

**Untersuchungen zur Glykolyse und zum
L-Serin-Stoffwechsel in
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

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

**vorgelegt von
Roman Netzer
aus Püttlingen**

Jülich 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. H. Sahm

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Hummel

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 2003

Abstract

The amino acid L-serine is a central metabolite in the metabolism and of increasing importance for the industrial use. The aim of this work was to investigate if L-serine can be produced biotechnologically by *Corynebacterium glutamicum* and to study the influence of L-serine degradation and the provision of glycolytic precursors.

To improve the availability of glycolytic precursors for the L-serine biosynthesis, a pyruvate kinase and 3-phosphoglycerate mutase deletion mutant was constructed. It could be shown that pyruvate kinase is essential for growth both on the non PTS (phosphotransferase system) sugar ribose and on the gluconeogenic substrates acetate and citrate. Global gene expression analyses and enzyme assays with a suppressor mutant showed, that the growth of the pyruvate kinase mutant on acetate and citrate could be restored by overexpression of the *mez* gene encoding the malic enzyme. Further it was shown, that the pyruvate kinase mutant accumulates glycolytic precursors for L-serine biosynthesis.

To inactivate the 3-phosphoglycerate mutase, the functional expressed gene was identified by sequence analysis and growth experiments. A *pgm* deletion mutant was only able to grow in presence of both a glycolytic and a gluconeogenic substrate. Thereby, the non-PTS sugar maltose has been metabolised preferentially to glucose that is taken up via a PTS system. It has been shown that the mutant accumulates the unphosphorylated L-serine precursor glycerate.

To investigate the L-serine degradation the L-serine dehydratase encoding gene was identified in the *C. glutamicum* genome by sequence comparison. The subsequent deletion of the *sdaA* gene resulted in a 1.8-fold decreased L-serine degradation rate in comparison to the wild type but the overexpression of *sdaA* led to a 2-fold increased degradation rate. Interestingly, the overexpression of *sdaA* enabled *C. glutamicum* to grow on L-serine.

The deletion of the *sdaA* gene in a *C. glutamicum* strain overexpressing the L-serine biosynthesis genes revealed a 960-fold gain of the L-serine accumulation. After an additional deletion of either the 3-phosphoglycerate mutase or pyruvate kinase encoding gene, a further increase of the L-serine formation was found. Further it was shown that the deletion of *sdaA* and the simultaneous reduction of the serine hydroxymethyltransferase activity, another L-serine converting enzyme, in a strain overexpressing the L-serine biosynthesis genes, led to a tremendous increase of L-serine accumulation up to 100 mM.

INHALTSVERZEICHNIS

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG.....	3
1.	Die L-Serin-Biosynthese	5
2.	Der Abbau von L-Serin	6
3.	Vorstufenbereitstellung für die L-Serin-Biosynthese	8
III	MATERIAL UND METHODEN.....	10
1.	Chemikalien und Enzyme.....	10
2.	Bakterienstämme und Plasmide.....	10
3.	Oligonukleotide.....	15
4.	Nährmedien	17
4.1	Medienzusätze.....	18
5.	Kultivierungsbedingungen	18
5.1	Stammhaltung von Bakterien.....	19
5.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Überexpression von Genen	19
5.3	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> zur Überexpression von Genen	19
6.	Molekularbiologische Methoden	20
6.1	Isolierung von DNA.....	20
6.1.1	Plasmidisolierung	20
6.1.2	Isolierung chromosomaler DNA.....	20
6.1.3	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	21
6.2	Rekombinante DNA-Techniken	21
6.2.1	Restriktion	21
6.2.2	5'-Dephosphorylierung gespaltener Plasmid-DNA	21
6.2.3	Auffüllreaktion mit Hilfe der „Klenow-Polymerase“	22
6.2.4	Ligation.....	22
6.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	22
6.2.5.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	22
6.2.5.2	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	23
6.3	Transformationstechniken	23
6.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
6.3.2	Transformation von <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	24

6.4	Polymerasekettenreaktion	25
6.5	Konstruktion von Deletions- und Insertionsmutanten.....	26
6.6	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen	27
7.	Biochemische Methoden.....	28
7.1	Messung von Enzymaktivitäten	28
7.1.1	Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung	28
7.1.2	Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität	29
7.1.3	Bestimmung der Malat-Enzym-Aktivität.....	29
7.1.4	Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität	30
7.1.5	Bestimmung der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität	31
7.2	Proteinreinigung.....	31
7.2.1	Zellaufschluss mit einer French-Press.....	31
7.2.2	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	32
7.2.3	StrepTactin-Affinitätschromatographie	33
7.2.4	Rekonstitution.....	33
7.3	Proteinbestimmung.....	34
7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
7.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
8.	Bestimmung von Aminosäuren.....	35
8.1	Quantitative Bestimmung mittels <i>reversed phase</i> HPLC	35
8.2	Silikonölzentrifugation.....	36
9.	Quantifizierung von Glykolyseintermediaten und Zuckern	38
9.1	Quantifizierung von Glykolyseintermediaten mittels HPLC.....	38
9.2	Enzymatische Bestimmung der Glucose- und Maltosekonzentration	38
10.	Genexpressionsanalysen.....	39
10.1	Isolierung von Gesamt-RNA	39
10.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	40
10.3	DNA-Chip-Technologie.....	40
10.4	Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips.....	41
10.5	DNA-Chip-Hybridisierung	42
10.6	Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips	43
10.7	Auswertung von DNA-Chips	44

