-Aminosäuren in den unter 3.1.1 beschriebenen Kulturen im Überstand mittels HPLC bestimmt.

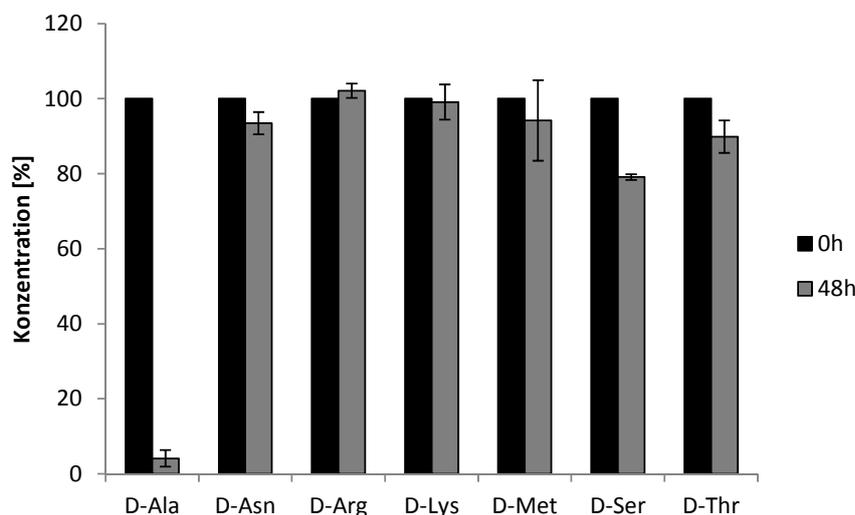


Abbildung 3.2: Konzentrationen der D-Aminosäuren im Überstand von Kulturen von *C. glutamicum* ATCC13032. Dargestellt sind die über HPLC ermittelten Konzentrationen an D-Aminosäuren im Überstand der Kulturen nach Zugabe von je 100 mM D-Aminosäure und Kultivierung in CGXII-Glukose-Medium. Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Dargestellt sind die mittleren prozentualen Werte. D-Ala: D-Alanin, D-Asn: D-Asparagin, D-Arg: D-Arginin, D-Lys: D-Lysin, D-Met: D-Methionin, D-Ser: D-Serin, D-Thr: D-Threonin.

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen, veränderten sich die Konzentrationen an extern zugegebenen D-Aminosäuren im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ATCC13032 zumeist nur leicht im Laufe der Kultivierung. Nach 48 Stunden konnte nur für D-Alanin ein vollständiger Abbau festgestellt werden, der wahrscheinlich auf die Aktivität der Alanin-Racemase Alr (NCgl0563), der daraus resultierenden Racemisierung zu L-Alanin (Oikawa *et al.*, 2006) und der anschließenden Verstoffwechslung über Pyruvat (Netzer *et al.*, 2004), sowie den Einbau von D-Alanin in die Zellwand zurückzuführen ist (Walsh, 1989). Auch für D-Serin konnte eine Abnahme von etwa 30 % nach 48 Stunden Kultivierung festgestellt werden, dessen Ursachen allerdings unklar waren.

3.1.3 Untersuchungen zum Abbau von D-Serin

Da D-Serin für die pharmazeutische Industrie ein begehrtes Produkt ist, ist die Produktion dieser D-Aminosäure mit *C. glutamicum* eines der Ziele dieser Arbeit. Um die Ausbeuten zu erhöhen, ist es für die biotechnologische Produktion dabei wünschenswert, dass das Produkt vom Produktionsstamm nicht weiter verwertet wird. Aus diesem Grund wurde die Abnahme der D-Serin-Konzentration von bis zu 30 % nach 48 Stunden im Überstand von *C. glutamicum*-Kulturen (Abbildung 3.2) im Folgenden weiter untersucht. Datenbankanalysen zeigten dabei, dass in *C. glutamicum* bislang kein Enzym beschrieben ist, das, wie zum Beispiel eine D-Serin-Deaminase (EC 4.3.1.18), eine Serin-Racemase (EC 5.1.1.18) oder eine D-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.3), D-Serin als Substrat nutzen kann. Kontrollversuche zeigten weiterhin, dass die D-Serinkonzentration im Medium konstant blieb, wenn keine Zellen vorhanden waren. Ein unspezifischer Zerfall oder eine spontane Racemisierung konnten damit ausgeschlossen werden. Im Folgenden wurde daher zunächst kontrolliert, ob die schon beschriebene L-Serin-Dehydratase SdaA (NCgl1583), die die Umwandlung von L-Serin zu Pyruvat katalysiert (Netzer *et al.*, 2004), auch Aktivität mit D-Serin besitzt. Dazu wurde das Gen *sdaA* in den Vektor pEKEx2 unter die Kontrolle des P_{tac} -Promoters kloniert und in *C. glutamicum* ATCC13032 überexprimiert. Während extern zugegebenes L-Serin in Kulturen des *sdaA*-überexprimierenden Stammes erwartungsgemäß deutlich schneller als in Wildtyp-Kulturen abgebaut wurde, konnte kein signifikanter Einfluss auf den D-Serin-Abbau festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch die in *C. glutamicum* beschriebene Alanin-Racemase Alr zeigte nach Überexpression in Rohextrakten von *C. glutamicum* keine Aktivität mit L- oder D-Serin (Daten nicht gezeigt). Dass sich *alr*-kodierte Alanin-Racemasen durch sehr hohe Spezifitäten auszeichnen, ist bereits bekannt (Oikawa *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007)

Um möglicherweise einen Zugang zum Verbleib von D-Serin durch eine globale Methode zu bekommen, wurden genomweite DNA-Microarrays in Anwesenheit von D-Serin durchgeführt. Dazu wurden die mRNA-Spiegel aus Kulturen ohne D-Serin mit solchen verglichen, bei denen die Konzentration an extern zugegebenem D-Serin im Kulturüberstand gerade abnahm. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, fand diese Abnahme stets

in der stationären Phase des Wachstums statt. Für das erste DNA-Microarray-Experiment wurde demnach, entgegen dem Standardprotokoll, das aufgrund der besseren Vergleichbarkeit Proben aus der exponentiellen Phase vorsieht, RNA aus der stationären Phase nach 30 Stunden Kultivierung präpariert.

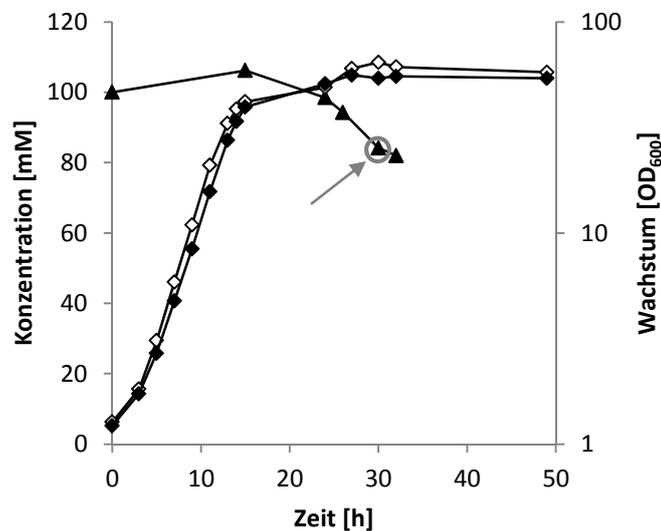


Abbildung 3.3: Wachstum und D-Serin-Konzentration von *C. glutamicum* Kulturen für die DNA-Microarray-Experimente. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII-Glukose-Medium von *C. glutamicum* ATCC13032 ohne extern zugegebenes D-Serin (Kultur 1, ◇) und mit 100 mM D-Serin (Kultur 2, ◆). Die D-Serin-Konzentration im Überstand von Kultur 2 ist ebenfalls dargestellt (▲). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem RNA aus beiden Kulturen für die DNA-Microarray-Experimente präpariert wurde.

Die Transkriptomanalyse zeigte für etwa 400 Gene signifikante Unterschiede in der Transkriptmenge um mehr als den Faktor 5 (Ratio > 2 bzw. < 0,5). Ein generelles Muster, das die Abnahme von D-Serin erklären würde, konnte allerdings nicht festgestellt werden. Interessanterweise zeigte ein Gen (Cg0701, NCgl0580) aber eine über 150-fache Erhöhung in der Transkriptmenge bei Anwesenheit von D-Serin, was als ein „On/Off-Signal“ gewertet werden kann. Es handelte sich hierbei um ein Gen, das für einen nicht näher definierten Transporter der Drug/Metabolite-Exporter-Familie kodiert. Einige Mitglieder dieser Familie, wie RhtA und YdeD aus *Escherichia coli*, sind dabei als Efflux-Pumpen für Aminosäuren und toxische Derivate bereits bekannt (Dassler *et al.*, 2000; Jack *et al.*, 2001; Livshits *et al.*, 2003). Auch in vier weiteren DNA-Microarray-Experimenten konnte die starke Expressionszunahme von Cg0701 infolge der Inkubation mit D-Serin nachgewiesen werden. Aufgrund von Problemen mit unspezifischer oder ungleichmäßiger Hybridisierung konnten diese Experimente aber nicht weiter ausgewertet werden. Um die Expression von Cg0701 genauer zu untersuchen, wurden quantitative Real-Time-PCR-Experimente durchgeführt. Zunächst konnten dabei die Daten der Microarray-Experimente bestätigt werden und eine etwa 30-fach stärkere Expression von Cg0701 in Kulturen mit D-Serin nachgewiesen werden. In weiteren Analysen aus neuen Anzuchten schwankten die Werte allerdings stark zwischen einer 1,5- bis 30-fach erhöhten Expression. Allerdings war der

Zeitpunkt der D-Serin-Abnahme in den einzelnen Kulturen variabel (Daten nicht gezeigt), was zusätzlich zur Tatsache, dass in der stationären Phase eine schlechte Reproduzierbarkeit globaler mRNA-Analysen gegeben ist, die sehr unterschiedlichen Expressionsdaten zu Cg0701 erklären könnte. Die Abnahme der D-Serin-Konzentration im Überstand von *C. glutamicum*-Kulturen konnte demnach nicht geklärt werden. In genomweiten Microarray-Analysen und quantitativen Real-Time-PCR-Experimente konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression eines für einen Transporter der DME-Familie kodierenden Gens nach D-Serin-Zugabe stark aktiviert wurde.

3.2 Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum*

Als Grundlage zur Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum* sollten Stämme dienen, die L-Aminosäuren wie L-Serin oder L-Lysin bilden. Aus diesen L-Aminosäuren sollte durch Racemisierung dann das entsprechende Racemat gebildet und daraus letztendlich die D-Aminosäure gewonnen werden. Da entsprechende L-Aminosäure-Produktionsstämme für L-Serin oder L-Lysin bereits bestanden, wurden zunächst Möglichkeiten zur Racemisierung getestet. Diese kann sowohl chemisch als auch enzymatisch mittels Racemasen durchgeführt werden.

3.2.1 Chemische Racemisierung von Serin

Prinzipiell ist eine Racemisierung von Aminosäuren durch Inkubation bei stark basischem pH und bei hohen Temperaturen möglich (Friedman, 2010; Schwass & Finley, 1984). Es sollte nun getestet werden, ob eine Racemisierung von Serin unter diesen Bedingungen auch direkt in der Kulturbrühe einer *C. glutamicum*-Kultur möglich ist. Dazu wurde *C. glutamicum* ATCC13032 aus einer Vorkultur in CGIII-Komplexmedium in eine Hauptkultur in CGXII-Glukose-Medium überimpft und 24 Stunden bis zum Erreichen der stationären Phase bei 30 °C inkubiert. Der Kulturbrühe wurde dann 40 g l⁻¹ L-Serin (etwa 380 mM) zugesetzt. Anschließend wurden Aliquots dieser Mischung auf einen stark sauren, neutralen oder stark basischen pH eingestellt und entweder bei Raumtemperatur oder bei 80 °C inkubiert. Die Konzentration der beiden Enantiomere in der Kulturbrühe wurde mittels HPLC bestimmt. Wie in Tabelle 3.2 zu sehen, konnte nur bei hoher Temperatur (80 °C) und stark basischem pH (pH 14) eine Racemisierung in der Kulturbrühe festgestellt werden. Diese lag mit 12 %, d.h. es lag 6 % D-Serin vor (siehe auch Legende zu Tabelle 3.2), nach 24 Stunden Inkubation aber sehr niedrig. Erst durch die Zugabe von Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) konnte die Geschwindigkeit der Racemisierung deutlich verbessert werden. Schon bei der ersten Probennahme nach 7 Stunden waren 46 % des L- in D-Serin umgewandelt. Durch die Ausbildung einer Schiff-Base mit der Aminosäure wirkt das PLP hier als nicht enzymatischer Katalysator (Ebberts *et al.*, 1997) (Ishiwata *et al.*, 1989).

Tabelle 3.2: Chemische Racemisierung von Serin in Kulturbrühe von *C. glutamicum*. Aufgeführt ist die Racemisierung in % bei verschiedenen Inkubationsbedingungen. Dabei entspricht eine 100 %ige Racemisierung einer Umsetzung von 50 % des eingesetzten L- zu D-Serin. PLP: Pyridoxal-5'-phosphat, RT: Raumtemperatur

Zusätze	Zeit	RT			80 °C		
		pH 2	pH 7	pH 14	pH 2	pH 7	pH 14
ohne PLP	24 h	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	12 %
+ 0,1 % PLP	7 h	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	92 %

Eine Racemisierung von Serin ist demnach bei hohen Temperaturen, einem stark basischem pH und nach Zugabe von PLP auch direkt in Kulturbrühe von *C. glutamicum* möglich.

3.2.2 Enzymatische Racemisierung

Im Gegensatz zur chemischen Racemisierung bietet die enzymatische Racemisierung eine Reihe von Vorteilen. So ist die Reaktion zumeist hoch spezifisch und sie läuft bei einem neutralen pH und gemäßigten Temperaturen ab. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass die Produktion der L-Aminosäure und die Bildung des Racemats innerhalb einer einzigen Zelle möglich sind. Durch die Transformation eines L-Aminosäureproduktionsstammes mit der passenden Racemase könnte so direkt ein Racemat gebildet werden, aus dem in einem weiteren Schritt die reine D-Aminosäure isoliert werden könnte.

Da der Fokus innerhalb dieser Arbeit besonders auf der Bildung von D-Serin mit *C. glutamicum* lag, wurden zunächst hoch-spezifische Serin-Racemasen untersucht. Da eine solche in *C. glutamicum* nicht vorhanden ist, musste ein entsprechendes Gen daher in einem anderen Organismus identifiziert und in *C. glutamicum* überexprimiert werden. Datenbankanalysen zeigten, dass Serin-Racemasen hauptsächlich in Eukaryoten verbreitet sind. Unter den Prokaryoten konnten hingegen nur einige wenige Serin-Racemasen, wie zum Beispiel die membrangebundene Serin-Racemase VanT aus *Enterococcus gallinarum*, gefunden werden (Arias *et al.*, 1999). Das Gen dieser Racemase wurde ebenso wie das der eukaryotischen Serin-Racemase mSR aus *Mus musculus* (Strisovsky *et al.*, 2003) mit einer an den Kodongebrauch von *C. glutamicum* angepassten Sequenz synthetisiert (GENEART, Regensburg) und in den *E. coli*-*C. glutamicum* Shuttle-Vektor pEKEx2 kloniert. Die Expression war somit unter der Kontrolle des P_{tac}-Promotors möglich. Allerdings zeigte sich für beide Racemasen weder Aktivität im Rohextrakt, noch konnten die Proteine in *C. glutamicum* mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Da für die nicht-adaptierte Variante von mSR bereits eine erfolgreiche Expression in *E. coli* MC1061 gezeigt werden konnte (Strisovsky *et al.*, 2005), wurde diese Variante des Gens in den *E. coli*-Expressionsvektor pET22b(+) kloniert. Allerdings konnte in keinem der getesteten *E. coli* Stämme (C41(DE3), BL21(DE3), BLR(DE3)) eine Expression mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

3.2.2.1 Lokalisation von ArgR und SP-ArgR in *C. glutamicum*

Da die Expression der spezifischen Serin-Racemasen nicht erfolgreich war, wurde im Folgenden die Racemase ArgR aus *Pseudomonas taetrolens* genauer untersucht. Diese Racemase gehört zur Gruppe der Racemasen mit einem großen Substratspektrum und ist aufgrund einer N-terminalen Signalsequenz sowohl in *P. taetrolens* als auch in *E. coli* periplasmatisch lokalisiert (Matsui *et al.*, 2009). Da für die Produktion von D-Aminosäuren eine cytoplasmatisch-lokalisierte Racemase gesucht wurde und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Signalsequenz zu Problemen in der Expression führt, wurde das Gen der Racemase sowohl mit N-terminaler Signalsequenz (*SP-argR*) als auch ohne die ersten 23 Aminosäuren und damit ohne Signalsequenz (*argR*) in den Vektor pEKEx3 kloniert und in *C. glutamicum* ATCC13032 exprimiert. Im Folgenden gilt die Bezeichnung „ArgR“ immer für die N-terminal verkürzte Variante und „SP-ArgR“ für die Volllängen-Variante des Proteins. Zur Bestimmung der Lokalisation wurden die Stämme in CGIII-Medium angezogen und die Genexpression mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach 24 Stunden Kultivierung wurden Proben genommen und die Proteine aus dem Zellpellet (Rohextrakt, RE) und aus dem Kulturüberstand (Ü) aufgearbeitet.

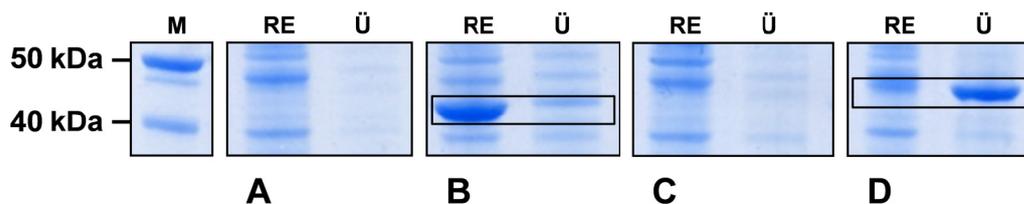


Abbildung 3.4: Lokalisation von Arg, SP-ArgR und TorA-ArgR in *C. glutamicum*. Dargestellt ist ein mittels Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel. Aufgetragen wurden Rohextraktfraktionen (RE) und aus dem Kulturüberstand ausgefällte Proteine (Ü) nach 24 h Kultivierung. M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), A: Leerplasmidkontrolle, pEKEx2, B: pEKEx3-*argR*, C: pEKEx3-*SP-argR*, D: pEKEx2-*TorA-argR*.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen, zeigte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine starke spezifische Bande von etwa 42 kDa im Rohextrakt von *C. glutamicum*-pEKEx3-*argR* (Abbildung 3.4, B). Die Analyse der aus dieser Proteinbande gewonnenen Peptidspektren mittels MALDI-TOF-MS ergab eine Abdeckung der Sequenz des reifen ArgR von 24 %, wobei die Sequenz von einer der 8 experimentell bestimmten Peptidmassen beispielhaft mittels MS-MS bestätigt werden konnte. Auch im Überstand zeigte sich eine schwache Bande in der gleichen Größe, die laut MALDI-TOF-MS-Analyse ebenso als reifes ArgR-Protein identifiziert wurde (Abdeckung der Sequenz 17 %, 6 Peptide gemessen, davon eins per MS-MS bestätigt). Da die Proben allerdings erst nach 24 Stunden Wachstum in der stationären Phase genommen wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hier eher um durch Zellyse freigesetztes, als um aktiv exportiertes Protein handelt. Wie zu erwarten ist die N-terminal verkürzte Variante damit in *C. glutamicum* cytoplasmatisch lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnte für *C. glutamicum*-pEKEx3-*SP-argR* weder im Rohextrakt noch im Kulturüberstand eine

spezifische Bande in der Größe der Volllängenvariante (44 kDa) oder der verkürzten „reifen“ Variante (42 kDa) identifiziert werden (Abbildung 3.4, C).

Die Tatsache, dass das SP-ArgR-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, könnte auf Fehler in der Transkription, Translation, Translokation oder auch der Proteinstabilität hindeuten. Ein entscheidender Faktor könnte auch der Cofaktor der Racemase, das Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) spielen. Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, ist der Export von SP-ArgR in *E. coli* Sec-abhängig (Matsui *et al.*, 2009). Für Cofaktor-abhängige Enzyme ist das ungewöhnlich, da das Protein ungefaltet exportiert wird und der Einbau von PLP so erst post-translokational im Periplasma erfolgen kann. Mechanismen zum Export des Cofaktors PLP ins Periplasma sind bislang aber nicht bekannt. Sollte PLP im Periplasma von *C. glutamicum* nicht vorhanden sein, so könnte dies dazu führen, dass das ArgR-Protein nach dem Export nicht oder falsch faltet und schnell abgebaut wird. Um diese These zu überprüfen wurde das native Signalpeptid gegen das Signalpeptid der Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO)-Reduktase TorA aus *E. coli*, das einen strikt Tat-abhängigen Export ermöglicht (Blaudeck *et al.*, 2001), ausgetauscht. Wie in Abbildung 3.4 (D) zu sehen, zeigte sich für die Expression von *TorA-argR* eine spezifische Bande von etwa 43 kDa im Überstand der *C. glutamicum*-Kultur. Auch das Protein dieser Bande konnte mit einer Abdeckung der Proteinsequenz von 26 % mittels MALDI-TOF-MS als reifes ArgR identifiziert werden. Da die reife Variante des Proteins in diesem Fall zusammen mit 8 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins und einer 3 Aminosäure-langen „linker“-Sequenz exprimiert wurde, entsprechen 43 kDa auch der erwarteten Größe. Im Gegensatz zum Kulturüberstand konnten im Rohextrakt von *C. glutamicum*-pEKEx2-*TorA-argR* zwei schwache Banden nachgewiesen werden, die in etwa einem Protein mit einem Molekulargewicht von etwas über beziehungsweise etwas unter 45 kDa entsprachen (in Abbildung 3.4 nur als eine gemeinsame Bande zu sehen). Während die größere Variante eventuell die unprozessierte Volllängenvariante von TorA-ArgR darstellt, die einem Molekulargewicht von etwa 47 kDa entspricht, könnte die kleinere Bande einem cytosolischen Abbauprodukt von TorA-ArgR entsprechend. Mit einer Sequenzabdeckung von 9 % und 3 übereinstimmenden Peptidmassen, von denen eine beispielhaft mittels MS-MS bestätigt werden konnte, konnte im Rohextrakt von *C. glutamicum*-pEKEx2-*TorA-argR* bislang aber nur die Signalpeptid-freie Variante von ArgR sicher mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. ArgR kann demnach nur bei einem Tat-abhängigen Export, aber nicht bei einem Sec-abhängigen Export, im Periplasma von *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Dies könnte auf den Einbau des Cofaktors PLP zurückzuführen sein, der eventuell nur im Cytoplasma, aber nicht im Periplasma von *C. glutamicum* vorliegt.

3.2.2.2 Charakterisierung von ArgR *in vitro* und *in vivo*

Wie zuvor erwähnt, lag ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Bildung von D-Serin mit *C. glutamicum*. Allerdings war bislang nicht bekannt, ob die Racemase ArgR aus *P. taetrolens* auch mit Serin aktiv ist. Um die *in vitro*-Aktivität der Racemase mit Serin und weiteren Aminosäuren zu kontrollieren, wurde das Gen daher ohne die N-terminale Signalsequenz in den *E. coli*-Expressionsvektor pET22b(+) kloniert, in *E. coli* C41(DE3) exprimiert und aufgrund des C-terminalen 6x His-Tag mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt.