IV	ERGEBNISSE	46
1.	Untersuchungen zur Vorstufenbereitstellung für die L-Serin-Biosynthese	46
1.1	Untersuchungen zur Pyruvatkinase aus <i>C. glutamicum</i>	46
1.1.1	Konstruktion einer <i>pyk</i> -Deletionsmutante	46
1.1.2	Physiologische Charakterisierung der <i>pyk</i> -Deletionsmutante.....	49
1.1.3	Untersuchungen zur Akkumulation von Glykolyseintermediaten mit der Δ <i>pyk</i> -Mutante	52
1.1.4	Isolierung und Charakterisierung von Pyruvatkinase-Suppressor-mutanten	53
1.2	Untersuchungen zur 3-Phosphoglyceratmutase aus <i>C. glutamicum</i>	64
1.2.1	Identifizierung und Charakterisierung der Gene <i>pgm1</i> und <i>pgm2</i>	64
1.2.2	Konstruktion einer <i>pgm1</i> -Deletionsmutante.....	66
1.2.3	Physiologische Charakterisierung der <i>pgm1</i> -Deletionsmutante	66
1.2.4	Untersuchungen zur Akkumulation von Glykolyseintermediaten mit der Δ <i>pgm1</i> -Mutante	70
1.2.5	Vergleich des Wachstums der Δ <i>pgm1</i> -Mutante mit Glucose und Maltose	71
2.	Effekte hoher L-Serin-Konzentrationen auf Wachstum und Gen-expression von <i>C. glutamicum</i>	73
2.1	Einfluss hoher L-Serin-Konzentrationen auf das Wachstum.....	73
2.2	Einfluss hoher L-Serin-Konzentrationen auf das Genexpressions-muster	75
3.	Untersuchungen zum L-Serin-Abbau in <i>C. glutamicum</i>	77
3.1	Bedeutung der L-Serindehydratase im Serin-Abbau	77
3.1.1	Herstellung von <i>sdaA</i> -Überexpressions-Stämmen und einer <i>sdaA</i> -Deletionsmutante	79
3.1.2	Physiologische Charakterisierung der <i>sdaA</i> -Überexpressions-Stämme und der <i>sdaA</i> -Deletionsmutante.....	80
3.2	Nachweis und biochemische Charakterisierung der L-Serin-dehydratase aus <i>C. glutamicum</i>	86
3.2.1	Versuche zur Aufreinigung der L-Serindehydratase.....	86
3.2.1.1	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	86
3.2.1.2	Homologe Expression in <i>C. glutamicum</i>	88

3.2.2	Charakterisierung der L-Serindehydratase in Rohextrakten von <i>C. glutamicum</i>	92
3.2.2.1	Etablierung des L-Serindehydratase-Enzymtests	92
3.2.2.2	Charakterisierung der L-Serindehydratase aus <i>C. glutamicum</i>	93
4.	Untersuchungen zur L-Serin-Bildung mit <i>C. glutamicum</i>	97
4.1	L-Serin-Bildung in L-Serindehydratase-negativen Stämmen	97
4.2	Einfluss der Vorstufenbereitstellung auf die L-Serin-Bildung	98
4.3	Einfluss der Serinhydroxymethyltransferase auf die L-Serin-Bildung	101
V	DISKUSSION	105
1.	Die Pyruvatkinase	105
2.	Die 3-Phosphoglyceratmutase	108
3.	Die L-Serindehydratase	112
4.	L-Serin-Bildung mit <i>C. glutamicum</i>	118
VI	LITERATURVERZEICHNIS	120
VII	ANHANG	134

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ATCC	Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
bp	Basenpaare
C	Cytosin, Kohlenstoff
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminus von Peptiden
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
d	Schichtdicke der Küvette, Desoxy-
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E _x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
fbr	Endprodukt-resistent (<i>feedback resistant</i>)
g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
LSD	L-Serindehydratase
M	molar [mol/l]
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry</i>
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, reduziert
OAA	Oxalacetat
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)