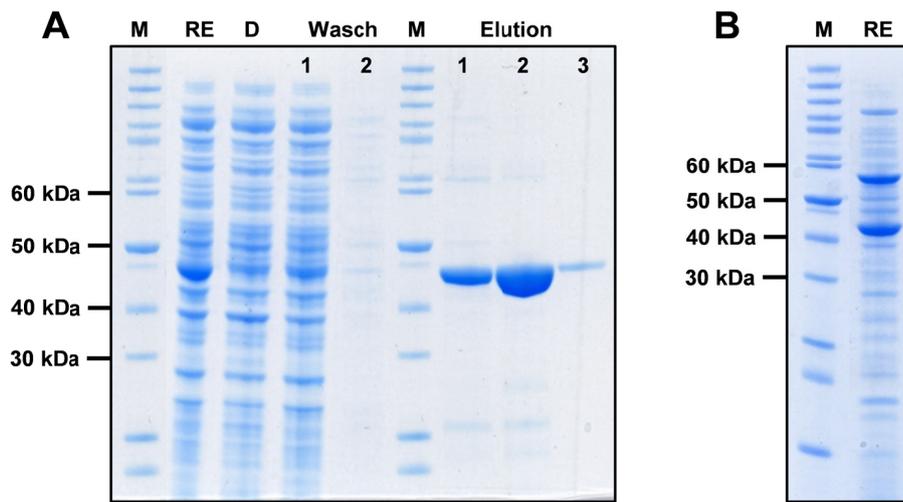


Abbildung 3.5: Produktion und Reinigung von ArgR in *E. coli* C41(DE3) (A) und *C. glutamicum* ATCC13032 (B). Dargestellt sind mittels Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele. M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), RE: Rohextrakt, D: Durchlauf, Wasch: Waschfraktionen, Elution: Elutionsfraktionen.

Wie in Abbildung 3.5 (A) zu sehen ist, konnte ein etwa 43 kDa großes Protein aus dem Rohextrakt gereinigt werden, was der Größe von ArgR mit dem C-terminalen 6x His-Tag entspricht. Zur Messung der *in vitro*-Racemaseaktivität wurde dieses in 10 mM CAPS (pH 10) umgepuffert, 50 mM Substrat und 2,5 mM PLP zugegeben und bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und mittels HPLC analysiert. Auf diese Weise konnte sowohl die schon zuvor beschriebene Aktivität mit L-Lysin, L-Ornithin und L-Arginin (Matsui *et al.*, 2009), als auch eine bislang noch nicht beschriebene Aktivität mit L-Serin mit dem gereinigtem Protein nachgewiesen werden (Tabelle 3.3). Dabei zeigte das Protein mit etwa $1260 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ die Hauptaktivität mit L-Lysin, gefolgt von L-Ornithin und L-Arginin mit etwa 1135 und $879 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Auch mit L-Serin konnte unter diesen Bedingungen eine Aktivität nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen Substraten war diese mit etwa $34 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ relativ gering.

Tabelle 3.3: *In vitro*- und *in vivo*-Aktivitäten von ArgR. Dargestellt ist die spezifische Aktivität der Racemase bei 37 °C und pH 10 mit verschiedenen Substraten. Für die *in vitro*-Aktivität wurde die Racemase aus *E. coli* C41(DE3) mit C-terminalem 6x His-Tag gereinigt. Für die *in vivo*-Aktivität wurde der Rohextrakt von *C. glutamicum*-pEKEx3-*argR* benutzt. Alle Experimente wurden mindestens 3x durchgeführt. Es sind Mittelwerte dargestellt. In der letzten Spalte sind Literaturdaten mit isoliertem Enzym angegeben (Matsui *et al.*, 2009). *n.g.*: nicht gemessen.

Substrat	<i>in vitro</i> -Aktivität		<i>in vivo</i> -Aktivität		Literatur
	spez. Aktivität [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	Aktivität [%]	spez. Aktivität [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	Aktivität [%]	Aktivität [%]
L-Lysin	1260 \pm 22	100	119 \pm 10	100	100
L-Ornithin	1135 \pm 20	90	96 \pm 7	81	42
L-Arginin	879 \pm 47	70	86 \pm 2	72	95
L-Serin	34 \pm 2	3	3 \pm 1	2	<i>n.g.</i>

Für die Konstruktion eines D-Serin- oder D-Aminosäure-produzierenden Stammes musste im Folgenden auch die *in vivo*-Aktivität der Racemase in *C. glutamicum* geprüft werden. Dazu wurde das Gen der N-terminal verkürzten Variante im Vektor pEKEx3 unter der Kontrolle des P_{tac} -Promotors in *C. glutamicum* ATCC13032 exprimiert (Abbildung 3.5 (B)), die Zellen aufgeschlossen und der Rohextrakt in 10 mM CAPS (pH 10) umgepuffert. Die Messung der *in vivo*-Aktivität erfolgte dann unter den gleichen Bedingungen, wie schon für die Messung der *in vitro*-Aktivität beschrieben. Wie in Tabelle 3.3 zu sehen, zeigte die Racemase auch in *C. glutamicum* Aktivität. Da die Berechnung der spezifischen Aktivitäten auf der Grundlage der Gesamtprotein-Konzentration und nicht auf der Konzentration von gereinigtem Protein beruhte, sind die Werte allerdings niedriger als die für die *in vitro*-Aktivität gemessenen. Die Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten deuten dabei darauf hin, dass etwa 10 % des Gesamtproteins in *C. glutamicum*-pEKEx3-*argR* aus ArgR-Protein bestand, was im Hinblick auf die Konzentrationen, die über das SDS-Polyacrylamid-Gel abgeschätzt werden können (Abbildung 3.5 (B)), plausibel erscheint. Die prozentualen Verhältnisse der Aktivitäten mit den verschiedenen Substraten untereinander waren zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Aktivität immer vergleichbar. ArgR ist damit eine geeignete Racemase zur Bildung von D-Serin und anderen D-Aminosäuren mit *C. glutamicum*.

3.2.3 Bildung von D-Serin mit *C. glutamicum* Ser4-*argR*

Als Ausgangsstamm zur Bildung von D-Serin wurde der L-Serin-Produktionsstamm *C. glutamicum* Ser4 genutzt. Dieser akkumuliert durch Deletion des für die L-Serin-Dehydratase kodierenden Gens *sdaA* und durch Deletion der für die Enzyme der Folsäure-Synthese kodierenden Gene *pabABC*, sowie gleichzeitiger Überexpression der Gene *serACB*, die für die Enzyme der L-Serin-Biosynthese kodieren, bis zu 80 mM L-Serin im Kulturüberstand (Stolz *et al.*, 2007).

3.2.3.1 Bildung von D-Serin

Für die Produktion von D-Serin wurde der L-Serin-Produktionsstamm *C. glutamicum* Ser4 mit dem Plasmid pEKEx3-*argR* transformiert. Der daraus resultierende Stamm Ser4-pEKEx3-*argR* wurde zunächst etwa 10 Stunden in CGIII-Vollmedium vorgezogen und dann in CGXII-Glukose-Medium überimpft. Nach Kultivierung für etwa 12 Stunden wurde hieraus die Hauptkultur in CGXII-Glukose-Medium inokuliert. Wie bereits in den Arbeiten von Michael Stolz gezeigt werden konnte, führt die Supplementation des Folsäure-auxotrophen Stammes Ser4 mit unterschiedlichen Konzentrationen an Folsäure zu unterschiedlichen Aktivitäten der Serin-Hydroxy-Methyltransferase SHMT, was einen direkten Einfluss auf die L-Serin-Ausbeuten hat (Stolz *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde die Hauptkultur des neuen Stammes Ser4-pEKEx3-*argR* sowohl ohne Folsäure als auch mit 0,5 mM Folsäure angezogen und das Wachstum sowie die Produktion der beiden Enantiomere mittels HPLC bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines dieser Versuche.

Wie zu erwarten, zeigte sowohl der Ausgangsstamm Ser4 als auch der Kontrollstamm mit dem Leerplasmid Ser4-pEKEx3 keine Akkumulation von D-Serin im Kulturüberstand (Abbildung 3.6, A-D). L-Serin hingegen konnte nach 120 Stunden Fermentation in Konzentrationen von 81 bzw. 26 mM für Ser4 (ohne bzw. mit Folsäure, A+B) und 50 bzw. 71 mM für Ser4-pEKEx3 (ohne bzw. mit Folsäure, C+D) detektiert werden. Das Wachstum der beiden Stämme war ohne Folsäure zwar langsamer, am Ende der Fermentation wurden aber ähnliche optische Dichten erreicht. Auch ist erkennbar, dass die Anwesenheit des Leervektors, obwohl kein Spectinomycin zugegeben wurde, das Wachstum der Zellen verzögerte.

Im Gegensatz dazu konnte im Überstand der Ser4-pEKEx3-*argR*-Kulturen stets L- und D-Serin detektiert werden (Abbildung 3.6, E+F). Überraschenderweise zeigten sich dabei unterschiedliche Verhältnisse der beiden Enantiomere im Kulturüberstand, wobei das D-Enantiomer sogar im Überschuss vorlag. Dies konnte in allen drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Ohne Supplementation mit Folsäure entstand etwa doppelt so viel D-Serin wie L-Serin (Abbildung 3.6, E). Nach 120 Stunden lag die D-Serin-Konzentration bei 81 mM und die von L-Serin bei 37 mM. Mit Folsäure-Supplementation waren die Unterschiede etwas geringer (51 mM D-Serin bzw. 41 mM L-Serin nach 120 Stunden (Abbildung 3.6, F)). Im Vergleich mit dem Ausgangsstamm Ser4, für den Serinausbeuten von etwa 80 mM beschrieben sind (Stolz *et al.*, 2007), erhöhte sich mit diesem Stamm die Gesamt-Serinausbeute um 15 bis knapp 50 % auf 92 bis 118 mM Serin. Das Wachstum des Stammes war ohne Folsäure-Supplementation außerdem deutlich langsamer. Im Gegensatz zu allen anderen Kulturen konnten am Ende der Fermentation bei 600 nm nur optische Dichten im Bereich von 10 gemessen werden.

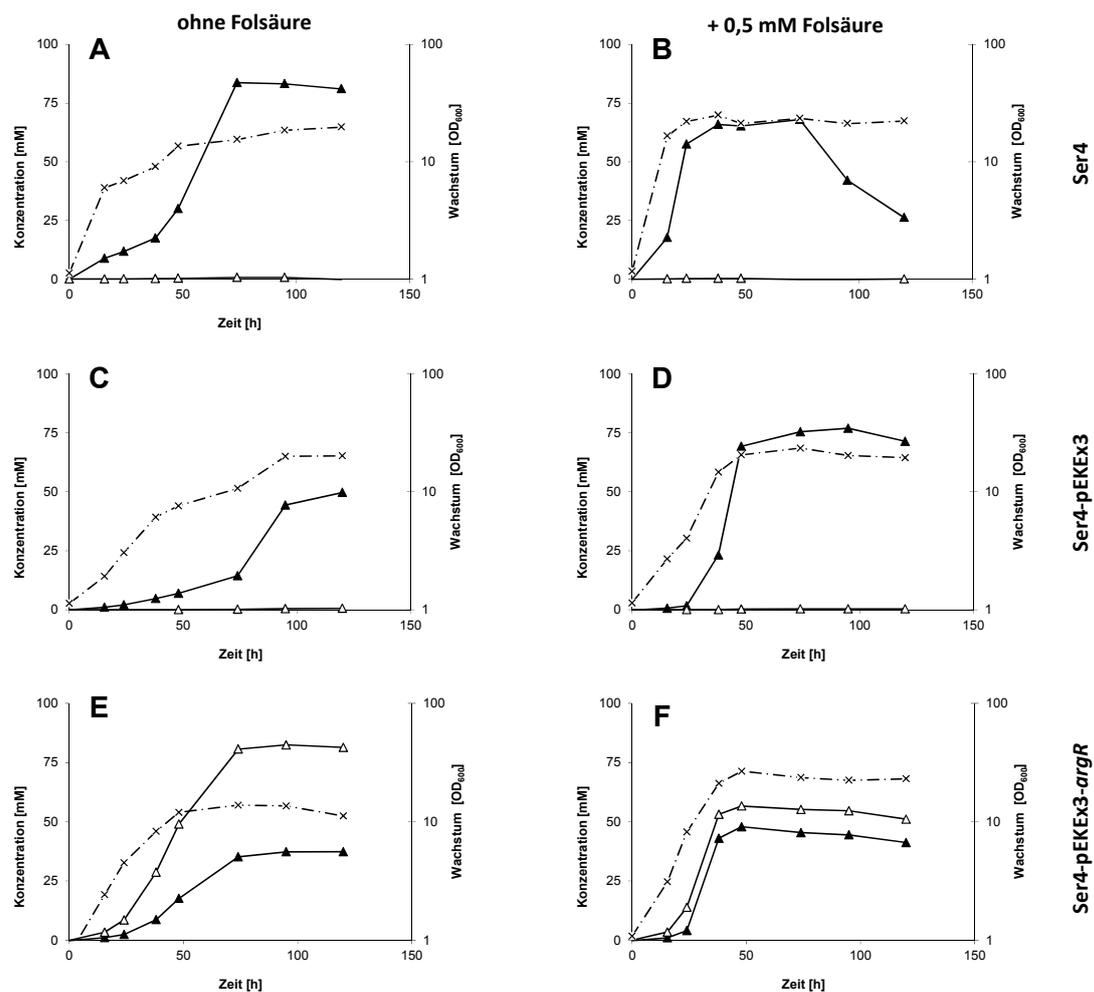


Abbildung 3.6: Bildung von D- und L-Serin mit *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-argR. Dargestellt sind das Wachstum in CGXII-Glukose-Medium und die Konzentrationen an D- und L-Serin im Kulturüberstand über die Zeit. A, C, E: Kulturen ohne Folsäure, B, D, F: Kulturen mit 0,5 mM Folsäure, A+B: *C. glutamicum* Ser4, C+D: *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3, E+F: *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-argR. L-Serin (▲); D-Serin (△); Wachstum (×).

Wie bereits erwähnt, waren sowohl die D-Serinbildung als auch das Wachstum in den insgesamt drei voneinander unabhängigen Experimenten vergleichbar. Interessanterweise ist die im Vergleich zu den Aktivitäten der Racemase mit anderen Aminosäuren relativ geringe Aktivität mit L-Serin (Tabelle 3.3) also für eine vollständige Racemisierung von intern gebildetem L-Serin vollkommen ausreichend.

3.2.3.2 Bestimmung der Exportraten von L- und D-Serin

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte nach Expression des Gens der Racemase ArgR in einem L-Serin-Produktionsstamm ein Überschuss an D-Serin im Kulturüberstand festgestellt werden. Da die Racemasereaktion eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, ist ein solches Ergebnis allerdings sehr verwunderlich. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass intern entweder ein Gleichgewicht zwischen den beiden Enantiomeren besteht oder aber

bei zu geringer Racemaseaktivität das L-Enantiomer im Überschuss vorliegt. Um die internen Konzentrationen zu bestimmen, wurde der Stamm *C. glutamicum* Ser4-pEKEEx3-*argR* daher erneut, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, angezogen. Zu Beginn der Akkumulation der Enantiomere im Medium, etwa nach 15 Stunden Fermentation (Abbildung 3.6, E), wurde ein Teil der Zellen in frisches CGXII-Glukose-Medium ohne Folsäure überimpft und in regelmäßigen Abständen die interne Konzentration an Serin mittels Silikonölzentrifugation und anschließender HPLC bestimmt. Es zeigte sich, dass über den gesamten Zeitraum immer ein Gleichgewicht zwischen den beiden Enantiomeren intern vorlag (Abbildung 3.7). Die interne Konzentration an Serin stieg dabei von anfänglich 150 mM auf etwa 250 mM nach 4 Stunden Fermentation an.

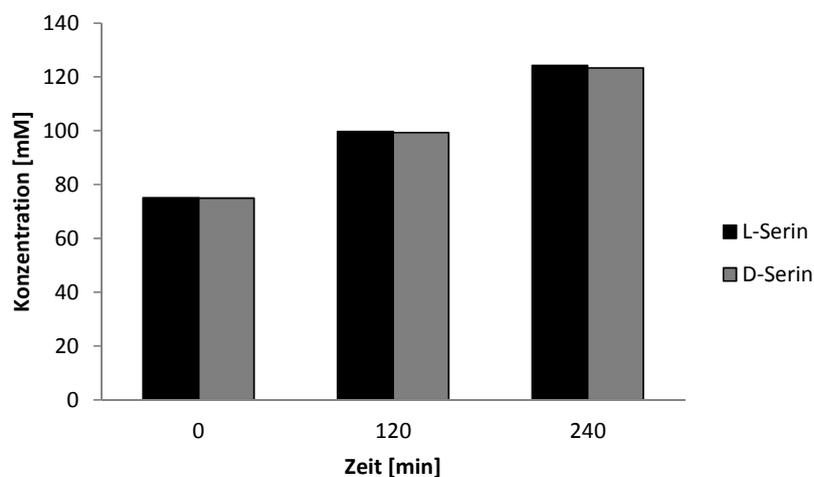


Abbildung 3.7: Interne Konzentrationen an L- und D-Serin in *C. glutamicum* Ser4-pEKEEx3-*argR*. Dargestellt sind die mittels HPLC ermittelten internen Konzentrationen an L- und D-Serin. Der Stamm wurde dabei ohne Folsäure-Supplementation in CGXII-Glukose-Medium kultiviert.

Zusätzlich zu den internen Konzentrationen wurden auch die Konzentrationen im Kulturüberstand über die Zeit gemessen, um Exportraten für L- und D-Serin zu bestimmen. Die Anzucht von *C. glutamicum* Ser4-pEKEEx3-*argR* erfolgte wie schon für die Bestimmung der Serin-Produktion und die Bestimmung der internen Konzentrationen beschrieben. Nach Kultivierung in CGIII-Komplexmedium und CGXII-Glukose-Minimalmedium wurde dabei die Hauptkultur in CGXII-Glukose-Minimalmedium inokuliert und für 15 Stunden kultiviert. Aus dieser Kultur wurden dann so viele Zellen ohne einen Waschschrift in frisches CGXII-Glukose-Medium überführt, dass eine Start- OD_{600} von 1 erreicht wurde. Über den Versuchszeitraum von 4 Stunden fand dabei nur ein leichtes Wachstum auf eine OD_{600} von 1,2 bis 1,3 statt. Wie in Abbildung 3.8 zu sehen, stiegen die Konzentrationen der beiden Enantiomere im Kulturüberstand über einen Zeitraum von 4 Stunden kontinuierlich, aber für D-Serin deutlich schneller an. Aus 5 Versuchen konnte für L-Serin eine mittlere Exportrate von $6,69 \pm 0,51 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ und für D-Serin eine von $16,20 \pm 1,19 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ berechnet werden.

Damit wird D-Serin unter diesen Bedingungen etwa 2,5-fach schneller aus der Zelle exportiert als L-Serin.

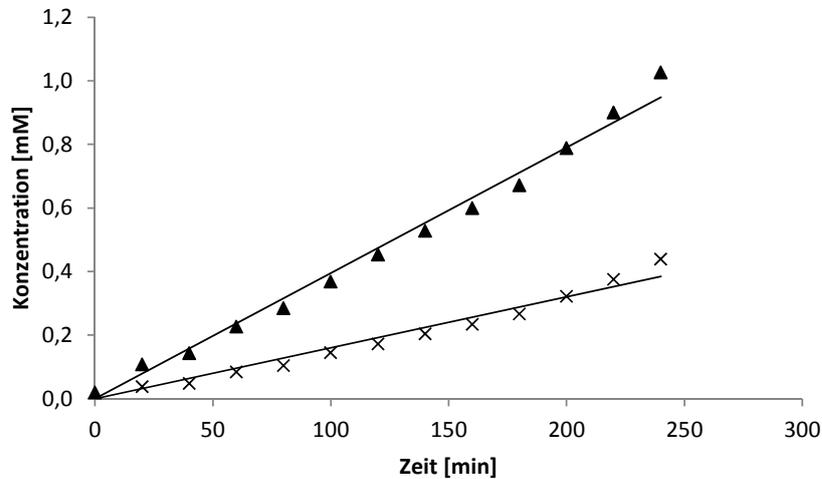


Abbildung 3.8: Konzentrationen von L- (×) und D-Serin (▲) im Überstand einer *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-argR-Kultur zur Bestimmung der Exportraten. Der Stamm wurde dabei ohne Folsäure in CGXII-Glukose-Medium mit einer Start-OD₆₀₀ von 1 wie zur Bestimmung der internen Konzentrationen kultiviert.

Die Unterschiede in den Konzentrationen von L- und D-Serin im Kulturüberstand sind demnach auf einen unterschiedlichen Export der beiden Enantiomere und nicht etwa auf eine Wiederaufnahme und Verstoffwechslung von ausgeschiedenem L-Serin zurückzuführen. Für die Produktion von D-Serin mit *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-argR scheint demnach der Export der entscheidende Schritt zu sein. Erstaunlicherweise zeigen sich unterschiedliche Exportraten, die eventuell auch auf die Nutzung unterschiedlicher Exportsysteme hindeuten. Bisher konnte schon gezeigt werden, dass der Exporter ThrE neben L-Threonin auch L-Serin exportiert. Im Peptidsystem konnten mit dem Wildtyp dabei Exportraten für L-Threonin von $2,7 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ und für L-Serin von $1,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ gemessen werden (Simic *et al.*, 2001). Im Produktionsstamm sind die Exportraten damit mit 6,7 bis $16,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ deutlich höher. Da die internen Konzentrationen mit etwa 200 mM L-Threonin beziehungsweise 180 mM L-Serin in den Arbeiten von Petra Simic etwa vergleichbar zum Stamm *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-argR waren, könnte dies auf die Nutzung eines weiteren Exportsystems hindeuten. Trotz der hohen Exportraten konnte für *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-argR intern eine relativ starke Akkumulation auf bis zu 250 mM Serin nach 4 Stunden (Abbildung 3.7) gemessen werden, was auf Limitationen im Serin-Export hinweist. Interessanterweise sind die Unterschiede in den L- und D-Serin-Konzentrationen im Kulturüberstand deutlich geringer, wenn der Stamm in CGXII-Glukose-Medium mit Folsäure kultiviert wird (Abbildung 3.6, F). Da der Stamm unter diesen Bedingungen besser wächst als ohne Folsäure könnte es sein, dass intern weniger Serin akkumuliert. Unter Umständen werden für den Export von L- und D-Serin also unterschiedliche

Exportsysteme mit unterschiedlichen Affinitäten für L- und D-Serin und eventuell auch Unterschieden auf Expressionsebene bei Wachstum mit oder ohne Folsäure genutzt.

3.2.4 Abbau von L-Serin über die Tryptophan-Synthase

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt werden konnte, ist die Produktion von D-Serin mit *C. glutamicum* möglich. Aus der racemischen Mischung muss das D-Enantiomer allerdings noch rein gewonnen werden. Klassische Separationswege, wie zum Beispiel die enantioselektive Kristallisation (Fogassy *et al.*, 2006), sind dabei aufgrund der ähnlichen Eigenschaften von L- und D-Serin nicht möglich. Zudem wäre im wirtschaftlichen Sinne die Nutzung beider Enantiomere wünschenswert. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob L-Serin mit einem *C. glutamicum*-Stamm, der die Tryptophan-Synthase (EC 4.2.1.20) überexprimiert, zusammen mit Indol in L-Tryptophan umgewandelt werden kann (Abbildung 3.9). Die beiden Aminosäuren D-Serin und L-Tryptophan können dann aufgrund ihrer physikalischen Unterschiede vergleichsweise einfach über klassische Methoden getrennt werden.

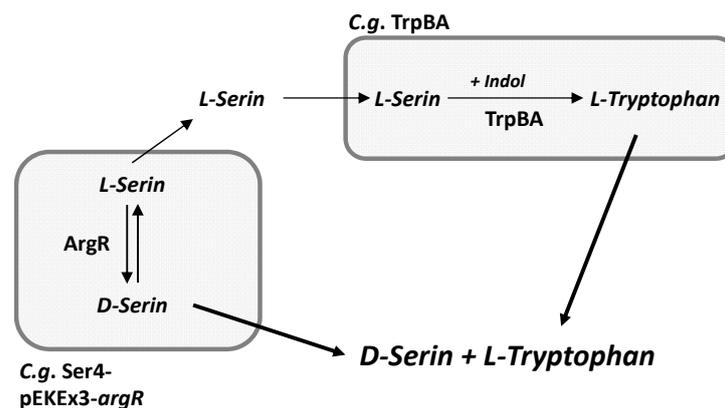


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Bildung von L-Tryptophan aus einer von *C. glutamicum* produzierten Mischung aus L- und D-Serin. ArgR: Arginin-Racemase, TrpBA: Tryptophan-Synthase.

Für die biotechnologische Produktion von L-Tryptophan aus L-Serin wird schon jetzt die Aktivität der Tryptophan-Synthase benutzt. Bislang wurde allerdings der *E. coli*-Stamm B10 für die Umsetzung eingesetzt, der zwar eine hohe Tryptophan-Synthase-Aktivität, aber auch eine starke Sensitivität gegenüber einem der Substrate der Reaktion, dem Indol zeigt (Bang *et al.*, 1983). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass L-Serin durch *E. coli* über drei hoch-spezifische und hoch-affine L-Serin-Dehydratasen stark abgebaut wird (Burman *et al.*, 2004; Shao & Newman, 1993; Su & Newman, 1991). Aus diesem Grund, und auch um in der Produktion von D-Serin ausschließlich mit *C. glutamicum* arbeiten zu können, sollte das Potential von *C. glutamicum* zur Produktion von L-Tryptophan aus L-Serin geprüft werden.

Die Tryptophan-Synthase ist ein Tetramer aus 2 α - und 2 β -Untereinheiten und katalysiert die letzten beiden Schritte der L-Tryptophan-Synthese (Leopoldseider *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, katalysieren die beiden Untereinheiten dabei zwei unterschiedliche Reaktionen, von denen die zweite Reaktion für die Produktion von L-Tryptophan aus L-Serin entscheidend ist.

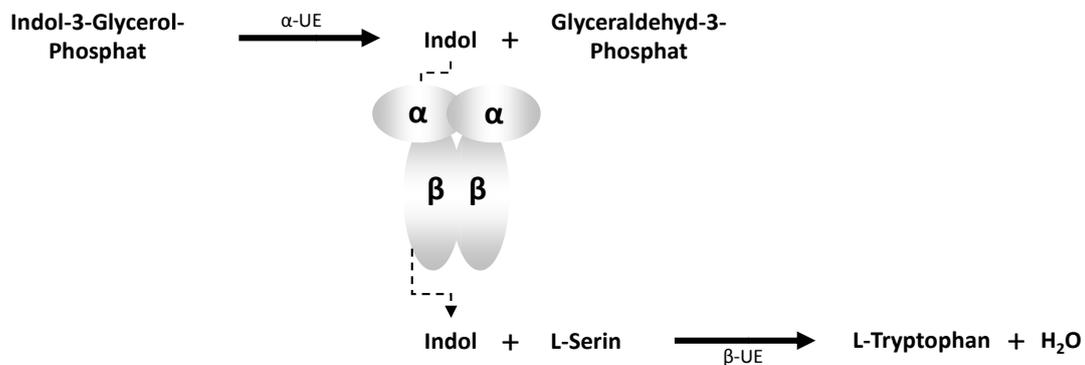


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der von der Tryptophan-Synthase katalysierten Reaktion

Die beiden Gene der Tryptophansynthase *trpB* und *trpA* sind in *C. glutamicum* in einem Operon (*trpEGDCFBA*) angeordnet, das durch Repression und Attenuation reguliert wird (Brune *et al.*, 2007; Merino *et al.*, 2008). Für die Überexpression wurde sowohl das Gen der β -Untereinheit *trpB* (NCgl2931) alleine als auch zusammen mit dem Gen der α -Untereinheit *trpA* (NCgl2932) aus dem Genom von *C. glutamicum* amplifiziert und in den *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Vektor pEKEx2 ligiert. Die Expression war damit unter der Kontrolle des P_{tac}-Promotors möglich. Die Stämme wurden in CGIII-Komplexmedium angezogen und die Expression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen, konnte sowohl die 45 kDa große β -Untereinheit als auch die 29 kDa große α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase in *C. glutamicum* ATCC13032 produziert werden. Allerdings war dazu die Induktion mit IPTG zwingend erforderlich.

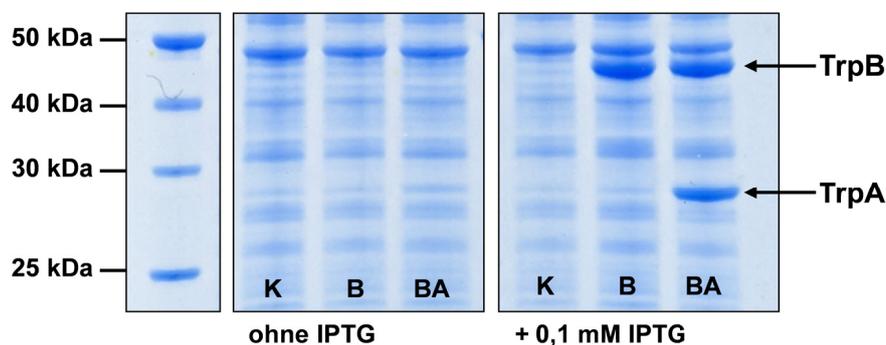


Abbildung 3.11: Expression von *trpB* und *trpA* in *C. glutamicum*. Dargestellt ist ein mittels Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel. Aufgetragen wurden Rohextraktfraktionen aus Expressionskulturen. Marker: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), K: Leerplasmidkontrolle, pEKEx2, B: pEKEx2-*trpB*, BA: pEKEx2-*trpBA*

Um zu testen, ob die neu konstruierten Stämme auch die Umwandlung von extern zugesetztem L-Serin zu L-Tryptophan katalysieren können, wurden Enzymtests mit ruhenden Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Stämme *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpB* und *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpBA* in CGIII-Komplexmedium angezogen und die Genexpression durch Zugabe von IPTG induziert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden die Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert, die Substrate L-Serin und Indol zugesetzt und bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Aminosäurekonzentration erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC. Als Referenzstamm wurde der schon in der Produktion eingesetzte *E. coli* B10-Stamm in LB-Medium angezogen und die Zellen ebenso in Phosphatpuffer mit L-Serin und Indol inkubiert.

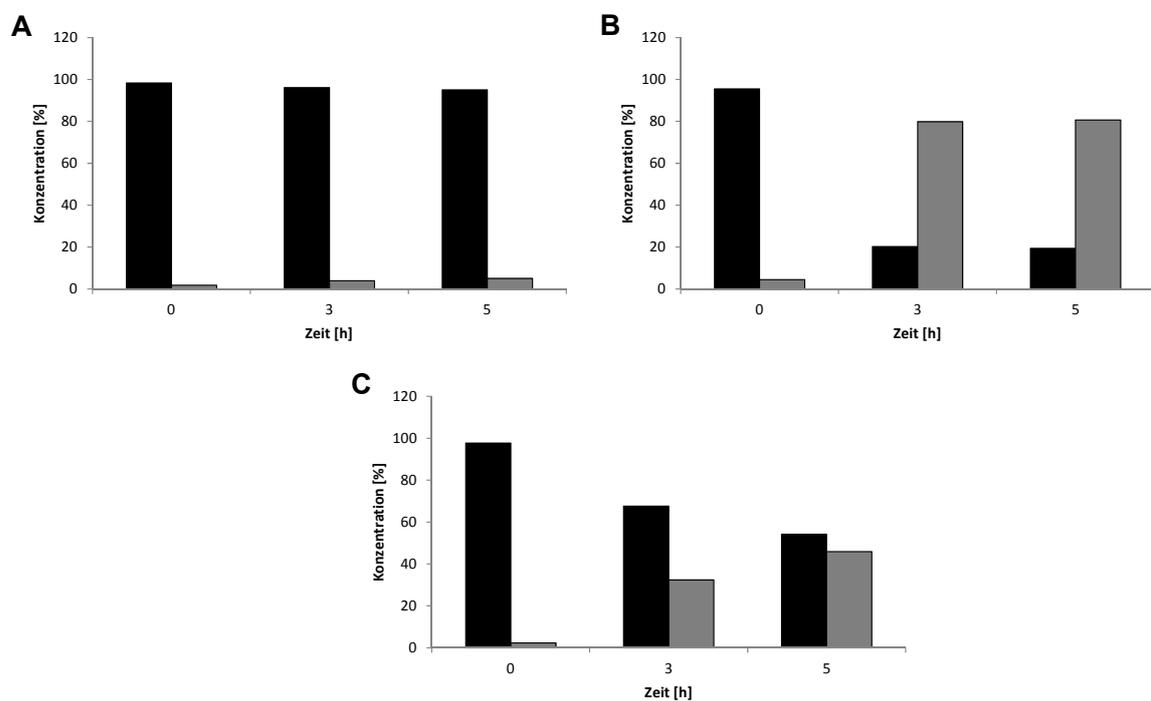


Abbildung 3.12: Produktion von L-Tryptophan (graue Balken) aus L-Serin (schwarze Balken) mit *C. glutamicum*. Dargestellt sind die prozentualen Konzentrationen an L-Serin und L-Tryptophan, wobei die Konzentration der beiden Aminosäuren zusammen zum Zeitpunkt $t=0$ auf 100 % gesetzt wurde. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mittels HPLC. A: *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpB*, B: *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpBA*, C: *E. coli* B10.

Wie in Abbildung 3.12 zu sehen, führte die Überexpression der Gene *trpB* und *trpA* zur Bildung von L-Tryptophan aus L-Serin und Indol (B). Dabei konnte schon nach 3 Stunden eine Umsetzung von etwa 80 % des eingesetzten L-Serins festgestellt werden. Die Überexpression des Gens der β -Untereinheit alleine führte hingegen kaum zu einer Umsetzung (A). Nach 5 Stunden waren hier nur etwa 5 % des L-Serins in L-Tryptophan umgesetzt. Ferner konnte auch keine Umsetzung gemessen werden, wenn eines der beiden Substrate L-Serin oder Indol fehlte oder der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war die Umsetzung unter den

verwendeten Bedingungen mit *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpBA* deutlich schneller als mit dem schon in der Produktion verwendeten Stamm *E. coli* B10. Während nach 5 Stunden Inkubation in der *E. coli*-Kultur nur etwa 46 % des L-Serins umgesetzt wurde, konnte für die *C. glutamicum*-Kultur bereits eine Umsetzung von 80 % gemessen werden.

Eine Umsetzung von L-Serin mit Indol zu L-Tryptophan ist mit dem Stamm *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpBA* demnach möglich und scheint im Gegensatz zum für die Produktion optimierten Stamm *E. coli* B10 sogar deutlich effektiver. Für die Produktion von D-Serin wäre dies somit eine attraktive Möglichkeit, um die D-Aminosäure vergleichsweise einfach zugänglich zu machen.

3.2.5 Bildung von D-Arginin, D-Lysin und D-Ornithin

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, war die Produktion von D-Serin mit einem *C. glutamicum*-Stamm, der die Racemase ArgR produziert, erfolgreich. Dies war zunächst insofern verwunderlich, als die *in vitro*-Aktivität der Racemase mit L-Serin relativ gering ist (Tabelle 3.3). Im Gegensatz dazu konnten hohen Aktivitäten mit L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin gemessen werden. Da ebenso wie für D-Serin auch für andere D-Aminosäuren Einsatzmöglichkeiten zum Beispiel im pharmazeutischen Bereich bestehen (Martinez-Rodriguez *et al.*, 2010), wurde auch die Produktion dieser D-Aminosäuren mit *C. glutamicum* getestet. Dazu wurden Produzentenstämme der entsprechenden L-Aminosäuren mit dem Plasmid pEKEx3-*argR* transformiert und die Bildung der Enantiomere verfolgt.

Als L-Lysin-Produktionsstamm wurde der Stamm *C. glutamicum* DM1933 (Blombach *et al.*, 2009) genutzt, der neben der Inaktivierung der PEP-Carboxylase und verschiedenen Punktmutationen auch eine chromosomale Verdopplung einiger L-Lysin-Biosynthese-Gene und des Gens des L-Lysin-Exporters LysE beinhaltet. Der L-Arginin-Produktionsstamm ARG2, der für die D-Arginin-Produktion genutzt wurde, leitet sich vom Stamm ARG1 ab (Schneider *et al.*, 2010). Dieser beinhaltet neben der Deletion des *argR*-Gens (NCgl1345), das für den Repressor der Arginin-Biosynthese-Gene kodiert, auch 2 Punktmutationen im Gen *argB* (NCgl1342), die zu einer Aufhebung der Endprodukt-Hemmung der Acetylglutamat-Kinase führen. Allerdings lag die mutierte Variante *argB*_{A49VM54V} im Stamm ARG1 auf dem Plasmid pEKEx3 vor. Um die Transformation mit dem Plasmid pEKEx3-*argR*, das für die Racemase kodiert, im Weiteren zu ermöglichen, wurde das Gen *argB*_{A49VM54V} aus dem Vektor pEKEx3 amplifiziert und in den Vektor pVWEx2 ligiert. Durch Transformation des Stammes *C. glutamicum* Δ *argR* mit dem Vektor pVWEx2-*argB*_{A49VM54V} entstand der L-Arginin-Produktionsstamm ARG2. Zur Produktion von L-Ornithin, das ein Intermediat der L-Arginin-Biosynthese darstellt, wurde der Stamm ORN1 genutzt (Schneider *et al.*, 2010). Dieser besitzt ebenso wie der L-Arginin-Produktionsstamm eine Deletion im Gen des Repressors ArgR. Zusätzlich ist der Abbau von L-Ornithin zu L-Citrullin durch Deletion von *argF* (NCgl1344), das für die

Ornithin-Carbamoyl-Transferase kodiert, unterbrochen und der Stamm damit arginin-auxotroph.

Die drei L-Aminosäure-Produktionsstämme wurden mit dem Plasmid pEKEx3-*argR* transformiert und in CGXII-Glukose-Medium kultiviert. Der arginin-auxotrophe Stamm ORN1 wurde dabei mit 500 μ M L-Arginin supplementiert. Es wurde das Wachstum verfolgt und die Bildung der Enantiomere zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC bestimmt. Die Anzuchten wurden jeweils dreifach ausgeführt. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines dieser Versuche.

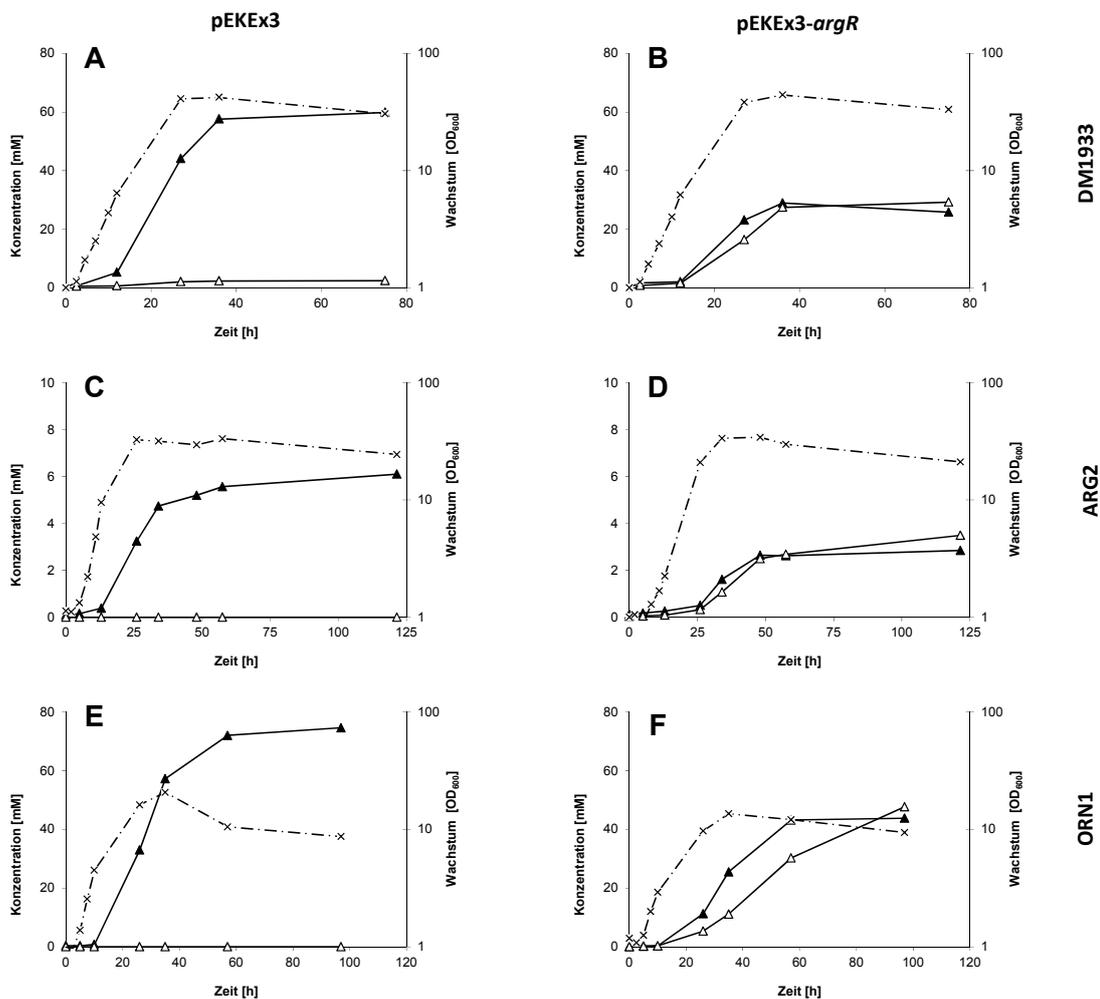


Abbildung 3.13: Bildung von D-Lysin (A+B), D-Arginin (C+D) und D-Ornithin (E+F) mit *C. glutamicum*. Dargestellt sind das Wachstum in CGXII-Glukose-Medium (×) und die Konzentrationen an D-Aminosäure (△) und L-Aminosäure (▲) im Kulturüberstand. A, C, E: Stämme mit dem Leerplasmid pEKEx3, B, D, F: Stämme mit pEKEx3-*argR*.

Bei jedem der drei Stämme führte die Anwesenheit von pEKEx3-*argR* zur Produktion eines Racemats. Anders als bei der Bildung von D-Serin wurde also immer eine etwa gleichmäßige Verteilung der Enantiomere erreicht. Für den Stamm DM1933 konnte dabei

mit der Racemase eine Akkumulation von etwa 26 mM L- und 29 mM D-Lysin im Kulturüberstand gemessen werden, für ARG2 etwa 3 mM L- und 3 mM D-Arginin und für ORN1 etwa 44 mM L- und 48 mM D-Ornithin. Die im Vergleich geringen Konzentrationen an L- und D-Arginin mit dem Stamm ARG2 beruhen auf der insgesamt geringen Akkumulation von Arginin mit diesem Stamm. Auch ohne das Vorhandensein eines Vektors konnten nur 8 mM L-Arginin mit diesem Stamm produziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist insofern verwunderlich, weil ein Stamm mit identischen Mutationen in *argB*, aber auf einem anderen Plasmid kodiert, in anderen Arbeiten schon zur Bildung von 40 bis 50 mM L-Arginin führte (Ikeda *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2010). Das Wachstum der Stämme wird durch die Expression des Gens der Racemase kaum beeinträchtigt. Einzig der Stamm ORN1, dessen Wachstum aufgrund der Arginin-Auxotrophie durch die Supplementation mit L-Arginin limitiert ist, zeigt ein leicht verzögertes Wachstum (Abbildung 3.13).

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich grundsätzlich rekombinante *C. glutamicum*-Stämme zur Produktion von D-Aminosäuren eignen. Durch das Einbringen einer Racemase mit einem weiten Substratspektrum in die geeigneten L-Aminosäure-Produktionsstämme konnten neben D-Serin auch D-Arginin, D-Lysin und D-Ornithin gebildet und in den Kulturüberstand freigesetzt werden. Mit der geeigneten Racemase und dem geeigneten L-Aminosäure-Produktionsstamm ist auf diese Weise auch die Produktion weiterer D-Aminosäuren denkbar. Auch zur Separation der Enantiomere aus dem Racemat steht für Serin mit der Umwandlung von L-Serin zu L-Tryptophan und den daraus erwachsenen Möglichkeiten zur physikalischen Trennung der beiden Aminosäuren D-Serin und L-Tryptophan bereits ein Werkzeug zur Verfügung. Überdies zeigen die Arbeiten auch, dass dem Transport der D-Aminosäure eine große Bedeutung zukommt.

3.3 Transport von D-Aminosäuren in *C. glutamicum*

3.3.1 Identifizierung von LysE als Exporter von D-Lysin

Wie gezeigt werden konnte, akkumulieren die durch *C. glutamicum* gebildeten D-Aminosäuren im Kulturüberstand. Die Tatsache, dass die Racemase cytoplasmatisch lokalisiert ist (Abbildung 3.4) und für ausgewählte Aminosäuren wie L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin oder auch L-Methionin ein aktiver Export nachgewiesen ist (Eggeling, 2009) legt auch einen aktiven Export der D-Aminosäuren nahe. Da bislang kein spezifischer D-Aminosäure-Exporter in *C. glutamicum* beschrieben ist, wurde exemplarisch der Export von D-Lysin untersucht. Die Hypothese bestand dabei darin, dass der schon beschriebene L-Lysin-Exporter LysE (Bellmann *et al.*, 2001; Vrljic *et al.*, 1996) beide Enantiomere exportieren kann. Zur Identifizierung von LysE als Exporter von D-Lysin wurde das Dipeptid-System benutzt. Einige Dipeptide werden von *C. glutamicum* effektiv

aufgenommen und intern hydrolysiert (Abbildung 3.14). Wird zum Beispiel das Dipeptid Lysin-Alanin eingesetzt, so wird dieses schnell aufgenommen und intern in die beiden Aminosäuren L-Lysin und L-Alanin gespalten (Bellmann *et al.*, 2001; Erdmann *et al.*, 1993). Während L-Alanin metabolisiert werden kann, akkumuliert L-Lysin zunächst kurzfristig intern, bis der Export über LysE erfolgt (Abbildung 3.14, B). Deletiert man den Exporter von L-Lysin LysE, so akkumuliert L-Lysin aufgrund mangelnder Exportmöglichkeiten intern bis zu hohen Konzentrationen (Abbildung 3.14, C), was phänotypisch in einer Wachstumsinhibierung sichtbar wird.

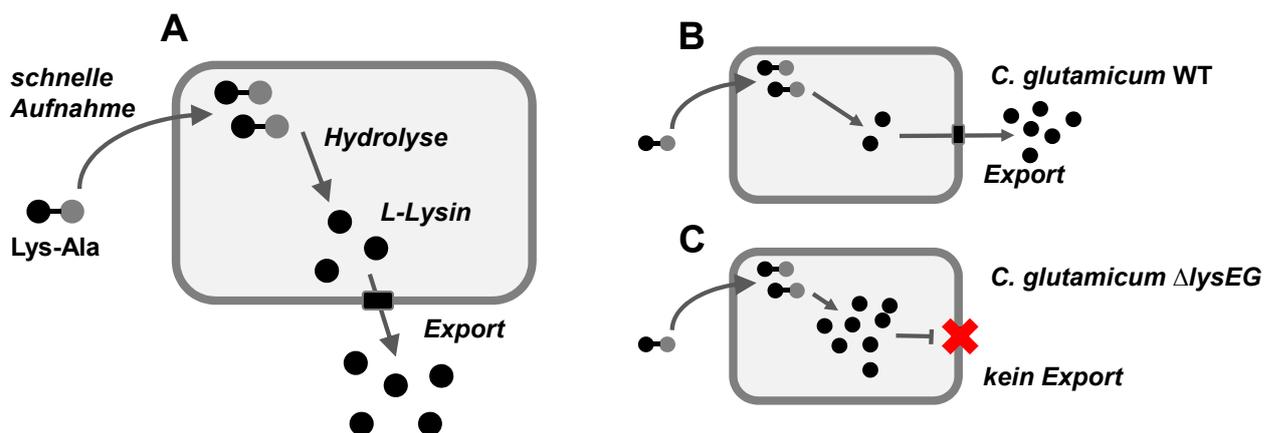


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung zur Identifizierung eines Exporters mit dem Dipeptid-System.

Um zu testen, ob auch D-Lysin über LysE exportiert wird, wurde zunächst das Dipeptid D-Lys-L-Ala (Peptide 2.0, Chantilly, USA) benutzt. Der Stamm *C. glutamicum* Δ *lysEG* wurde dazu aus CGIII-Komplexmedium in CGXII-Glukose-Minimalmedium auf eine OD_{600} von 1 überimpft und 3 oder 12 mM D-Lys-L-Ala zugesetzt. Als Kontrolle wurde der Stamm auch ohne Dipeptid und mit 3 mM L-Lys-L-Ala angezogen. Während der Stamm nach Zugabe von 3 mM L-Lys-L-Ala über einen Zeitraum von 10 Stunden kein Wachstum zeigte, wuchsen die beiden Kulturen mit 3 mM bzw. 12 mM D-Lys-L-Ala ebenso wie die Kultur ohne Dipeptid auf eine OD_{600} von 17 bis 18 an (Daten nicht gezeigt). Die Messung der internen Aminosäure-Konzentrationen zeigte weiterhin keine Akkumulation von D-Lysin nach Zugabe von D-Lys-L-Ala, was entweder auf fehlende Aufnahme oder fehlende Hydrolyse dieses spezifischen Dipeptids hindeutet. Um trotzdem weitere Erkenntnisse zu erlangen wurde der Deletionsstamm *C. glutamicum* Δ *lysEG* mit dem Vektor pEKEx3-*argR* transformiert. Die Zugabe von L-Lys-L-Ala zum Stamm Δ *lysEG*-pEKEx3-*argR* sollte zur Bildung einer racemischen Mischung von D- und L-Lysin intern führen. Ist LysE der Exporter auch von D-Lysin, so wäre phänotypisch immer noch eine Wachstumsinhibierung sichtbar, da dann die Gesamtkonzentration an Lysin vergleichbar mit dem Stamm Δ *lysEG* sein sollte. Ist LysE nicht am D-Lysin-Export beteiligt, so sollte die interne Konzentration an Lysin durch Export des D-Lysins und ständiger interner Racemisierung deutlich niedriger und der Wachstumsdefekt deutlich abgeschwächt oder nicht vorhanden sein.

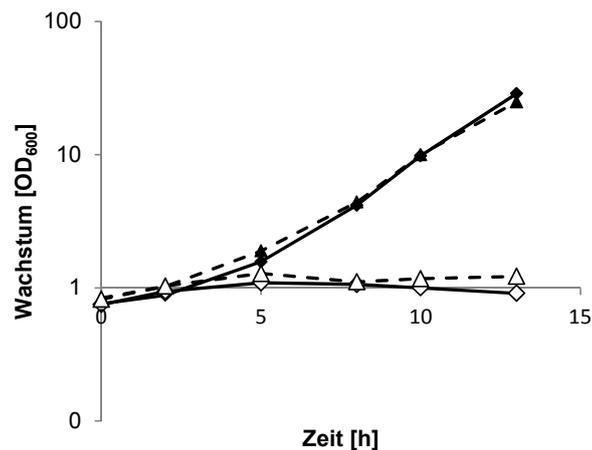


Abbildung 3.15: Wachstum von *C. glutamicum* Δ lysEG-pEKEx3-argR nach Dipeptidzugabe. Dargestellt ist das Wachstum von Δ lysEG-pEKEx3 (\blacklozenge , \diamond) und Δ lysEG-pEKEx3-argR (\blacktriangle , \triangle) in CGXII-Glukose-Medium ohne (geschlossene Symbole) und mit 3 mM L-Lys-L-Ala (offene Symbole).

C. glutamicum Δ lysEG-pEKEx3 und Δ lysEG-pEKEx3-argR wurden dazu in CGXII-Glukose-Medium mit und ohne 3 mM L-Lys-L-Ala kultiviert und das Wachstum verfolgt. Dabei konnte für beide Stämme ohne Dipeptidzugabe ein normales Wachstum festgestellt werden, während die Kulturen mit Dipeptid über einen Zeitraum von etwa 12 Stunden kaum Wachstum zeigten (Abbildung 3.15). Die Expression des Gens der Racemase ArgR hebt den Wachstumsdefekt also nicht auf, was darauf hindeutet, dass durch die Deletion von *lysE* auch der D-Lysin-Export blockiert ist. Um sicher zu gehen, dass die Racemase im Stamm Δ lysEG-pEKEx3-argR auch aktiv ist und intern ein Racemat vorliegt, wurden die Stämme unter den oben beschriebenen Bedingungen erneut kultiviert und die internen Aminosäurekonzentrationen mittels Silikonölzentrifugation bestimmt.

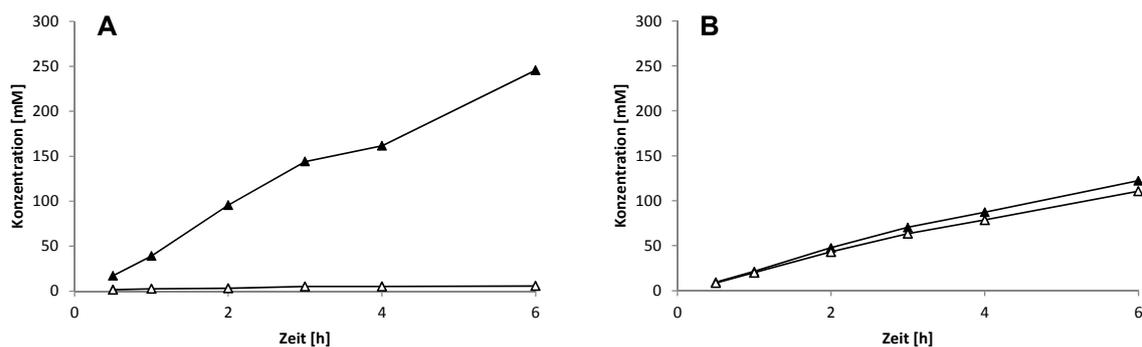


Abbildung 3.16: Interne Lysin-Konzentration nach Zugabe von 3 mM L-Lys-L-Ala. Dargestellt sind die mittels Silikonölzentrifugation und HPLC bestimmten internen Konzentrationen an L- (\blacktriangle) und D-Lysin (\triangle) in *C. glutamicum* Δ lysEG-pEKEx3 (A) und *C. glutamicum* Δ lysEG-pEKEx3-argR (B) nach Wachstum in CGXII-Glukose-Medium und 3 mM L-Lys-L-Ala.

Wie Abbildung 3.16 zeigt, konnte für den Kontrollstamm mit dem Leerplasmid (Δ lysEG-pEKEx3) erwartungsgemäß eine interne Akkumulation von L-Lysin auf etwa 246 mM nach 6 Stunden gemessen werden (A). Für den Stamm Δ lysEG-pEKEx3-argR wurde

hingegen eine Mischung aus etwa 122 mM L- und 111 mM D-Lysin intern bestimmt (B). Die Bildung des Racemats verdeutlicht also zum einen, dass die Racemase aktiv ist, zum anderen aber auch, dass neben L-Lysin auch D-Lysin bei Deletion von *lysE* nicht exportiert werden kann. Neben L-Lysin ist LysE demnach auch der Exporter für D-Lysin.

3.3.2 Heterologe Expression von *lysG*

Es ist bereits bekannt, dass die Expression von *lysE* durch den zur Familie der LysR-Transkriptionsregulatoren (LTTR) gehörenden Regulator LysG aktiviert wird (Bellmann *et al.*, 2001). Transkriptionsregulatoren dieser Familie bilden meistens Tetramere und binden konstitutiv an die DNA, was zur Inhibierung der Transkription des regulierten Gens führt (Abbildung 3.17). Erst nach Bindung eines Effektors kommt es zur Veränderung der Proteinkonformation, die die Bindung der RNA-Polymerase und somit die Transkription ermöglicht (Maddocks & Oyston, 2008). Für LysG konnten durch *in vivo*-Experimente mit ganzen Zellen bereits L-Lysin und L-Arginin, aber auch L-Histidin und L-Citrullin als Effektoren identifiziert werden, wobei nur die ersten beiden Aminosäuren auch von LysE exportiert werden (Bellmann *et al.*, 2001). Da wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auch D-Lysin von LysE exportiert wird, sollte geklärt werden, ob auch D-Lysin und eventuell auch andere D-Aminosäuren Effektoren von LysG sind.

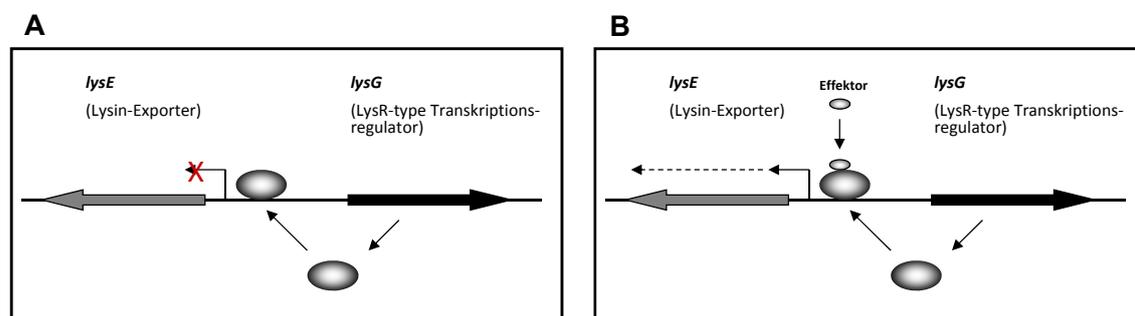


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Transkriptionsregulation durch LysG. Ohne einen Effektor bindet LysG im Promotorbereich von *lysE* und blockiert damit die Transkription (A). Ist ein Effektor vorhanden, so bindet dieser an LysG, was zu einer Konformationsänderung führt, die die Transkription von *lysE* ermöglicht (B).

Für weitere Analysen wurde *lysG* (NCg11215) aus dem Genom von *C. glutamicum* mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pET28b(+), der die Expression mit einem Thrombinspaltbaren N-terminalen 6x His-Tag erlaubt, kloniert. Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, konnte nach Expression in *E. coli* C41(DE3) und Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 34 kDa gereinigt werden. Dies entspricht dem kalkulierten Molekulargewicht von LysG mit dem 6x His-Tag und der Thrombin-Schnittstelle.

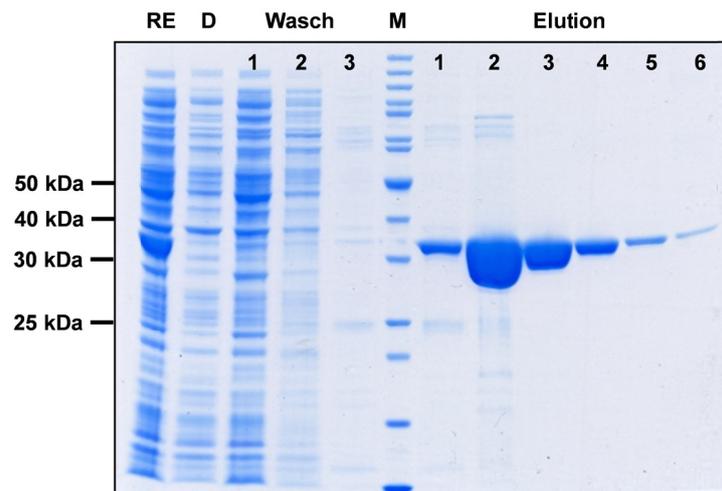


Abbildung 3.18: Bildung und Reinigung von LysG in *E. coli* C41(DE3). Dargestellt ist ein mittels Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel. M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), RE: Rohextrakt, D: Durchlauf, Wasch: Waschfraktionen, Elution: Elutionsfraktionen.

Für die weiteren Analysen, wie zum Beispiel die Gelretardationsexperimente, musste das Protein in andere Puffer überführt werden. Allerdings präzipitierte das Protein sehr schnell in dem zunächst gewählten Puffer BSN (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin). Um die spontane Oligomerisierung zu vermeiden, die auch für viele andere LTTRs beschrieben ist (Ezezik *et al.*, 2007), wurden daher zunächst systematisch Analysen zum Verhalten von LysG nach der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie in verschiedenen Puffern durchgeführt. Dazu wurden jeweils 500 µl der proteinreichsten Elutionsfraktion der Reinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie in verschiedenen Puffern analysiert und jeweils das apparente, native Molekulargewicht bestimmt. Da erste Versuche auf ein Tetramer als native Form von LysG hindeuteten, was auch die native Form der meisten beschriebenen LTTRs ist (Law *et al.*, 2009; Madhusudhan *et al.*, 1995; Muraoka *et al.*, 2003; Porrua *et al.*, 2007), wurde nach Pufferbedingungen gesucht, bei denen das apparente Molekulargewicht in etwa einem Tetramer entspricht. Schließlich wurde für die weiteren Analysen ein Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄) mit einer hohen Salzkonzentration (150 mM KCl) und einem pH, der relativ weit vom pI entfernt liegt, (pH 8,0) gewählt. Mittels Größenausschluss-Chromatographie konnte in diesem Puffer ein apparentes, natives Molekulargewicht von 158 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.19), was ungefähr dem Molekulargewicht eines Tetramers entspricht (Monomer 6x His-LysG: 34 kDa).

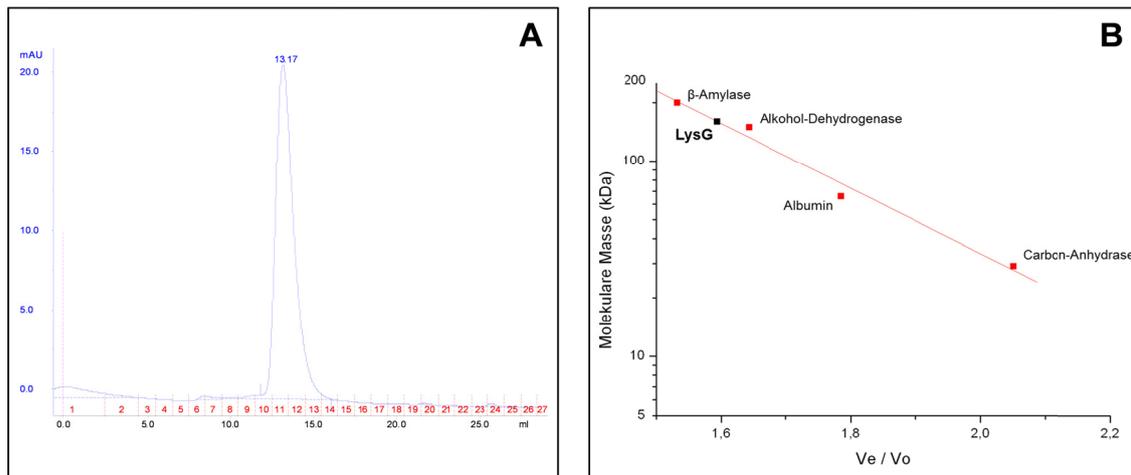


Abbildung 3.19: Größenausschluss-Chromatographie zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von LysG. Links ist das Chromatogramm einer Auftrennung von 6x His-LysG in 50 mM NaH₂PO₄ + 150 mM KCl (pH 8,0) dargestellt (A). Dabei zeigt die blaue Kurve die Absorption bei 280 nm in mAU, die gesammelten Fraktionen sind in rot dargestellt, die pinke Linie zeigt den Zeitpunkt der Injektion an. Rechts ist eine Ausgleichsgerade zur Berechnung des apparenten Molekulargewichtes des Zielproteins gezeigt (B). Dabei wurden die Molekulargewichte von vier Standardproteinen in kDa gegen das Verhältnis V_E/V_0 aufgetragen. V_E : Elutionsvolumen des Proteins (ml), V_0 : Ausschlussvolumen der Säule (8,24 ml).

Um nachzuweisen, dass die Bildung des Tetramers nicht auf das Vorhandensein des Histidin-Tags zurückzuführen ist, wurde dieser durch einen Verdau mit Thrombin abgespalten und erneut das apparente Molekulargewicht bestimmt. Mittels Größenausschluss-Chromatographie konnte dabei ein Molekulargewicht von 143 kDa und damit erneut ein Tetramer als native, lösliche Form ermittelt werden (Monomer LysG: 32 kDa) (Daten nicht gezeigt). LysG konnte demnach heterolog exprimiert und gereinigt werden. Die native lösliche Form ist ein Tetramer.

3.3.3 Eingrenzung des Bindebereiches von LysG in der Promotorregion von *lysE*

LysE und *lysG* werden, wie schon in Abbildung 3.17 gezeigt, in *C. glutamicum* divergent voneinander transkribiert. Zwischen den beiden Genen befindet sich dabei ein 60 bp-großer intergenischer Bereich, der sowohl die Promotorbereiche der beiden Gene, als vermutlich auch die Bindungsstellen von LysG enthält (Bellmann *et al.*, 2001). Für viele andere Regulatoren der LTTR-Familie konnte bereits die Bindung des Tetramers an zwei spezifische Regionen in einem solchen intergenischen Bereich nachgewiesen werden. Dabei bindet auch in Abwesenheit des Effektors ein Dimer anscheinend mit hoher Affinität an die sogenannte RBS-Sequenz („recognition binding site“), während die Bindung des andere Dimer an die sogenannte ABS-Sequenz („activation binding site“) zunächst mit geringerer Affinität erfolgt und erst bei Bindung eines Effektors verstärkt wird (Monferrer *et al.*, 2010; Porrua *et al.*, 2007). RBS-Sequenzen befinden sich meist weiter stromaufwärts vom Transkriptionsstart des regulierten Gens entfernt als die ABS-Sequenzen und dienen auch der Autoregulation des Regulators selbst (Schell, 1993). Auch im intergenischen

Bereich von *lysE* und *lysG* konnten Sequenzen lokalisiert werden, die putative Bindestellen für LysG darstellen. Stromaufwärts von *lysE* konnte im Bereich von -63 bis -75 dabei eine Region, die eine imperfekte Dyade mit der Konsensussequenz T-N₁₁-A bildet (Schell, 1993), als putative RBS-Sequenz identifiziert werden (genaue Sequenz: TGAA-N₅-TTCA). Näher am Transkriptionsstart, im Bereich von -16 bis -25, konnte ein perfektes Palindrom mit der Sequenz TACTT-AAGTA gefunden werden, das eventuell als ABS-Sequenz dient (Abbildung 3.20).

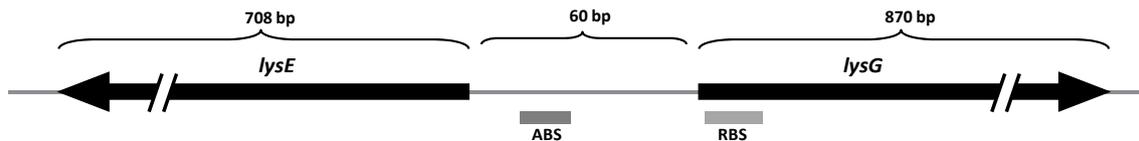


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der genomischen Organisation von *lysE* und *lysG*. Dargestellt ist neben der genomischen Organisation der beiden Gene auch die ungefähre Position der beiden putativen Bindebereiche ABS („activation binding site“) und RBS („recognition binding site“).

Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass ein 455 bp-großes Fragment, das neben der intergenischen Region auch weite Bereiche der beiden Gene enthält, für die Bindung von LysG ausreichend ist (Bellmann *et al.*, 2001). Es ist aber davon auszugehen, dass dieser Bindebereich auf ein wesentlich kürzeres Fragment beschränkt werden kann. Aus diesem Grund wurden Gelretardationsexperimente mit heterolog-exprimiertem und mittels Ni²⁺-NTA- und Grössenausschluss-Chromatographie gereinigtem LysG und verschiedenen DNA-Fragmenten des intergenischen Bereiches von *lysE-lysG* durchgeführt. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen, unterschieden sich diese Fragmente sowohl in der Gesamtlänge, also auch in der Lage bezüglich der beiden putativen Bindebereiche RBS und ABS. Für die Gelretardationsexperimente wurden 100 ng DNA mit den jeweiligen Überschüssen an LysG im Standardpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM KCl (pH 8,0)) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, der Ansatz auf ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Elektrophorese für 1,5 Stunden bei 140 V in 1x TBE durchgeführt. Die anschließende Färbung der DNA mit Ehtidumbromid zeigte, dass sowohl mit dem 340 bp-großem Fragment *lysGE 1*, als auch mit dem nur 88 bp-großem Fragment *lysGE 2* eine Bindung von LysG an die DNA möglich ist, die durch ein verändertes Laufverhalten sichtbar wird. Wählt man Fragmente ohne die putativen Bindebereiche ABS und RBS (*lysGE 5* und *lysGE 6*), so ist auch bei einem hohen molaren Überschuss von LysG kein verändertes Laufverhalten sichtbar. LysG bindet also nicht. Ist jeweils nur eine der beiden Sequenzen auf dem Fragment vorhanden (*lysGE 3* und *lysGE 4*), so kann zwar ein „Shift“ der DNA festgestellt werden, allerdings ist dazu mehr Protein nötig. Dabei zeigte sich, dass die Bindung an das Fragment *lysGE 4*, das nur die RBS-Sequenz enthält, schon bei geringer Proteinkonzentration stärker ausgeprägt war, als an Fragment *lysGE 3*, das nur die ABS-Sequenz enthält.

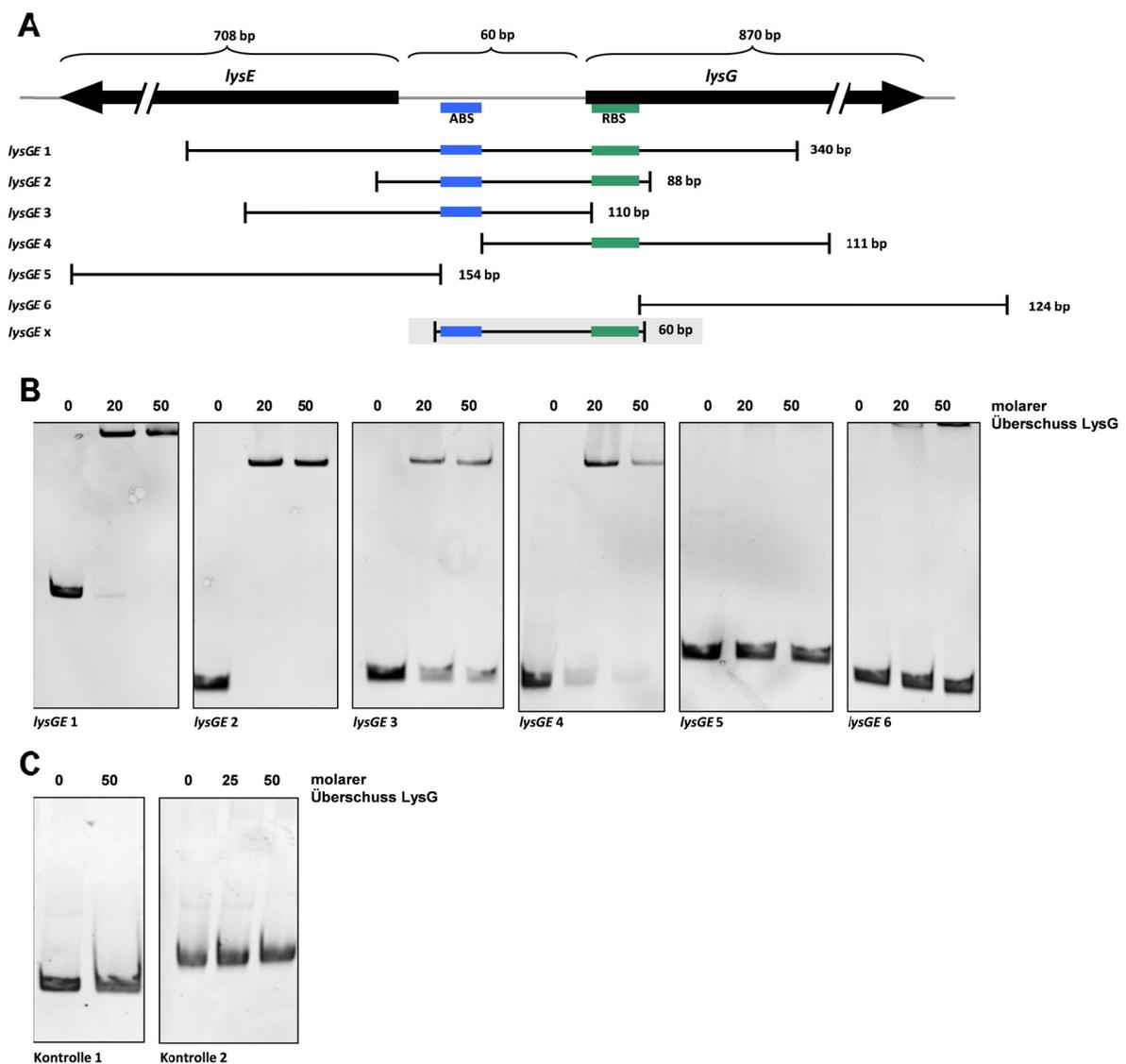


Abbildung 3.21: Gelretardationsexperimente zur Eingrenzung des Bindebereichs von LysG. Unter (A) ist schematisch die genomische Organisation von *lysE-lysG* mit den verwendeten DNA-Fragmenten und der Position der ABS- und RBS-Sequenzen dargestellt. Unter (B) sind die Gelretardationsexperimente mit den verschiedenen Fragmenten zu sehen. Unter (C) sind Kontroll-Ansätze zu sehen. Dabei zeigt Kontrolle 1, dass bei Inkubation von Fragment *lysGE 1* mit einem unspezifischem Protein (Racemase ArgR) kein „Shift“ entsteht, ebenso wie es bei Inkubation einer unspezifischen DNA (*odhI*-Fragment) mit LysG der Fall ist (Kontrolle 2). 10 % Polyacrylamid-Gel, 140 V, 1x TBA, 1,5 h.

LysG scheint also, wie auch schon für andere LTTRs beschrieben, an die RBS-Sequenz mit höherer Affinität zu binden. Prinzipiell ist eine der beiden Sequenzen zwar demnach für eine Bindung *in vitro* ausreichend, für die Beeinflussung der Transkription beider Gene *in vivo* vorraussichtlich aber nicht. Anhand der Experimente ist als minimalstes Fragment, das sowohl die Bindung als auch die Transkriptionsregulation erlaubt, ein 60 bp-großes Fragment anzusehen, das die ABS- und RBS-Sequenzen enthält und in Abbildung 3.21 *lysGE x* genannt wurde. Da die Bindung an ein solches Fragment aber nicht überprüft

wurde, kann der Bindebereich von LysG bisher nur auf den Bereich des 88 bp-großen Fragments *lysGE 2* eingegrenzt werden.

3.3.4 Untersuchungen zur Spezifität der Effektorbindung an LysG

Um zu untersuchen, ob auch D-Aminosäuren wie D-Lysin als Effektoren für LysG dienen können, mussten zunächst geeignete Methoden gefunden werden, die die Effektorbindung „sichtbar“ machen. Im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsregulatoren binden Regulatoren der LysR-Familie, wie zuvor schon beschrieben, unabhängig von der Anwesenheit eines Effektors konstitutiv an die DNA. Dabei kommt es zu einer sehr starken Biegung der DNA, die die Transkription verhindert (Abbildung 3.22, A). Wird ein Effektor gebunden, so ändert sich die Konformation der Proteine im Tetramer leicht, was zu einer Verschiebung des Bindebereichs im Bereich der ABS-Sequenz und damit zu einer Relaxation der DNA und Aktivierung der Transkription führt (Abbildung 3.22, B) (Monferrer *et al.*, 2010).

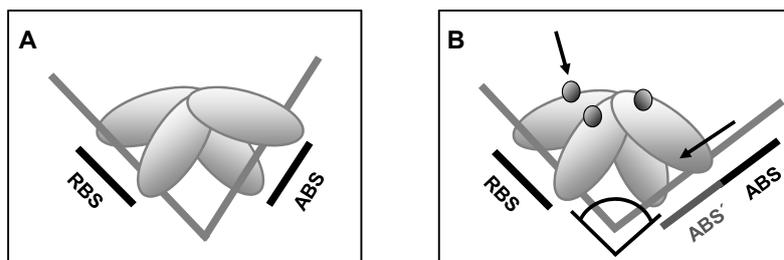


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der Transkriptionsregulation durch LysG. In Abwesenheit eines Effektors bindet das Tetramer an die RBS- und ABS-Sequenz und verursacht damit eine starke Biegung in der DNA (A). Die Bindung des Effektors führt zu Konformationsänderungen, die zu einer Verschiebung des Bindebereiches und damit einer Relaxation der DNA führen (abgeändert nach (Monferrer *et al.*, 2010)).

Die drei möglichen Auswirkungen der Effektorbindung, nämlich i) die Änderung der Proteinkonformation, ii) die Relaxation der DNA und iii) die Aktivierung der Transkription, sollten im Folgenden mittels i) Bestimmung der intrinsischen Proteinfluoreszenz, ii) Gelretardationsexperimenten und iii) Analyse der Transkription eines Reportergens untersucht werden.

3.3.4.1 Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenz in Abhängigkeit von bekannten und putativen Effektoren

Aufgrund der Fluoreszenz der drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zeigt jedes Protein eine eigene, sogenannte intrinsische Fluoreszenz. Sie lässt sich durch Anregung bei 280 bis 295 nm in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 380 nm messen. Das Emissionsspektrum und die Emissionsintensität hängen dabei von verschiedenen Faktoren ab, wovon einer die Konformation des Proteins ist. Da die Bindung des Effektors an LysG zu einer Konformationsänderung führt, ist auch von einem veränderten Emissionsspektrum nach Effektorbindung auszugehen.

Für die Analysen wurde LysG daher wie zuvor beschrieben heterolog produziert und gereinigt, mit verschiedenen Konzentrationen der Aminosäuren im Standardpuffer (50 mM NaH_2PO_4 + 150 mM KCl (pH 8,0)) mit 0,1 % Brij[®] 35 gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Testmessungen zeigten für LysG die stärkste Emission nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm. Für die Analysen wurde daher stets eine Anregung bei 280 nm durchgeführt und das Emissionsspektrum von 300 bis 380 nm bei 25 °C aufgenommen. Um herauszufinden, welchen Einfluss ein Effektor auf das Fluoreszenzspektrum von LysG hat, wurden zunächst Ansätze mit dem schon identifizierten Effektor L-Lysin gemacht. Wie Abbildung 3.23 zeigt, führten steigende Konzentrationen an L-Lysin zu einem Anstieg der maximalen Fluoreszenzintensität bei etwa 330 nm.

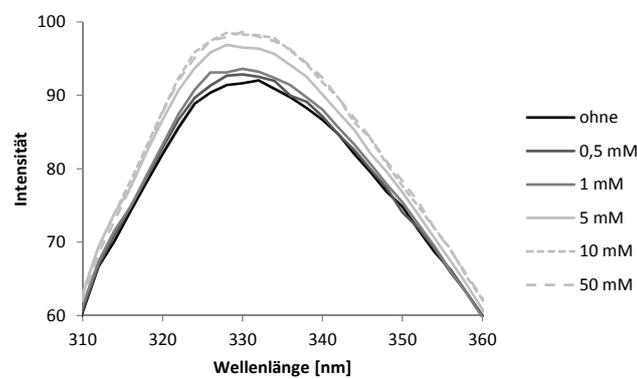


Abbildung 3.23: Emissionsspektrum von LysG mit verschiedenen Konzentrationen an L-Lysin. Pro Ansatz wurden 5 μg LysG mit den entsprechenden Konzentrationen an L-Lysin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Fluoreszenzspektrum nach Anregung bei 280 nm aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Messungen.

Dieser Effekt, der auch schon für andere LTTRs beschrieben ist (Madhusudhan *et al.*, 1997), wurde als Vorlage zur Identifizierung neuer Effektoren verwendet. Wie in Abbildung 3.24 zu sehen, führte auch die Zugabe des zweiten bekannten Effektors L-Arginin zu einer Zunahme der maximalen Proteinfluoreszenz mit steigenden Effektorkonzentrationen. Im Gegensatz dazu konnte eine solche Zunahme bei L-Threonin, das bekanntermaßen kein Effektor ist (Bellmann *et al.*, 2001), nicht festgestellt werden. Auch für L-Serin konnte keine Zunahme in der maximalen Fluoreszenz bei steigenden Konzentrationen festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass auch L-Serin kein Effektor von LysG ist. Interessanterweise war der Effekt von D-Aminosäuren in allen vier Fällen vergleichbar zum Effekt der korrespondierenden L-Aminosäure. So führte die Zugabe von D-Lysin und D-Arginin zu einem Anstieg der maximalen Fluoreszenz, während steigende Konzentrationen an D-Threonin und D-Serin keinen Einfluss zeigten. Die jeweiligen Aminosäuren alleine, ohne Zugabe von LysG, zeigten dabei keinerlei Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

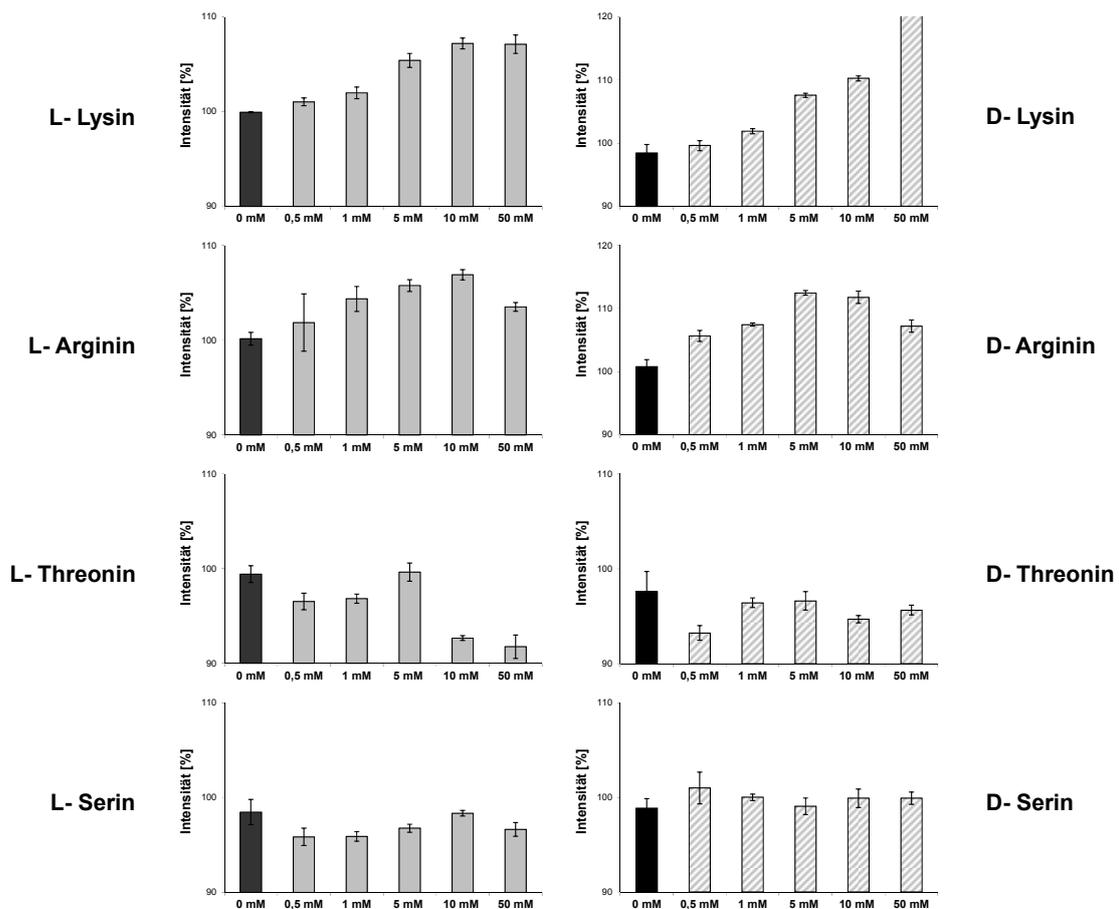


Abbildung 3.24: Veränderungen in der intrinsischen Proteinfluoreszenz von LysG mit verschiedenen Aminosäuren. Dargestellt sind die maximalen Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 280 nm und Emission bei 330 nm in Abhängigkeit unterschiedlicher Aminosäure-Konzentrationen. Pro Ansatz wurden 5 µg LysG mit den entsprechenden Konzentrationen der Aminosäuren für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen.

Die Daten zeigen, dass D-Lysin und auch D-Arginin einen vergleichbaren Einfluss auf die intrinsische Proteinfluoreszenz wie die entsprechenden L-Aminosäuren haben. Anscheinend führen diese beiden D-Aminosäuren *in vitro* also zu Veränderungen in der Proteinkonformation von LysG. Ob diese veränderte Proteinkonformation *in vivo* aber auch zu einer Änderung in der Protein-DNA-Interaktion und damit zur Transkriptionsaktivierung führt, womit die beiden D-Aminosäuren sicher als Effektoren identifiziert wären, bleibt nachzuweisen.

3.3.4.2 Gelretardationsexperimente mit bekannten und putativen Effektoren

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Effektorbindung sind Gelretardationsexperimente. In der Literatur ist beschrieben, dass die Bindung eines Effektors an LTTRs zum einen zu einem veränderten Laufverhalten des DNA-Protein-Komplexes im elektrischen Feld (Porrúa *et al.*, 2007), zum anderen aber auch zu einer erhöhten Affinität der Bindung des Regulators an die DNA (Smirnova *et al.*, 2004) führen kann. Aus diesem Grund wurden erneut, wie schon in Kapitel 3.3.3 beschrieben,

Gelretardationsexperimente mit gereinigtem LysG durchgeführt. Als DNA-Fragment wurde dabei das 340 bp-große *lysGE* 1-Fragment benutzt, das neben der intergenischen Region von *lysG* und *lysE* auch etwa je 140 bp der beiden Gene enthält (Abbildung 3.21). Um zu überprüfen, ob die Zugabe eines Effektors zu einem verändertem Laufverhalten führt, wurden in zwei Ansätzen jeweils 100 ng DNA mit einem 10-fachen molaren Überschuss an LysG gemischt. Zu einem Ansatz wurden zusätzlich 100 mM L-Lysin gegeben und nach Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten das Laufverhalten in einem Polyacrylamid-Gel überprüft. Wie in Abbildung 3.25 (A) dargestellt, veränderte sich das Laufverhalten des DNA-Protein-Komplexes nach Zugabe des Effektors L-Lysin allerdings nicht. Die Effektorbindung konnte demnach nicht über das Laufverhalten nachgewiesen werden.

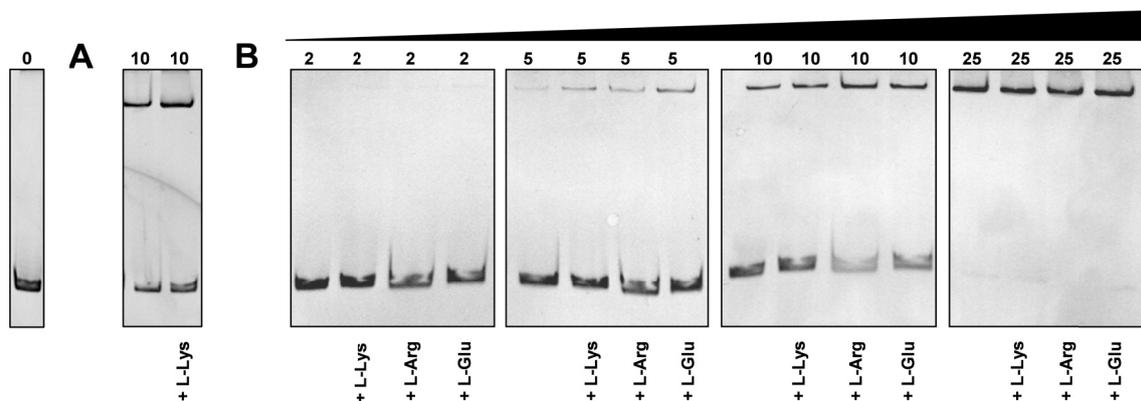


Abbildung 3.25: Gelretardationsexperimente zum Nachweis der Effektorbindung an LysG. Es wurde immer je 100 ng DNA eingesetzt. Links ist das Laufverhalten von *lysGE* 1 ohne Zugabe von LysG dargestellt. Unter A ist das Laufverhalten bei einem 10-fachen molaren Überschuss an LysG und nach Zugabe von 100 mM L-Lysin zu sehen. B zeigt den Einfluss verschiedener Aminosäuren auf die Affinität der Bindung von LysG an *lysGE* 1. Dabei wurden 2-, 5-, 10- und 25-fache Überschüsse an LysG und je 100 mM L-Lysin, L-Arginin oder L-Glutamat eingesetzt. 10 % Polyacrylamid-Gel, 140 V, 1x TBA, 1,5 h.

In einem weiteren Experiment wurde daher geprüft, ob der Effektor einen Einfluss auf die Affinität der Bindung des Regulators an die DNA hat. Dazu wurde erneut das Fragment *lysGE* 1 mit unterschiedlichen molaren Überschüssen von LysG gemischt und jeweils 100 mM der beiden Effektoren L-Lysin und L-Arginin oder der Aminosäure L-Glutamat, die voraussichtlich kein Effektor von LysG ist, zugegeben. Während bei einem 2-, 10- und 25-fachen Überschuss von LysG kein Einfluss der Aminosäuren auf die Bindung an die DNA festzustellen war (Abbildung 3.25 (B)), führte die Zugabe von 100 mM L-Lysin und L-Arginin bei einem 5-fachen molaren Überschuss scheinbar zu einer vermehrten Bindung des Proteins an die DNA. Dies würde auf eine erhöhte Affinität bei Anwesenheit des Effektors hindeuten. Da allerdings auch die Zugabe der negativ-geladenen Aminosäure L-Glutamat, die höchst wahrscheinlich kein Effektor ist, einen vergleichbaren Effekt hatte und der Effekt der beiden bekannten Effektoren in weiteren Experimenten nicht konstant reproduziert werden konnte, muss in diesem Fall eher von einem unspezifischem Effekt ausgegangen werden. Da bekannt ist, dass die Bindung des Effektors häufig besonders die

Affinität zur Bindung an die ABS-Sequenz erhöht (Monferrer *et al.*, 2010; Porrua *et al.*, 2007), wurde im Weiteren auch der Einfluss von L-Lysin auf die Bindung von LysG an das 110 bp-große Fragment *lysGE* 3 (Abbildung 3.21), das nur die ABS-Sequenz trägt, untersucht. Auch hier konnte allerdings kein Einfluss auf die Affinität der Bindung festgestellt werden. Zum Nachweis der Bindung eines Effektors an den Transkriptionsregulator LysG und damit zur Identifizierung neuer Effektoren beziehungsweise zur Bestätigung von D-Lysin als Effektor konnten Gelretardationsexperimente demnach nicht verwendet werden.

3.3.4.3 Analyse der LysG-vermittelten Transkriptionsaktivierung des Reportergens *eYFP*

Wie zuvor beschrieben, konnte zwar eine Konformationsänderung von LysG anhand der intrinsischen Fluoreszenz gezeigt werden, allerdings ist damit noch kein Nachweis dafür erbracht, dass diese Konformationsänderung auch zur Aktivierung der Transkription von *lysE* führt. Um die Transkriptionsaktivierung sichtbar zu machen, wurde ein System genutzt, in dem die Effektorbindung an LysG nicht wie standardmäßig zur Expression von *lysE* führt, sondern zur Bildung des Autofluoreszenzproteins *eYFP*, das translational mit den ersten 63 Basenpaaren von *lysE* fusioniert ist (Abbildung 3.26). Die Transkription ist damit als Fluoreszenz der ganzen Zelle sichtbar. Der entsprechende Vektor pJC1*lysGE'eYFP* wurde dazu von Tina Wings, als Methode zur Bestimmung der internen L-Lysin-Konzentrationen in *C. glutamicum*, bereits konstruiert (Wings, 2010).

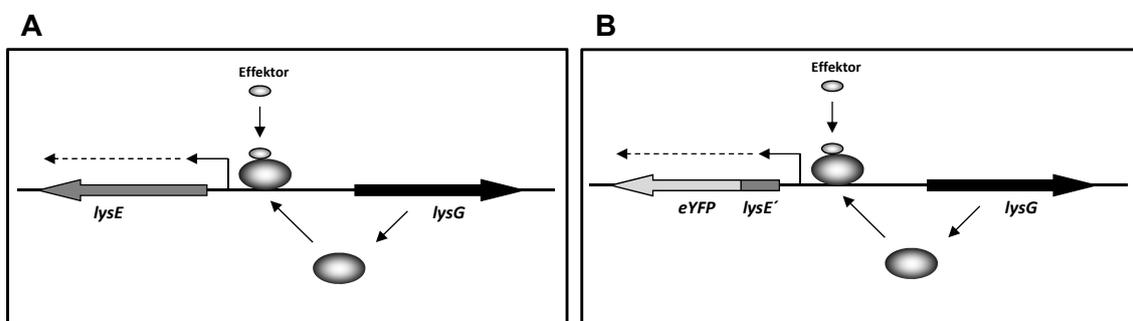


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung der Organisation des *lysE-lysG*-Genlokus. Unter (A) ist schematisch der Genlokus von *lysE-lysG* in *C. glutamicum* ATCC13032 dargestellt. (B) zeigt die Organisation des Genlokus mit der translationalen Fusion von *lysE'* (Basenpaar 1-63) und *eYFP*, wie es im Plasmid pJC1*lysGE'eYFP* zu finden ist.

Um mit diesem *in vivo*-System nachweisen zu können, dass neben L-Lysin und L-Arginin auch die entsprechenden D-Aminosäuren als Effektoren von LysG dienen können, musste allerdings zunächst eine interne Akkumulation der jeweiligen Aminosäure erzielt werden. Eine Möglichkeit ist dabei, wie unter 3.3.1 beschrieben, die Nutzung eines Dipeptid-System. Wie zuvor nachgewiesen, führte die Zugabe des Dipeptids D-Lys-L-Ala zu *C. glutamicum-ΔlysEG* allerdings nicht zu einer internen Akkumulation von D-Lysin. In der Annahme, dass auch die Zugabe von Aminosäuren zum Medium zu einer zellinternen Anreicherung der jeweiligen Aminosäure führt, wurde der Stamm *C. glutamicum-*

pJC1lysGE'eYFP in CGXII-Glukose-Medium und je 50 mM der zu testenden Aminosäure kultiviert und die mittlere Fluoreszenz der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem BD FACSAria™ II Zellsortierer gemessen. Nach 2, 4 und 7 Stunden wurden Proben der Kulturen auf ihre Fluoreszenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass die stärkste Fluoreszenz von *C. glutamicum*-pJC1lysGE'eYFP nach 4 Stunden Kultivierung und Zugabe von L-Lysin bestand. Im Gegensatz zu den Ansätzen mit den anderen Aminosäuren, bei denen sich die Fluoreszenz über die Zeit kaum veränderte, stieg die Fluoreszenz nach Zugabe von L-Lysin von 900 nach 2 Stunden auf einen Wert von 1400 nach 4 Stunden an. Nach 7 Stunden war noch immer eine Fluoreszenz von 1100 messbar. Zum Vergleich dient exemplarisch die Fluoreszenz der einzelnen Ansätze nach 4 Stunden (Abbildung 3.27).

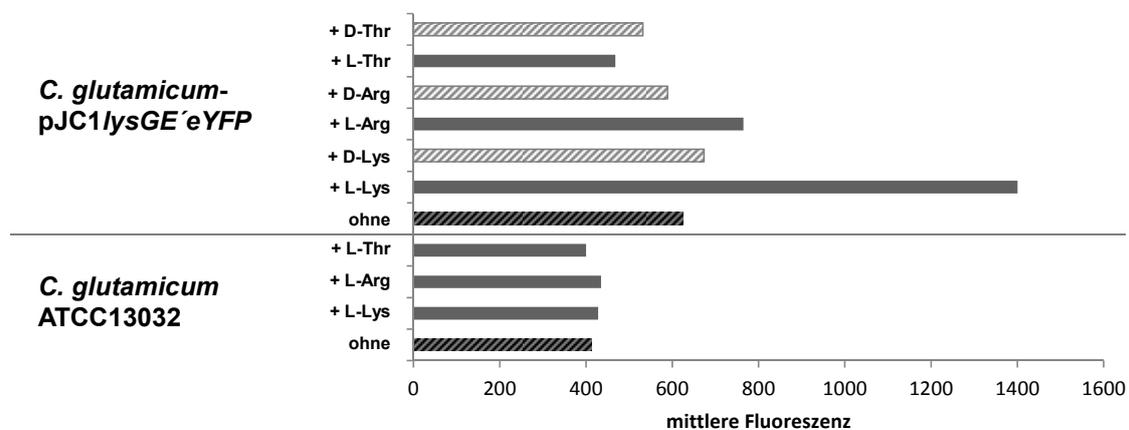


Abbildung 3.27: Mittlere Fluoreszenz von *C. glutamicum* nach Zugabe spezifischer Aminosäuren. Dargestellt ist die mit dem BD FACSAria™ II gemessene mittlere Fluoreszenz von ganzen Zellen nach 4 Stunden Kultivierung in CGXII-Glukose-Medium + 50 mM der entsprechenden Aminosäure. Es wurde sowohl der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032, also auch der Stamm *C. glutamicum*-pJC1lysGE'eYFP untersucht.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen, konnte für den Stamm *C. glutamicum*-pJC1lysGE'eYFP mit 50 mM des bekannten Effektors L-Lysin im Medium eine etwa doppelt so starke mittlere Fluoreszenz wie mit dem Stamm ohne Effektor gemessen werden. Der zweite bekannte Effektor L-Arginin führte allerdings nur zu einer sehr schwachen Erhöhung um etwa das 1,2-fache. Im Gegensatz dazu konnte nach Zugabe von 50 mM der jeweiligen D-Aminosäure ebenso wie nach Zugabe von Threonin, das bekanntermaßen kein Effektor ist, keine eindeutige Zunahme der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Zugabe von L-Lysin zum Medium führt demnach zu einer internen Akkumulation der Aminosäure, gefolgt von einer LysG-vermittelten Aktivierung des Reportergens *eYFP*. Für alle anderen Ansätze kann nicht sicher gesagt werden, ob die fehlende Erhöhung der mittleren Fluoreszenz auf einer fehlenden internen Akkumulation der jeweiligen Aminosäuren oder einer nicht vorhandenen Transkriptionsaktivierung beruht. Um eine stärkere interne Akkumulation von Lysin und Arginin zu erzielen, wurde im Folgenden der Stamm Δ lysEG, der nicht mehr zum Export von Lysin und Arginin fähig ist, mit dem Stamm

pJC1*lysGE'eYFP* transformiert. Allerdings konnte auch in diesem System nur bei Zugabe von L-Lysin ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Ein *in vivo*-System ist demnach ungeeignet, um eine durch D-Aminosäuren vermittelte-Transkriptionsaktivierung in *C. glutamicum* nachzuweisen. Es bleibt aber festzuhalten, dass die beiden D-Aminosäuren D-Lysin und D-Arginin auf der Ebene der Proteinkonformation einen vergleichbaren Effekt auf den Regulator LysG ausüben, wie die entsprechenden L-Aminosäuren. Da diese bereits als Effektoren identifiziert werden konnten, können auch die D-Aminosäuren als putative Effektoren gelten. Damit ist es in dieser Arbeit nicht nur gelungen, LysE als den Exporter von D-Lysin in *C. glutamicum* zu identifizieren, sondern auch zu zeigen, dass schon auf der Ebene der Transkriptionskontrolle eine Regulation durch die D-Aminosäure wahrscheinlich ist.

4 Diskussion

4.1 Verhalten von *C. glutamicum* gegenüber D-Aminosäuren

D-Aminosäuren sind in der Industrie besonders zum Aufbau neuer semi-synthetischer Antibiotika und anderer Pharmazeutika ein begehrtes Produkt. Im Gegensatz zu den weit verbreiteten L-Aminosäuren sind für D-Aminosäuren bislang aber keine kostengünstigen Produktionswege über Fermentation bekannt. Die Analyse des Potentials von *C. glutamicum* zur D-Aminosäure-Bildung war daher das Hauptziel dieser Arbeit. Da für verschiedene Bakterien, wie einige *Lactobacillus*- (Fox *et al.*, 1944; Teeri, 1954) und *Staphylococcus*-Stämme (Trippen *et al.*, 1976), sowie für *Escherichia coli* (Cosloy & McFall, 1973) und *Bacillus subtilis* (Sakinc *et al.*, 2009) eine Wachstumsinhibierung durch extern zugegebene D-Aminosäuren bereits beschrieben ist und zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Kenntnisse zum Einfluss von D-Aminosäuren auf *C. glutamicum* vorlagen, wurde zunächst das Verhalten dieses Bakteriums gegenüber verschiedenen D-Aminosäuren untersucht. Das Wachstum von *C. glutamicum* ist aber weder durch hohe externe noch hohe interne D-Aminosäure-Konzentrationen stark beeinträchtigt. Bei externer Zugabe von 100 mM der jeweiligen D-Aminosäuren zeigt sich zwar für sechs der sieben getesteten D-Aminosäuren eine Reduktion der Wachstumsrate von $0,38 \text{ h}^{-1}$ ohne D-Aminosäure auf minimal $0,20 \text{ h}^{-1}$ nach Zugabe von D-Methionin, nach 24 Stunden Wachstum ist aber in keiner der Kulturen ein Unterschied in der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp ohne D-Aminosäuren festzustellen. Auch interne D-Serin-Konzentrationen von bis zu 120 mM, wie sie während der D-Serin-Bildung gemessen wurden, wirken sich nur leicht auf das Wachstum aus. *C. glutamicum* ist damit gegenüber verschiedenen D-Aminosäuren tolerant. Die Ursache für diese Toleranz bleibt allerdings unklar. Für einige Bakterien konnte der inhibitorische Effekt auf einen fehlerhaften Einbau der D-Aminosäuren in die Zellwand und einer daraus resultierenden veränderten Zellwandmorphologie zurückgeführt werden (Caparros *et al.*, 1991; Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Trippen *et al.*, 1976). Auch ein fehlerhafter Transfer der D-Aminosäuren auf tRNAs und die daraus resultierende Inhibierung der Translation können Auslöser einer Wachstumsinhibierung sein (Calendar & Berg, 1967; Soutourina *et al.*, 2004). Der Abbau und damit die Detoxifizierung solcher D-Aminoacyl-tRNAs erfolgt dabei über enantiospezifische D-Tyr-tRNA^{Tyr}-Deacylasen (Soutourina *et al.*, 1999; Wydau *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2003). Orthologe des entsprechenden Gens *dtd* aus *E. coli* finden sich nicht nur in vielen Bakterien und einigen Eukaryoten (Yang *et al.*, 2003), sondern auch in *C. glutamicum* (NCgl1843). Ein weiterer Resistenzmechanismus gegenüber D-Aminosäuren ist die Expression von Genen, die einen Abbau der entsprechenden D-Aminosäure bewirken. Viele uropathogene Bakterien wie

Staphylococcus saprophyticus und einige *E. coli* K12-Stämme exprimieren zum Beispiel das *dsdA*-Gen, das für eine D-Serin-Dehydratase (EC 4.3.1.18) kodiert und damit die Umwandlung von D-Serin zu Pyruvat und Ammoniak erlaubt (Cosloy & McFall, 1973; Sakinc *et al.*, 2009). Ein solches Gen ist aber nur für *C. urealyticum* und nicht für *C. glutamicum* bekannt.

Bei der Kultivierung mit D-Aminosäuren zeigte sich auch, dass sich die Konzentrationen der sieben getesteten D-Aminosäuren im Kulturüberstand im Laufe der Zeit meist nur leicht verändern. Während die Konzentrationen von D-Asparagin, D-Arginin, D-Lysin, D-Methionin und D-Threonin über 48 Stunden ungefähr gleich bleiben, kann für D-Alanin im gleichen Zeitraum ein fast vollständiger Abbau und für D-Serin eine Abnahme von etwa 30 % gezeigt werden. Der D-Alanin-Abbau ist dabei wahrscheinlich auf die Aktivität der Alanin-Racemase Alr (NCgl0563), der daraus resultierenden Racemisierung zu L-Alanin (Oikawa *et al.*, 2006) und der anschließenden Verstoffwechslung über Pyruvat (Netzer *et al.*, 2004), sowie den Einbau von D-Alanin in die Zellwand zurückzuführen (Walsh, 1989). Der Grund für die Abnahme der D-Serin-Konzentration ist hingegen unklar. Da die beiden in *C. glutamicum* identifizierten Racemasen hoch-spezifisch für ihre Substrate Alanin und Glutamat sind (Oikawa *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2006), ist eine Racemisierung zu L-Serin und eine anschließende Umwandlung zu Pyruvat über die L-Serin-Dehydratase SdaA (NCgl1583) nicht möglich. SdaA selbst ist, wie andere L-Serin-Dehydratasen auch, enantiospezifisch und katalysiert ausschließlich die Umsetzung des L-Enantiomers (Netzer *et al.*, 2004). D-Serin-Dehydratasen (EC 4.3.1.18), wie sie in uropathogenen Bakterien vorkommen, sind für *C. glutamicum* nicht beschrieben und können aufgrund von Sequenzhomologien auch nicht im Genom identifiziert werden. Auf der anderen Seite ist ein Einbau von D-Serin in die corynebakterielle Zellwand bislang zwar nicht beschrieben, kann aber auch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Arbeiten an Vancomycin-resistenten *Enterococcus gallinarum*-Stämmen zeigen etwa, dass allein der Austausch von zwei Basen im aktiven Zentrum der D-Alanyl-D-Alanin-Ligasen die Spezifität des Enzyms insoweit verändert, dass auch die Bildung von D-Alanyl-D-Serin-Peptiden und damit der Einbau von D-Serin in die bakterielle Zellwand möglich ist (Healy *et al.*, 1998). Auch für andere Bakterien, wie *Bacillus subtilis* oder *Micrococcus luteus*, kann ein Einbau von D-Serin in die Zellwand nachgewiesen werden (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Whitney & Gula, 1968). Allerdings führt dieser zumeist zu einer starken Wachstumsinhibierung, die für *C. glutamicum* nicht nachgewiesen werden konnte. Am Abbau des D-Serins können prinzipiell auch Transaminasen beteiligt sind. Allerdings sind auch diese PLP-abhängigen Enzyme, abhängig von der Orientierung des Pyridoxaminphosphates im aktiven Zentrum, hoch stereospezifisch (Soda *et al.*, 2001; Sugio *et al.*, 1995). Für die Transaminierung von D-Serin kommen daher nur die D-Aminosäure-Transaminasen (EC 2.6.1.21) in Frage. Aus *Bacillus spec.* isolierte D-Aminosäure-Transaminasen zeigen dabei ein weites Substratspektrum und katalysieren unter anderem auch die Transaminierung von D-Serin zu D-Alanin oder, in Abhängigkeit vom Aminoakzeptor, auch zu D-Glutamat (Fuchikami *et al.*, 1998). Allerdings ist auch ein

solches Enzym in *C. glutamicum* nicht vorhanden. Im Gegensatz dazu ist im Genom von *C. glutamicum* aber ein anderes mit D-Aminosäuren arbeitendes Enzym, nämlich eine putative D-Aminosäure-Dehydrogenase (NCgl2909; EC 1.4.99.1) annotiert. Entsprechende DadA-Enzyme wurden aus Organismen wie *E. coli* (Olsiewski *et al.*, 1980), *Pseudomonas fluorescens* (Tsukada, 1966) oder *Heliobacter pylori* (Tanigawa *et al.*, 2010) bereits isoliert und charakterisiert. Es handelt sich hierbei um FAD-abhängige, membrangebundene Dimere, die die Umsetzung von freien D-Aminosäuren zu Ketosäuren und Ammoniak katalysieren, wobei Elektronen meist auf Akzeptoren in der Atmungskette übertragen werden (Olsiewski *et al.*, 1980). Obwohl diese Enzyme prinzipiell ein weites Substratspektrum zeigen, sind sowohl für die DadA aus *Pseudomonas fluorescens* als auch aus *Heliobacter pylori* nur sehr geringe Aktivitäten mit D-Serin beschrieben. Die Beteiligung des durch NCgl2909 kodierten Enzyms am D-Serinabbau in *C. glutamicum* bleibt zu untersuchen.

4.2 Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum*

Die Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum* sollte über Racemisierung von fermentativ aus Zuckern gewonnenen L-Aminosäuren erfolgen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Produktion von D-Serin. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Racemisierung von L-Serin chemisch direkt in der Kulturbrühe möglich, wenn hohe Temperaturen, ein stark basischer pH und der Katalysator PLP vorliegen. Zur enzymatischen Racemisierung wurde die Racemase ArgR aus *Pseudomonas taetrolens* (Matsui *et al.*, 2009) genutzt. Neben den bekannten Aktivitäten mit L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin, die in dieser Arbeit sowohl mit isoliertem Enzym, als auch *in vivo* in *C. glutamicum* gemessen wurden, konnte in dieser Arbeit auch mit L-Serin Aktivität nachgewiesen werden. Mit nur 3 % der Aktivität im Vergleich zu L-Lysin scheint diese zwar gering, im Vergleich mit den spezifischen Serin-Racemasen aus *Mus musculus* und *Arabidopsis thaliana*, für die spezifische Aktivitäten von etwa 83 bis 116 nmol mg⁻¹ min⁻¹ (Strisovsky *et al.*, 2003; Wolosker *et al.*, 1999b) und 4 nmol mg⁻¹ min⁻¹ (Fujitani *et al.*, 2006) gemessen wurden, ist die spezifische Aktivität von 34 µmol mg⁻¹ min⁻¹ für ArgR aber relativ hoch. Auch die Tatsache, dass während der D-Serinbildung mit *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-*argR* intern immer ein Gleichgewicht zwischen den beiden Enantiomeren gemessen werden konnte, zeigt, dass die durch ArgR katalysierte Racemisierung für die D-Serin-Bildung nicht limitierend ist.

Eine Besonderheit der Racemase ArgR ist ihre periplasmatische Lokalisation, die sowohl in *P. taetrolens* als auch in *E. coli* nachgewiesen werden konnte und die unter den Racemasen eine seltene Ausnahme darstellt (Matsui *et al.*, 2009). Bei der Expression in *C. glutamicum* zeigte sich aber, dass das Protein mittels SDS-PAGE weder intra- noch extrazellulär nachweisbar ist. Erst nach Austausch des nativen, Sec-abhängigen

Signalpeptids gegen ein strikt Tat-abhängiges Signalpeptid konnte das Protein im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Möglicherweise wird beim Sec-abhängigen Transport von ArgR das ungefaltete Protein zwar effektiv ins Periplasma exportiert, dort aber aufgrund zum Beispiel fehlender Faltung proteolytisch abgebaut. Entsprechende Probleme sind bei der sekretorischen Produktion heterologer Proteine in *E. coli* bereits beschrieben und beruhen auf der Aktivität von periplasmatischen Proteasen (Choi & Lee, 2004; Georgiou & Segatori, 2005), wie sie auch in *C. glutamicum* beschrieben sind (Burkovski, 2008). Da ArgR, wie viele andere Racemasen auch, PLP als prosthetische Gruppe bindet, und bislang keine Studie über die Existenz von PLP im Periplasma von *C. glutamicum* vorliegt, könnte der fehlende Einbau des Cofaktors der Auslöser für eine falsche oder langsame Faltung und damit der Proteolyse von ArgR sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch die extrazelluläre Lokalisation von ArgR nach Tat-abhängigem Export, der den Transport des Proteins in seiner gefalteten, Cofaktor-gebundenen Form erlaubt (Berks *et al.*, 2000).

Für die interne Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum* ist aber die cytoplasmatisch lokalisierte N-terminal verkürzte Variante von ArgR die beste Wahl. Die Expression von *argR* in einem L-Serin-Produktionsstamm führt dabei ebenso zur Bildung beider Enantiomere, wie die Expression in einem L-Lysin-, L-Arginin- und L-Ornithin-Produktionsstamm. Zum ersten Mal kann damit die Bildung von D-Aminosäuren aus Glukose mit *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den basischen Aminosäuren, bei denen immer ein Racemat gebildet wird, führt die Expression von *argR* in einem L-Serin-Produktionsstamm überraschenderweise zu einem Überschuss des D-Enantiomers von maximal 81 mM D- gegenüber 37 mM L-Serin. Da die beiden Enantiomere intern in einem Gleichgewicht vorliegen, scheinen diese Unterschiede, wie später noch diskutiert, abhängig vom Transport zu sein. Die Tatsache, dass mit etwa 118 mM etwa 50 % mehr Serin insgesamt gebildet wird, als für den Produktionsstamm Ser4 beschrieben (Stolz *et al.*, 2007), ist wahrscheinlich auf das reduzierte Wachstum von Ser4-pEKEx3-*argR* zurückzuführen. Supplementiert man den Stamm mit Folsäure, so wird zum einen das Wachstum verbessert, zum anderen aber auch die Bildung von Serin auf etwa 92 mM reduziert. Die Wachstumsinhibition scheint dabei sowohl auf die Integration des Plasmids pEKEx3 als auch die hohen internen Serinkonzentrationen von bis zu 250 mM zurückzuführen zu sein.

Die Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum* birgt somit aufgrund des kostengünstigen Ausgangsmaterial Glukose und der weitreichenden Einsatzmöglichkeiten für eine Reihe von D-Aminosäuren zwar viele Vorteile, beinhalten aber auch den Nachteil, dass nur racemische Mischungen gebildet werden können, aus denen die D-Aminosäuren in einem weiteren Schritt isoliert werden müssen. Die sogenannte Racematspaltung ist aufgrund der Bedeutung von enantio-reinen Substanzen besonders in der pharmazeutischen Industrie gut untersucht (Faigl *et al.*, 2008) und lässt sich in physikochemische und biokatalytische Prozesse unterteilen (Fogassy *et al.*, 2006). Eine physikochemische

Methode zur Racematspaltung ist zum Beispiel die preferentielle Kristallisation, die aufgrund der Notwendigkeit zur Bildung eines Konglomerats allerdings nur für einen kleinen Teil der Racemate, bei den natürlichen Aminosäuren sogar nur für Racemate von Threonin und Asparagin, angewendet werden kann (Jacques *et al.*, 1994; Würges *et al.*, 2008). Weitere physikochemische Prozesse könnten auch die Bildung von leicht voneinander separierbaren Diastereomeren oder chromatographische Methoden sein (Dingenen & Kinkel, 1994; Fogassy *et al.*, 2006). Biokatalytische Anwendungen zur Racematspaltungen führen hingegen aufgrund der enantioselektiven Transformation eines Enantiomers zu einem Produkt, das leicht vom verbleibenden Enantiomer getrennt werden kann. Ein Beispiel dafür ist die Produktion von L-Methionin aus racemischem *N*-Acetyl-Methionin über enantioselektive Aminoacylasen und anschließende Kristallisation (Chenault *et al.*, 1989). Ein anderes Beispiel ist die in dieser Arbeit beschriebene Umwandlung von L-Serin aus einer racemischen Mischung zusammen mit Indol zu L-Tryptophan und die sich daraus ergebende vergleichsweise einfache Möglichkeit der Trennung der beiden Aminosäuren D-Serin und L-Tryptophan. Auch wenn die Stereospezifität der Tryptophansynthase experimentell noch nicht geprüft wurde, ist aufgrund der PLP-Abhängigkeit der für die Umwandlung verantwortlichen β -Untereinheit (Raboni *et al.*, 2009) und der Orientierung des PLP im aktiven Zentrum des Enzymes von einer spezifischen Umwandlung des L-Enantiomers auszugehen (Hyde *et al.*, 1988; Soda *et al.*, 2001). Als geeigneter Stamm zur Biotransformation kann dabei auch ein *C. glutamicum*-Stamm genutzt werden. Wie schon für *E. coli* beobachtet (Lane & Kirschner, 1983), führt die Überexpression der β -Untereinheit allein aber nur zu einer deutlich geringeren Aktivität im Vergleich zur Überexpression beider Untereinheiten der Tryptophansynthase. Mit einer Umsetzung von etwa 80 % des eingesetzten L-Serins nach 3 Stunden Inkubation mit *C. glutamicum*-pEKEx2-*trpBA* ist dieser Stamm unter den gewählten Bedingungen sogar effektiver als der industriell genutzte Stamm *E. coli* B10 (Bang *et al.*, 1983).

4.3 Transport von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum*

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen erstmals, dass eine Reihe verschiedener D-Aminosäuren von *C. glutamicum* ins Medium exportiert werden können. Dazu zählen zum Beispiel D-Serin, D-Lysin, D-Arginin und D-Ornithin. Generell ist der Transport und besonders der Export von Aminosäuren, gerade auch im Hinblick auf die Stereospezifität, aber kaum untersucht. Die beiden in dieser Arbeit näher betrachteten Beispiele des D-Serin- und D-Lysin-Exports zeigen aber, dass der Export von D-Aminosäuren in *C. glutamicum* über unterschiedliche Wege verlaufen kann. D-Lysin wird dabei über den schon gut charakterisierten L-Lysin-Exporter LysE (NCgl1214) exportiert. Da die Deletion der kodierenden Bereiche des Exporters und des zugehörigen Transkriptionsregulators *lysG* im Modellversuch zu einer starken Akkumulation von L- und D-Lysin von 120 bis

240 mM intern führt und während der D-Lysin-Bildung immer ein Gleichgewicht zwischen den Enantiomeren intern und extern entsteht, ist davon auszugehen, dass LysE der einzige Exporter für Lysin ist und er vergleichbare Affinitäten für beide Enantiomere besitzt (Abbildung 4.1, A).

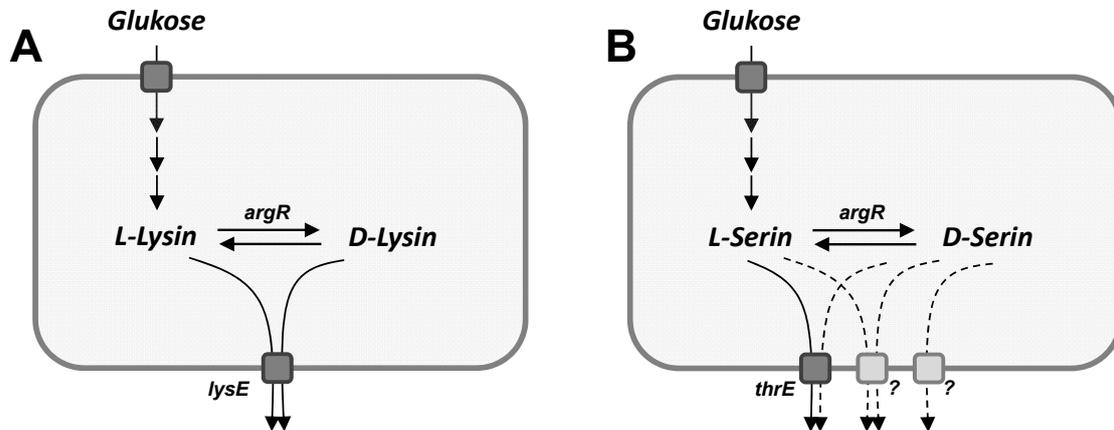


Abbildung 4.1: Schema zur Bildung und zum Export von D, L-Lysin (A) und D, L-Serin (B) in *C. glutamicum*. Alle durchgezogenen Pfeile stellen bekannte Reaktionen und Wege dar, während gestrichelte Pfeile putative Wege symbolisieren. Analog stehen dunkelgraue Kästchen für bekannte Transporter und hellgraue für putative.

Obwohl intern immer ein Gleichgewicht zwischen den Enantiomeren vorliegt, führt die Bildung von D-Serin mit *C. glutamicum* Ser4-pEKEx3-*argR* überraschenderweise zu einem Überschuss des D-Enantiomers im Kulturüberstand. Mit etwa $16 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ wird D-Serin dabei 2,5-fach schneller aus der Zelle exportiert als L-Serin, was auf die Nutzung unterschiedlicher Exportsysteme mit eventuell unterschiedlichen Affinitäten für die beiden Enantiomere hinweist. Ein potentieller Exporter ist dabei ThrE (NCgl2533). ThrE wurde als Exporter von L-Threonin identifiziert, exportiert aber, wenn auch nur halb so schnell, auch L-Serin (Simic *et al.*, 2001). Im Modellsystem führt die Deletion von *thrE* allerdings immer noch zu Exportraten für L-Serin von $0,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ im Vergleich zu Exportraten des Wildtyps von $1,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$. Auch wenn Serin die bakterielle Zellmembran wahrscheinlich per Diffusion überqueren kann (Krämer, 1994), deuten diese Daten an, dass ein weiterer Exporter in *C. glutamicum* existiert, der L-Serin transportiert. Spezifische L-Serin-Exporter sind in Bakterien allerdings bislang nicht bekannt. Ein Grund hierfür könnte es sein, dass Wege zum katabolischen Abbau von L-Serin über die L-Serin-Dehydratasen (EC 4.3.1.17) und Serin-Hydroxymethyl-Transferasen (EC 2.1.2.1) bestehen (Netzer *et al.*, 2004), die eine interne Akkumulation von L-Serin begrenzen und spezifische Exportsysteme damit unnötig machen.

Die Tatsache, dass L- und D-Serin in *C. glutamicum* mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten exportiert werden, könnte auf unterschiedliche Affinitäten neuer oder schon bekannter Serin-Exporter wie ThrE oder aber auch auf das Vorhandensein eines

spezifischen D-Serin-Exporters zurückzuführen sein (Abbildung 4.1, B). Prinzipiell scheinen enantiospezifische Transportprozesse aber eher selten zu sein. In den meisten bekannten Fällen, wie beim Export von D, L-Lysin in *C. glutamicum*, dem Import von D, L-Serin in *Sphingomonas spec.* (Young *et al.*, 2003) oder dem Import von D, L-Alanin in *Bacillus subtilis* (Clark & Young, 1974) werden beide Enantiomere über das gleiche System mit vergleichbaren Affinitäten exportiert. Aber es gibt auch Ausnahmen. So sind für *Pseudomonas* zwei enantioselektive Systeme zur Aufnahme neutraler Aminosäuren beschrieben, wovon eines spezifisch nur die L-Enantiomere L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin und L-Alanin und das andere spezifische Glycin und die D-Aminosäuren D-Alanin und D-Serin importiert (Fein & MacLeod, 1975; Pearce *et al.*, 1977). Sehr gut untersucht sind auch die D-Serin-Importer CycA und DsdX aus *E. coli* K12, die D-Serin, D-Alanin und Glycin, aber keine L-Aminosäuren importieren (Anfora & Welch, 2006; Cosloy & McFall, 1973; Norregaard-Madsen *et al.*, 1995). Wie es dabei zur Unterscheidung der Enantiomere kommt, ist bislang aber noch unklar. Ein putativer Kandidat für einen D-Serin-Exporter in *C. glutamicum* ist NCgl0580. Die Transkriptmenge des entsprechenden Gens ist nach Kultivierung in D-Serin-haltigem Medium teilweise mehr als 150-fach erhöht, was einem „On/Off-Signal“ entspricht. NCgl0580 kodiert für einen nicht näher charakterisierten Transporter der Drug/Metabolite-Exporter-Familie (Jack *et al.*, 2001), zu denen zum Beispiel auch der L-Threonin-Exporter RhtA (Livshits *et al.*, 2003) und der L-Cystein-Exporter YdeD (Dassler *et al.*, 2000) aus *E. coli* gehören. Das noch nicht charakterisierte Exportergen wird dabei ebenso wie *lysE* (Vrljic *et al.*, 1996) divergent von dem Gen eines LysR-Transkriptionsregulators exprimiert. Sollte in *C. glutamicum* ein D-Serin-spezifischer Exporter identifiziert werden, könnte dies zu einer vollkommen neuartigen Möglichkeit zur bevorzugten Bildung des D-Enantiomers von Serin aus Glukose führen.

Die Frage der Stereospezifität kann aber auch schon auf der Ebene der Transkriptionsregulation gestellt werden. Es ist bereits bekannt, dass die Transkription des Gens des Lysin-Exporters LysE durch den zur Familie der LysR-Transkriptionsregulatoren gehörenden Regulator LysG reguliert wird (Bellmann *et al.*, 2001). Wie für andere Mitglieder dieser Familie beschrieben, bindet LysG dabei als Tetramer an eine etwa 80 bis 90 bp-große Sequenz im Promotorbereich von *lysE* und inhibiert somit die Transkription (Peeters *et al.*, 2009; van Keulen *et al.*, 2003). Erst durch die Bindung eines geeigneten Effektors kommt es zu Konformationsänderungen, die in der Folge zur Aktivierung der Transkription führen (Maddocks & Oyston, 2008; Zhou *et al.*, 2010). Solche Effektoren sind meist Metabolite der regulierten Biosynthesewege oder Substrate der regulierten Exporter (Lochowska *et al.*, 2001; Peeters *et al.*, 2009). Für LysG sind bislang L-Lysin und L-Arginin, die beide auch über LysE exportiert werden, und L-Histidin und L-Citrullin als Effektoren bekannt (Bellmann *et al.*, 2001). Da aber auch D-Lysin über LysE exportiert wird, könnte auch diese D-Aminosäure ein Effektor von LysG sein. Ähnliches ist bereits für den Regulator BkdR aus *Pseudomonas putida* bekannt, der die Expression des *bkd*-Operons, das für die Untereinheiten einer Dehydrogenase von verzweigt-kettigen

Ketosäuren kodiert, reguliert und bei dem neben L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin auch D-Valin als Effektor fungiert (Madhusudhan *et al.*, 1999). Die Änderungen der intrinsischen Fluoreszenz von LysG zeigen bereits, dass D-Lysin und D-Arginin einen ähnlichen Einfluss auf die Proteinkonformation wie die entsprechenden, als Effektoren bereits identifizierten, L-Enantiomere haben. Ein direkter Nachweis der Transkriptionsaktivierung von *lysE* auf der Grundlage der Bindung von D-Aminosäuren an LysG ist bislang aber, besonders aufgrund einer fehlenden spezifischen internen Akkumulation der D-Aminosäuren in den untersuchten *in vivo*-Systemen, nicht möglich. Durch die Isolation der RNA-Polymerase aus *C. glutamicum* (T. Polen, unveröffentlichte Daten) und der daraus entstehenden Möglichkeit der *in vitro*-Transkriptionsanalyse, könnte dieses Problem in Zukunft womöglich umgangen werden. Auch die Analyse der Kristallstruktur, wie sie bislang für sechs LTTRs beschrieben ist (Monferrer *et al.*, 2010; Muraoka *et al.*, 2003; Sainsbury *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2004; Verschueren *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2010), könnte weitere Erkenntnisse über die Stereospezifität der Effektorbindung an LysG liefern.

4.4 Ausblick

Zusammengefasst ist es in dieser Arbeit erstmalig gelungen, Einblicke in das Verhalten des als L-Aminosäure-Produzenten bekannten Stammes *C. glutamicum* gegenüber D-Aminosäuren zu gewinnen. Es zeigte sich dabei, dass *C. glutamicum* resistent gegenüber hohen internen und externen Konzentrationen an D-Aminosäuren ist und diese auch aus der Zelle exportiert werden können. Weiterhin ist es möglich geworden, mehrere D-Aminosäuren in Form racemischer Mischungen direkt aus dem kostengünstigen Rohstoff Glukose durch Fermentation zu gewinnen. Durch die Wahl der geeigneten Racemasen ist in Zukunft aber auch die Bildung weiterer D-Aminosäuren möglich. Damit ist es in dieser Arbeit zum ersten Mal gelungen, eine Plattform zur Bildung von D-Aminosäuren mit *C. glutamicum* zu schaffen. Verheißungsvoll ist die Tatsache, dass zumindest für D-Serin ein spezifischer Exporter zu bestehen scheint, was sogar die Möglichkeit eröffnet, nicht nur das Racemat, sondern bevorzugt des D-Enantiomer zu bilden.

Literaturverzeichnis

Abe, S., Takayama, K. I. & Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic-acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**, 279-301.

Alderwick, L. J., Birch, H. L., Mishra, A. K., Eggeling, L. & Besra, G. S. (2007). Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. *Biochem Soc Trans* **35**, 1325-1328.

Anfora, A. T. & Welch, R. A. (2006). DsdX is the second D-serine transporter in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolate CFT073. *J Bacteriol* **188**, 6622-6628.

Araki, T., Hidesaki, T., Watanabe, S., Nishida, K., Nagahara, K. & Koito, M. (2007). DNA encoding novel enzyme having D-serine synthetase activity, method of producing the enzyme and method of producing D-serine by using the same (EP 1806401): Mitsui Chemicals, Inc. (5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-7117, JP).

Argiolas, A. & Deghenghi, R. (2001). Peptides for treatment of erectile dysfunction (US 6211156). United States: Asta, Medica A. G. (Dresden, DE).

Arias, C. A., Martin-Martinez, M., Blundell, T. L., Arthur, M., Courvalin, P. & Reynolds, P. E. (1999). Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol* **31**, 1653-1664.

Asano, Y., Mori, T., Hanamoto, S., Kato, Y. & Nakazawa, A. (1989). A New D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **162**, 470-474.

Banerjee, P. C. (1977). Studies on mycobacillin derivatives. IV. O-methylation of the antibiotic and identification of the active tyrosine residue. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 987-992.

Bang, W. G., Lang, S., Sahm, H. & Wagner, F. (1983). Production of L-tryptophan by *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Bioeng* **25**, 999-1011.

Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S. & Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *Fems Microbiology Reviews* **32**, 168-207.

Beller, M. & Eckert, M. (2000). Amidocarbonylation - An efficient route to amino acid derivatives. *Angewandte Chemie-International Edition* **39**, 1010-1027.

- Bellmann, A., Vrljic, M., Patek, M., Sahm, H., Kramer, R. & Eggeling, L. (2001).** Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **147**, 1765-1774.
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000).** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**, 260-274.
- 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 U S A* **99**, 9697-9702.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300.
- Bhowruth, V., Alderwick, L. J., Brown, A. K., Bhatt, A. & Besra, G. S. (2008).** Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. *Biochem Soc Trans* **36**, 555-565.
- Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sable, S., Guittet, E. & van Heijenoort, J. (1994).** Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol* **176**, 2398-2405.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blaudeck, N., Sprenger, G. A., Freudl, R. & Wiegert, T. (2001).** Specificity of signal peptide recognition in Tat-dependent bacterial protein translocation. *J Bacteriol* **183**, 604-610.
- Blombach, B., Hans, S., Bathe, B. & Eikmanns, B. J. (2009).** Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 419-427.
- Breuer, M., Ditrach, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R. & Zelinski, T. (2004).** Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 788-824.
- Bruckner, H., Westhauser, T. & Godel, H. (1995).** Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and N-isobutyryl-L-cysteine. Applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *J Chromatogr A* **711**, 201-215.
- Bruckner, H., Becker, D., Gams, W. & Degenkolb, T. (2009).** Aib and Iva in the biosphere: Neither rare nor necessarily extraterrestrial. *Chemistry & Biodiversity* **6**, 38-56.

- Brune, I., Jochmann, N., Brinkrolf, K., Huser, A. T., Gerstmeir, R., Eikmanns, B. J., Kalinowski, J., Puhler, A. & Tauch, A. (2007).** The IclR-type transcriptional repressor LtbR regulates the expression of leucine and tryptophan biosynthesis genes in the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**, 2720-2733.
- Bucherer, H. T. & Steiner, W. (1934).** On reactions of alpha-oxy-nitriles and alpha-amino-nitriles - Synthesis of hydantoins. *Journal Fur Praktische Chemie-Leipzig* **140**, 291-316.
- Buck, R. H. & Krummen, K. (1984).** Resolution of amino-acid enantiomers by high-performance liquid-chromatography using automated pre-column derivatization with a chiral reagent. *Journal of Chromatography* **315**, 279-285.
- Burkovski, A. (2008).** *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Wymondham, UK: Caister Academic Press.
- Burman, J. D., Harris, R. L., Hauton, K. A., Lawson, D. M. & Sawers, R. G. (2004).** The iron-sulfur cluster in the L-serine dehydratase TdcG from *Escherichia coli* is required for enzyme activity. *FEBS Lett* **576**, 442-444.
- Calendar, R. & Berg, P. (1967).** D-Tyrosyl RNA: formation, hydrolysis and utilization for protein synthesis. *J Mol Biol* **26**, 39-54.
- Caparros, M., Torrecuadrada, J. L. & de Pedro, M. A. (1991).** Effect of D-amino acids on *Escherichia coli* strains with impaired penicillin-binding proteins. *Res Microbiol* **142**, 345-350.
- Cardinale, G. J. & Abeles, R. H. (1968).** Purification and mechanism of action of proline racemase. *Biochemistry* **7**, 3970-3978.
- Chami, M., Bayan, N., Dedieu, J., Leblon, G., Shechter, E. & Gulik-Krzywicki, T. (1995).** Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: a combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study. *Biol Cell* **83**, 219-229.
- Chen, H. P., Lin, C. F., Lee, Y. J., Tsay, S. S. & Wu, S. H. (2000).** Purification and properties of ornithine racemase from *Clostridium sticklandii*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2052-2054.
- Chenault, H. K., Dahmer, J. & Whitesides, G. M. (1989).** Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids - Enantioselective hydrolysis of N-acyl amino acids catalyzed by acylase I. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 6354-6364.
- Chibata, I., Yamada, S., Hongo, C. & Yoshioka, R. (1983).** Process for racemizing optically active alpha-amino acids or a salt thereof (US 4401820). United States: Tanabe Seiyaku Co., Ltd. (Osaka, JP).

- Choi, J. H. & Lee, S. Y. (2004).** Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 625-635.
- Clark, V. L. & Young, F. E. (1974).** Active transport of D-alanine and related amino acids by whole cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **120**, 1085-1092.
- Clauser, K. R., Baker, P. & Burlingame, A. L. (1999).** Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* **71**, 2871-2882.
- Cosloy, S. D. & McFall, E. (1973).** Metabolism of D-serine in *Escherichia coli* K-12: mechanism of growth inhibition. *J Bacteriol* **114**, 685-694.
- Cremer, J., Eggeling, L. & Sahn, H. (1990).** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **220**, 478-480.
- Dassler, T., Maier, T., Winterhalter, C. & Bock, A. (2000).** Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol Microbiol* **36**, 1101-1112.
- Davey, H. M. & Kell, D. B. (1996).** Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev* **60**, 641-696.
- Dingenen, J. & Kinkel, J. N. (1994).** Preparative chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases on laboratory and production scales by closed-loop recycling chromatography. *Journal of Chromatography A* **666**, 627-650.
- Diven, W. F. (1969).** Studies on amino acid racemases. II. Purification and properties of the glutamate racemase from *Lactobacillus fermenti*. *Biochim Biophys Acta* **191**, 702-706.
- Ebbers, E. J., Ariaans, G. J. A., Houbiers, J. P. M., Bruggink, A. & Zwanenburg, B. (1997).** Controlled racemization of optically active organic compounds: prospects for asymmetric transformation. *Tetrahedron* **53**, 9417-9476.
- Eggeling, L. & Sahn, H. (1999).** L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 146-153.
- Eggeling, L., Bott, M. & (Editors) (2005).** *Handbook of Corynebacterium glutamicum*: CRC Press.
- Eggeling, L. (2009).** *Microbial metabolite export in biotechnology*: John Wiley.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahn, H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2007).** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953-971.

- Erdmann, A., Weil, B. & Krämer, R. (1993).** Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *Journal of General Microbiology* **139**, 3115-3122.
- Esaki, N. & Walsh, C. T. (1986).** Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: purification and characterization of the enzyme encoded by the *alr* gene. *Biochemistry* **25**, 3261-3267.
- Ezezika, O. C., Haddad, S., Neidle, E. L. & Momany, C. (2007).** Oligomerization of BenM, a LysR-type transcriptional regulator: structural basis for the aggregation of proteins in this family. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**, 361-368.
- Faigl, F., Fogassy, E., Nogradi, M., Palovics, E. & Schindler, J. (2008).** Strategies in optical resolution: a practical guide. *Tetrahedron-Asymmetry* **19**, 519-536.
- Fein, J. E. & MacLeod, R. A. (1975).** Characterization of neutral amino acid transport in a marine pseudomonad. *J Bacteriol* **124**, 1177-1190.
- Fogassy, E., Nogradi, M., Kozma, D., Egri, G., Palovics, E. & Kiss, V. (2006).** Optical resolution methods. *Org Biomol Chem* **4**, 3011-3030.
- Fotheringham, I. G., Taylor, P. P. & Ton, J. L. (1998).** Preparation of D-amino acids by direct fermentative means (US 5728555). United States: Monsanto Company (St. Louis, MO).
- Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997).** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250**, 153-156.
- Fox, S. W., Fling, M. & Bollenback, G. N. (1944).** Inhibition of bacterial growth by D-leucine. *Journal of Biological Chemistry* **155**, 465-468.
- Friedman, M. (1999).** Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem* **47**, 3457-3479.
- Friedman, M. (2010).** Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chem Biodivers* **7**, 1491-1530.
- Fuchikami, Y., Yoshimura, T., Gutierrez, A., Soda, K. & Esaki, N. (1998).** Construction and properties of a fragmentary D-amino acid aminotransferase. *J Biochem* **124**, 905-910.
- Fujitani, Y., Nakajima, N., Ishihara, K., Oikawa, T., Ito, K. & Sugimoto, M. (2006).** Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **67**, 668-674.

- Galkin, A., Kulakova, L., Yoshimura, T., Soda, K. & Esaki, N. (1997).** Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4651-4656.
- Garcia-Rodriguez, J. A., Munoz Bellido, J. L. & Garcia Sanchez, J. E. (1995).** Oral cephalosporins: current perspectives. *Int J Antimicrob Agents* **5**, 231-243.
- Georgiou, G. & Segatori, L. (2005).** Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 538-545.
- Grant, S. G., 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 U S A* **87**, 4645-4649.
- Gutmann, M. (1993).** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports. In *Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Hamamoto, K., Kida, Y., Zhang, Y., Shimizu, T. & Kuwano, K. (2002).** Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions. *Microbiol Immunol* **46**, 741-749.
- 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*: Oxford/Washington DC: IRL-Press.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T. & Takahashi, K. (1992a).** The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett* **296**, 33-36.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K. & Hayashi, T. (1992b).** Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthaldialdehyde. *J Chromatogr* **582**, 41-48.
- Hayden, P. J. & Goldman, V. S. (2000).** Deodorant composition containing D-amino acid (US 6060043). United States: The Gillette Company (Boston, MA).
- Healy, V. L., Park, I. S. & Walsh, C. T. (1998).** Active-site mutants of the VanC2 D-alanyl-D-serine ligase, characteristic of one vancomycin-resistant bacterial phenotype, revert towards wild-type D-alanyl-D-alanine ligases. *Chem Biol* **5**, 197-207.
- Heller, B. (1982).** D-Phenylalanine treatment (US 4355044). United States.
- Hochuli, E. (1988).** Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* **444**, 293-302.

- Hoffelder, M., Raasch, K., van Ooyen, J. & Eggeling, L. (2010).** Pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase: The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *J Bacteriol.*
- Hoischen, C. & Kramer, R. (1990).** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **172**, 3409-3416.
- Hubbard, B. K. & Walsh, C. T. (2003).** Vancomycin assembly: nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 730-765.
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W. & Davies, D. R. (1988).** 3-Dimensional structure of the tryptophan synthase alpha-2-beta-2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 17857-17871.
- Ikeda, M. & Nakagawa, S. (2003).** The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 99-109.
- Ikeda, M., Mitsuhashi, S., Tanaka, K. & Hayashi, M. (2009).** Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1635-1641.
- Ishiwata, K., Nakamura, T., Makiguchi, N., Miyahara, S., Matsumoto, T. & Nitta, K. (1989).** Method for racemization of optically active serine (US 4879411). United States: Mitsui Toatsu Chemicals, Inc. (Tokyo, JP).
- Jacewicz & Victor W. (Reigate, G. (1987).** Racemization and resolution of alpha-amino acids (US 4647692). United States: Beecham Group p.l.c. (GB2).
- Jack, D. L., Yang, N. M. & Saier, M. H., Jr. (2001).** The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* **268**, 3620-3639.
- Jacques, J., Collet, A. & Wilen, S. H. (1994).** *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.
- Jakoby, M., Ngouoto-Nkili, C. E. & Burkovski, A. (1999).** Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol Tech* **13**, 437-441.
- Janusz, J. M. (1987).** Alpha-L-aspartyl-D-phenylglycine esters and amides useful as high intensity sweeteners (US 4692512). United States: The Procter & Gamble Company (Cincinnati, OH).
- Javitt, D. C. (2000).** Treatment of negative and cognitive symptoms of schizophrenia with D-serine (US 6162827). United States: Javitt, Daniel (Riverdale, NY).

- 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* **266**, 471-482.
- Ju, J., Misano, H. & Ohnishi, K. (2005).** Directed evolution of bacterial alanine racemases with higher expression level. *J Biosci Bioeng* **100**, 246-254.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D. & other authors (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.
- Kalman, D. & Barriere, S. L. (1990).** Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Tex Heart Inst J* **17**, 203-215.
- Katz, E. & Demain, A. L. (1977).** The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* **41**, 449-474.
- 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.
- Khodursky, A. B. & Bernstein, J. A. (2003).** Life after transcription--revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet* **19**, 113-115.
- Kind, S., Jeong, W. K., Schroder, H., Zelder, O. & Wittmann, C. (2010).** Identification and elimination of the competing N-acetyldiaminopentane pathway for improved production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5175-5180.
- Kino, K., Sato, M., Yoneyama, M. & Kirimura, K. (2007).** Synthesis of DL-tryptophan by modified broad specificity amino acid racemase from *Pseudomonas putida* IFO 12996. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 1299-1305.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation, production of L-glutamic acid by various microorganism. *J Gen Appl Microbiol* **3**, 193-205.
- Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1977).** Means of terminating reactions. *Methods Enzymol* **10**, 680-684.
- Kobel, H. & Traber, R. (1982).** Directed biosynthesis of cyclosporins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **14**, 237-240.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S. G., Clardy, J., Kolter, R. & Losick, R. (2010).** D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627-629.
- Krämer, R. (1994).** Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **13**, 75-94.

- Kreil, G. (1994).** Peptides containing a D-amino acid from frogs and mollusks. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 10967-10970.
- Kuehl, F. A., Wolf, F. J., Trenner, N. R. & other authors (1955).** D-4-amino-3-isoxazolidane, a new antibiotic. *J Am Chem Soc* **77**, 2344-2345.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamont, H. C., Staudenbauer, W. L. & Strominger, J. L. (1972).** Partial purification and characterization of an aspartate racemase from *Streptococcus faecalis*. *J Biol Chem* **247**, 5103-5106.
- Lane, A. N. & Kirschner, K. (1983).** The catalytic mechanism of tryptophan synthase from *Escherichia coli* - Kinetics of the reaction of indole with the enzyme-L-serine complexes. *European Journal of Biochemistry* **129**, 571-582.
- Lange, C., Rittmann, D., Wendisch, V. F., Bott, M. & Sahm, H. (2003).** Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2521-2532.
- Law, A. M., Bains, J. & Boulanger, M. J. (2009).** Purification and crystallization of a putative transcriptional regulator of the benzoate oxidation pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**, 1001-1003.
- LeMagueres, P., Im, H., Ebalunode, J., Strych, U., Benedik, M. J., Briggs, J. M., Kohn, H. & Krause, K. L. (2005).** The 1.9 Å crystal structure of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* contains a conserved entryway into the active site. *Biochemistry* **44**, 1471-1481.
- Leopoldseder, S., Hettwer, S. & Sterner, R. (2006).** Evolution of multi-enzyme complexes: the case of tryptophan synthase. *Biochemistry* **45**, 14111-14119.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. & Drauz, K. (2005).** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 1-8.
- Lewis, G. P., McMartin, C. & Yates, C. (1970).** An amino-acid receptor in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* **39**, 213P-214P.
- Liardon, R., Friedman, M. & Philippossian, G. (1991).** Racemization kinetics of free and protein-bound lysinoalanine (LAL) in strong acid media. Isomeric composition of bound LAL in processed proteins. *J Agric Food Chem* **39**, 531-537.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979).** High-performance liquid-chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with ortho-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry* **51**, 1667-1674.

- 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* **154**, 123-135.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D. & Hryniewicz, M. M. (2001).** Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control. *J Biol Chem* **276**, 2098-2107.
- Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. (2008).** Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609-3623.
- Madhusudhan, K. T., Huang, N. & Sokatch, J. R. (1995).** Characterization of BkdR-DNA binding in the expression of the *bkd* operon of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **177**, 636-641.
- Madhusudhan, K. T., Huang, N., Braswell, E. H. & Sokatch, J. R. (1997).** Binding of L-branched-chain amino acids causes a conformational change in BkdR. *J Bacteriol* **179**, 276-279.
- Madhusudhan, K. T., Luo, J. & Sokatch, J. R. (1999).** In vitro transcriptional studies of the *bkd* operon of *Pseudomonas putida*: L-branched-chain amino acids and D-leucine are the inducers. *J Bacteriol* **181**, 2889-2894.
- Martin, J. F., Casqueiro, J., Kosalkova, K., Marcos, A. T. & Gutierrez, S. (1999).** Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**, 21-31.
- Martinez-Rodriguez, S., Martinez-Gomez, A. I., Rodriguez-Vico, F., Clemente-Jimenez, J. M. & Las Heras-Vazquez, F. J. (2010).** Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: an overview. *Chem Biodivers* **7**, 1531-1548.
- Matsui, D., Oikawa, T., Arakawa, N., Osumi, S., Lausberg, F., Stabler, N., Freudl, R. & Eggeling, L. (2009).** A periplasmic, pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid racemase in *Pseudomonas taetrolens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**, 1045-1054.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. & Sahm, H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl Environ Microbiol* **55**, 684-688.
- Merino, E., Jensen, R. A. & Yanofsky, C. (2008).** Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Curr Opin Microbiol* **11**, 78-86.
- Merrifield, R. B., Wade, D. & Boman, H. G. (1996).** Antibiotic peptides containing D-amino acids (US 5585353). United States: The Rockefeller University (New York, NY).
- Miller, R. F. (2004).** D-Serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia* **47**, 275-283.

- 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* **260**, 289-298.
- Mirviss & Stanley B. (Stamford, C. (1988).** Racemization catalyst for amino acids (US 4766250). United States: Stauffer Chemical Co. (Westport, CT).
- Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M. A., Dix, I., Sola, M. & Uson, I. (2010).** Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol Microbiol*.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A. & Snyder, S. H. (2000).** D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4926-4931.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. & Senda, T. (2003).** Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* **328**, 555-566.
- Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H. & Soda, K. (1988).** Enantioselective synthesis of various D-amino acids by a multi-enzyme system. *J Biotechnol* **8**, 243-248.
- Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H. & Wachi, M. (2007).** Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol* **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 Microb* **70**, 7148-7155.
- Norregaard-Madsen, M., McFall, E. & Valentin-Hansen, P. (1995).** Organization and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* K-12 D-serine tolerance locus. *J Bacteriol* **177**, 6456-6461.
- Ogawa, J. & Shimizu, S. (1997).** Diversity and versatility of microbial hydantoin-transforming enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2**, 163-176.
- Oikawa, T., Tauch, A., Schaffer, S. & Fujioka, T. (2006).** Expression of *alr* gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in *Escherichia coli* and molecular characterization of the recombinant alanine racemase. *J Biotechnol* **125**, 503-512.

- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M. & Yukawa, H. (2008a).** An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 459-464.
- Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M. & Yukawa, H. (2008b).** Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 449-454.
- Okubo, Y., Yokoigawa, K., Esaki, N., Soda, K. & Kawai, H. (1999).** Characterization of psychrophilic alanine racemase from *Bacillus psychrosaccharolyticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**, 333-340.
- Olsiewski, P. J., Kaczorowski, G. J. & Walsh, C. (1980).** Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* **255**, 4487-4494.
- Oshiro, B. T. (1999).** The semisynthetic penicillins. *Primary Care Update for OB/GYNS* **6**, 56-60.
- Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A., Gimenez, M. N. & Collins, M. D. (1995).** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 724-728.
- Pearce, S. M., Hildebrandt, V. A. & Lee, T. (1977).** Third system for neutral amino acid transport in a marine pseudomonad. *J Bacteriol* **130**, 37-47.
- Peeters, E., Nguyen Le Minh, P., Foulquie-Moreno, M. & Charlier, D. (2009).** Competitive activation of the *Escherichia coli* *argO* gene coding for an arginine exporter by the transcriptional regulators Lrp and ArgP. *Mol Microbiol* **74**, 1513-1526.
- Petrauskas, A. A. & Svedas, V. K. (1991).** Hydrophobicity of beta-lactam antibiotics. Explanation and prediction of their behaviour in various partitioning solvent systems and reversed-phase chromatography. *J Chromatogr* **585**, 3-34.
- Polen, T., Rittmann, D., Wendisch, V. F. & Sahm, H. (2003).** DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1759-1774.
- Polen, T. & Wendisch, V. F. (2004).** Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 215-232.
- Porrúa, O., Garcia-Jaramillo, M., Santero, E. & Govantes, F. (2007).** The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol Microbiol* **66**, 410-427.
- Raboni, S., Bettati, S. & Mozzarelli, A. (2009).** Tryptophan synthase: a mine for enzymologists. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2391-2403.

- Reynolds, P. E., Snaith, H. A., Maguire, A. J., Dutka-Malen, S. & Courvalin, P. (1994).** Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochem J* **301** (Pt 1), 5-8.
- Reynolds, P. E. (1998).** Control of peptidoglycan synthesis in vancomycin-resistant enterococci: D,D-peptidases and D,D-carboxypeptidases. *Cell Mol Life Sci* **54**, 325-331.
- Robinson, T. (1976).** D-Amino Acids in Higher-Plants. *Life Sciences* **19**, 1097-1102.
- Rolinson, G. N. & Geddes, A. M. (2007).** The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Int J Antimicrob Agents* **29**, 3-8.
- Rose, W. A., 2nd, Tuthill, C. & Pyles, R. B. (2008).** An immunomodulating dipeptide, SCV-07, is a potential therapeutic for recurrent genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Int J Antimicrob Agents* **32**, 262-266.
- Ryu, H. J., Kim, J. E., Yeo, S. I., Kim, D. S., Kwon, O. S., Choi, S. Y. & Kang, T. C. (2010).** Potential roles of D-serine and serine racemase in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res* **88**, 2469-2482.
- Sainsbury, S., Lane, L. A., Ren, J., Gilbert, R. J., Saunders, N. J., Robinson, C. V., Stuart, D. I. & Owens, R. J. (2009).** The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* **37**, 4545-4558.
- Saito, M., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Shinohara, T., Wakabayashi, S., Kurihara, T., Ishizuka, M. & Nagata, Y. (2007).** Alanine racemase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637: purification, characterization and gene cloning. *Life Sci* **80**, 788-794.
- Sakinc, T., Michalski, N., Kleine, B. & Gatermann, S. G. (2009).** The uropathogenic species *Staphylococcus saprophyticus* tolerates a high concentration of D-serine. *FEMS Microbiol Lett.*
- 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 U S A* **74**, 5463-5467.
- Sapuntsova, S. G., Mel'nikova, N. P., Deigin, V. I., Kozulin, E. A. & Timoshin, S. S. (2002).** Proliferative processes in the epidermis of patients with atopic dermatitis treated with thymodepressin. *Bull Exp Biol Med* **133**, 488-490.
- Schaaf, S. & Bott, M. (2007).** Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**, 5002-5011.

- Schafer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H. & Puhler, A. (1990).** High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol* **172**, 1663-1666.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Puhler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schell, M. A. (1993).** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**, 597-626.
- Schneider, J., Niermann, K. & Wendisch, V. F. (2010).** Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*. Epub ahead of print.
- Schneider, J. & Wendisch, V. F. (2010).** Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Epub ahead of print.
- Schnell, B., Faber, K. & Kroutil, W. (2003).** Enzymatic racemisation and its application to synthetic biotransformations. *Adv Synth Catal* **345**, 653-666.
- Schwass, D. E. & Finley, J. W. (1984).** Heat and alkaline damage to proteins: racemization and lysinoalanine formation. *J Agric Food Chem* **32**, 1377-1382.
- Sengupta, S., Shah, M. & Nagaraja, V. (2006).** Glutamate racemase from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits DNA gyrase by affecting its DNA-binding. *Nucleic Acids Research* **34**, 5567-5576.
- Senn, R., Maienfisch, P. & Wyss, P. (2003).** Pesticidal compositions (US 6514954). United States: Syngenta Crop Protection, Inc. (Greensboro, NC).
- Senuma, M., Otsuki, O., Sakata, N., Furui, M. & Tosa, T. (1989).** Industrial production of D-aspartic acid and L-alanine from DL-aspartic acid using a pressurized column reactor containing immobilized *Pseudomonas dacunhae* cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **67**, 233-237.
- 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.
- Shao, Z. & Newman, E. B. (1993).** Sequencing and characterization of the *sdaB* gene from *Escherichia coli* K-12. *Eur J Biochem* **212**, 777-784.
- Simic, P., Sahm, H. & Eggeling, L. (2001).** L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **183**, 5317-5324.

- Smirnova, I. A., Dian, C., Leonard, G. A., McSweeney, S., Birse, D. & Brzezinski, P. (2004).** Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *J Mol Biol* **340**, 405-418.
- Smith, A. J., Cawston, T. E. & Hazleman, B. L. (1985).** A rapid and reproducible method for the analysis of immune complexes using affinity chromatography and Western blotting. *J Immunol Methods* **84**, 125-134.
- Smith, K. M., Cho, K. M. & Liao, J. C. (2010).** Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 1045-1055.
- Soda, K. & Osumi, T. (1969).** Crystalline amino acid racemase with low substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **35**, 363-368.
- Soda, K., Yoshimura, T. & Esaki, N. (2001).** Stereospecificity for the hydrogen transfer of pyridoxal enzyme reactions. *Chem Rec* **1**, 373-384.
- Soutourina, J., Plateau, P., Delort, F., Peirottes, A. & Blanquet, S. (1999).** Functional characterization of the D-Tyr-tRNA^{Tyr} deacylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 19109-19114.
- Soutourina, O., Soutourina, J., Blanquet, S. & Plateau, P. (2004).** Formation of D-tyrosyl-tRNA^{Tyr} accounts for the toxicity of D-tyrosine toward *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**, 42560-42565.
- Stolz, M., Peters-Wendisch, P., Etterich, H., Gerharz, T., Faurie, R., Sahn, H., Fersterra, H. & Eggeling, L. (2007).** Reduced folate supply as a key to enhanced L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 750-755.
- Strisovsky, K., Jiraskova, J., Barinka, C., Majer, P., Rojas, C., Slusher, B. S. & Konvalinka, J. (2003).** Mouse brain serine racemase catalyzes specific elimination of L-serine to pyruvate. *FEBS Lett* **535**, 44-48.
- Strisovsky, K., Jiraskova, J., Mikulova, A., Rulisek, L. & Konvalinka, J. (2005).** Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity dicarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. *Biochemistry* **44**, 13091-13100.
- Su, H. & Newman, E. B. (1991).** A novel L-serine deaminase activity in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **173**, 2473-2480.
- Sugio, S., Petsko, G. A., Manning, J. M., Soda, K. & Ringe, D. (1995).** Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry* **34**, 9661-9669.
- Sunkara, P. (2006).** D-methionine formulation with improved biopharmaceutical properties (US 20060058390). United States: Molecular Therapeutics, Inc. (Ann Arbor, MI, US).

- Takahashi, E., Furui, M., Seko, H. & Shibatani, T. (1997a).** D-methionine preparation from racemic methionines by *Proteus vulgaris* IAM 12003 with asymmetric degrading activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 173-179.
- Takahashi, E., Furui, M., Seko, H. & Shibatani, T. (1997b).** D-lysine production from L-lysine by successive chemical racemization and microbial asymmetric degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 347-351.
- Takahashi, E., Furui, M. & Shibatani, T. (1997c).** Scale-up of D-lysine production from L-lysine by successive chemical racemization and microbial asymmetric degradation. *Biotechnology Letters* **19**, 245-249.
- Takahashi, E., Furui, M. & Shibatani, T. (1997d).** D-amino acid production from racemic amino acids by a microbial asymmetric degradation. *Biotechnol Tech* **11**, 913-916.
- Tanigawa, M., Shinohara, T., Saito, M., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Wakabayashi, S., Ishizuka, M. & Nagata, Y. (2010).** D-amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Amino Acids* **38**, 247-255.
- Tauch, A., Gotker, S., Puhler, A., Kalinowski, J. & Thierbach, G. (2002a).** The alanine racemase gene *alr* is an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. *J Biotechnol* **99**, 79-91.
- Tauch, A., Homann, I., Mormann, S. & other authors (2002b).** Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J Biotechnol* **95**, 25-38.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Gotker, S., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2002c).** Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**, 362-367.
- Teeri, A. E. (1954).** Effect of D-amino acids on growth of lactobacilli. *J Bacteriol* **67**, 686-688.
- Tentolouris, N., Voulgari, C. & Katsilambros, N. (2007).** A review of nateglinide in the management of patients with type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* **3**, 797-807.
- Thali, M. (1995).** Cyclosporins: immunosuppressive drugs with anti-HIV-1 activity. *Mol Med Today* **1**, 287-291.
- Thompson, R. J., Bouwer, H. G., Portnoy, D. A. & Frankel, F. R. (1998).** Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. *Infect Immun* **66**, 3552-3561.
- Trippen, B., Hammes, W. P., Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1976).** Mode of action of D-amino acids on biosynthesis of peptidoglycan. *Archives of Microbiology* **109**, 247-261.

- Tsai, G. & Coyle, J. (2001).** Methods for treating neuropsychiatric disorders (US 6228875). United States: The General Hospital Corporation (Boston, MA).
- Tsukada, K. (1966).** D-amino acid dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* **241**, 4522-4528.
- Tuttle, A. L. & Gest, H. (1960).** Induction of morphological aberrations in *Rhodospirillum rubrum* by D-amino acids. *J Bacteriol* **79**, 213-216.
- Uo, T., Yoshimura, T., Tanaka, N., Takegawa, K. & Esaki, N. (2001).** Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J Bacteriol* **183**, 2226-2233.
- van der Rest, M. E., Lange, C. & Molenaar, D. (1999).** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 541-545.
- van Heijenoort, J. (2001a).** Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* **18**, 503-519.
- van Heijenoort, J. (2001b).** Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**, 25R-36R.
- van Keulen, G., Ridder, A. N., Dijkhuizen, L. & Meijer, W. G. (2003).** Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J Bacteriol* **185**, 1245-1252.
- Verschuere, K. H., Addy, C., Dodson, E. J. & Wilkinson, A. J. (2001).** Crystallization of full-length CysB of *Klebsiella aerogenes*, a LysR-type transcriptional regulator. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 260-262.
- Vrljic, M., Sahm, H. & Eggeling, L. (1996).** A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **22**, 815-826.
- Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G. & Merrifield, R. B. (1990).** All D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4761-4765.
- Wakayama, M., Yoshimune, K., Hirose, Y. & Moriguchi, M. (2003).** Production of D-amino acids by N-acyl-D-amino acid amidohydrolase and its structure and function. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **23**, 71-85.
- Walsh, C. T. (1989).** Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J Biol Chem* **264**, 2393-2396.

- Wendisch, V. (1997).** Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur in vivo-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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* **290**, 205-213.
- Whitney, J. G. & Grula, E. A. (1968).** A major attachment site for D-serine in the cell wall mucopeptide of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim Biophys Acta* **158**, 124-129.
- Wings, T. (2010).** Transporter und Transporter-Nutzung in *C. glutamicum*: Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Wolosker, H., Blackshaw, S. & Snyder, S. H. (1999a).** Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13409-13414.
- Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J. P., Brady, R. O., Jr., Ferris, C. D. & Snyder, S. H. (1999b).** Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 721-725.
- Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L. & Foltyn, V. N. (2008).** D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *Febs J* **275**, 3514-3526.
- Würges, K., Petrussevska, K., Serci, S., Wilhelm, S., Wandrey, C., Seidel-Morgenstern, A., Elsner, M. P. & Lütz, S. (2008).** Enzyme-assisted physiochemical enantioseparation processes - part I: Production, characterization of a recombinant amino acid racemase. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*.
- Wydau, S., van der Rest, G., Aubard, C., Plateau, P. & Blanquet, S. (2009).** Widespread distribution of cell defense against D-aminoacyl-tRNAs. *J Biol Chem* **284**, 14096-14104.
- Yabu, K. & Huempfer, H. R. (1974).** Inhibition of growth of *Mycobacterium smegmatis* and of cell wall synthesis by D-serine. *Antimicrob Agents Chemother* **6**, 1-10.
- Yamada, H. & Shimizu, S. (1988).** Mikrobielle und enzymatische Verfahren zur Produktion biologisch und chemisch wertvoller Verbindungen. *Angew Chem* **100**, 640-661.
- Yang, H., Zheng, G., Peng, X., Qiang, B. & Yuan, J. (2003).** D-Amino acids and D-Tyr-tRNA(Tyr) deacylase: stereospecificity of the translation machine revisited. *FEBS Lett* **552**, 95-98.
- Yet, L. (2001).** Neue Entwicklungen bei der katalytisch-asymmetrischen Strecker-Reaktion. *Angew Chem* **113**, 900-902.

Yokoyama, T., Kan-no, N., Ogata, T., Kotaki, Y., Sato, M. & Nagahisa, E. (2003). Presence of free D-amino acids in microalgae. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **67**, 388-392.

Yorifuji, T., Ogata, K. & Soda, K. (1971). Arginine racemase of *Pseudomonas graveolens* .1. Purification, crystallization, and properties. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 5085-&.

Yoshimura, T. & Esak, N. (2003). Amino acid racemases: functions and mechanisms. *J Biosci Bioeng* **96**, 103-109.

Yoshimura, T. & Goto, M. (2008). D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *Febs J* **275**, 3527-3537.

Young, K., Seale, R. B., Olsson, K., Aislabie, J. & Cook, G. M. (2003). Amino acid transport by *Sphingomonas sp* strain Ant 17 isolated from oil-contaminated Antarctic soil. *Polar Biology* **26**, 560-566.

Zhou, X., Lou, Z., Fu, S. & other authors (2010). Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J Mol Biol* **396**, 1012-1024.

Zittrich, S. & Kramer, R. (1994). Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **176**, 6892-6899.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G. & Daffe, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **190**, 5672-5680.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bott danke ich für die Übernahme des Hauptreferates, dem Interesse am Fortgang dieser Arbeit und der Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. Urlacher danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Eggeling für die stete Diskussionsbereitschaft, das immerwährende Interesse an der Arbeit und die Unterstützung über die gesamten Jahre.

Der Amino GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung und für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Eggeling, bestehend aus Karin, Helga, Laure, Ramon, Jens S, den beiden Jan's, Christina K, Kristina I, Christina T, Tina, Toni, Stephan, Ralph und Georg, für die schöne Zeit, die beständige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Ganz besonders herzlich danke ich Katharina, Melanie und Jens N, mit denen ich auf der einen Seite immer viel lachen konnte, die mich auf der anderen Seite aber auch immer wieder aufgebaut haben und damit zu echten Freunden gewachsen sind ... und natürlich dafür, dass sie mir geholfen haben, wenn am Ende der Worte noch soviel vom Jahr übrig war ;-)

Sandra und Frank danke ich dafür, dass sie mich im ersten Jahr in ihrem Büro „adoptiert“ haben und dafür, dass sie den Gang zwischen den Laboren immer wieder belebt haben.

Ich danke auch allen anderen Mitgliedern des IBT-1 und der Infrastruktur für die wunderbare Atmosphäre.

Ganz besonders danke ich Martin dafür, dass er bei mir ist, mich liebt und mich in jeder Situation unterstützt. Und besonders auch dafür, dass er sich geduldig viele Abende lang alle Probleme, auch gerade rund um die Promotion, angehört hat.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich dafür, dass ich bei ihnen immer sein kann, wer und wie ich bin, dass sie in wirklich jeder Situation für mich da waren und sind, und dafür, dass sie mich bedingungslos lieben und unterstützen.

Erklärung

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

Aachen, den

Norma Christine Stähler