Abkürzungsverzeichnis

ORF	das von einem <i>orf</i> kodierte Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Pyridoxalphosphat
PSR	Pyruvatkinase Suppressormutante, isoliert nach Wachstum auf Ribose
PSA	Pyruvatkinase Suppressormutante, isoliert nach Wachstum auf Acetat
PTS	Phosphoenolpyruvat abhängiges Phosphotransferase-System
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA-	Tricarbonsäure- (<i>Tricarboxylic Acid</i> -)
T _M	Schmelztemperatur der DNA
Tab.	Tabelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
t/a	Tonnen pro Jahr
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetracyclin
THF	Tetrahydrofolat
TNI	Tris-NaCl-Imidazol-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität, 1 U = 1 µmol/min
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume (<i>Volumen pro Volumen</i>)
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

I ZUSAMMENFASSUNG

Die Aminosäure L-Serin ist ein zentraler Metabolit im Stoffwechsel und von zunehmender Bedeutung für die industrielle Nutzung. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob mit *C. glutamicum* L-Serin auch biotechnologisch gewonnen werden kann, und welchen Einfluss hierbei der L-Serin-Abbau und die Vorstufenbereitstellung über die Glykolyse haben.

1. Zur Verbesserung der Vorstufenbereitstellung für die L-Serin-Biosynthese wurden eine Pyruvatkinase- und eine 3-Phosphoglyceratmutase-Mutante hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Pyruvatkinase essentiell für das Wachstum auf dem nicht-PTS (Phosphotransferase-System)-Zucker Ribose sowie auf den glukoneogenetischen Substraten Acetat und Citrat ist. Globale Genexpressionsanalysen und Enzymtests mit einer Suppressormutante ergaben, dass das Wachstum der Pyruvatkinase-Mutante auf Acetat und Citrat durch Überexpression des *mez*-Gens, welches für das Malat-Enzym kodiert, wieder hergestellt werden kann. Weiterhin zeigte sich, dass die Pyruvatkinase-Mutante glykolytische Vorstufen für die L-Serin-Biosynthese akkumuliert.

Um die 3-Phosphoglyceratmutase auszuschalten, wurde zunächst das funktionell exprimierte Gen im *C. glutamicum*-Genom anhand von Sequenzvergleichen und Wachstumsexperimenten identifiziert. Durch Deletion dieses Gens konnte eine Mutante erzeugt werden, die nur in Anwesenheit eines glykolytischen und eines glukoneogenetischen Substrats wachsen kann. Dabei wurde der nicht-PTS-Zucker Maltose besser verstoffwechselt als Glucose, die über ein PTS-System aufgenommen wird. Es zeigte sich, dass die Mutante 23 mal mehr des unphosphorylierten L-Serin-Vorläufers Glycerat akkumuliert als der Wildtyp.

2. Um den Abbau von L-Serin zu untersuchen, wurde zunächst das für die L-Serindehydratase kodierende Gen im Genom von *C. glutamicum* anhand von Sequenzvergleichen identifiziert. Die anschließende Deletion bzw. Überexpression des *sdaA*-Gens ergab, dass die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp L-Serin mit 1,8-fach geringerer Rate, der Überexpressionsstamm jedoch mit einer 2-fach verstärkten Rate abbaut. Interessanter Weise führte die *sdaA*-Überexpression dazu, dass *C. glutamicum* auf L-Serin als einziger C-Quelle wachsen kann.

3. Die Deletion des *sdaA*-Gens in einem Stamm, der zusätzlich die L-Serin-Biosynthesegene überexprimiert, führte zu einer 960-fachen Steigerung der L-Serin-Akkumulation auf 2,9 mM. Wurden gleichzeitig auch die Enzyme 3-Phosphoglyceratmutase oder Pyruvatkinase deletiert, konnte eine weitere Steigerung der L-Serin-Bildung auf 4,7 bzw. 8 mM erreicht werden. Weiter stellte sich heraus, dass die Deletion von *sdaA* und die gleichzeitige Reduktion der Aktivität der Serinhydroxymethyltransferase, einem weiteren L-Serin umsetzenden Enzym, in einem Stamm der die L-Serin-Biosynthesegene überexprimiert, zu einem drastischen Anstieg der L-Serin-Akkumulation auf 100 mM führte.

II EINLEITUNG

Die Gattung *Corynebacterium* wurde ursprünglich 1896 eingeführt. Sie umfasst sowohl pathogene Arten, wie *Corynebacterium diphtheriae* oder *Corynebacterium jeikeium*, als auch nicht-pathogene Arten. Zu diesen nicht-pathogenen Gram-positiven Corynebakterien gehört *Corynebacterium glutamicum*, was für die großtechnische biotechnologische Produktion von Aminosäuren (Eggeling und Sahm, 1999) eine herausragende Bedeutung besitzt. Zu *C. glutamicum* gehören auch seine Subspezies *flavum* und *lactofermentum*. *C. glutamicum* wurde 1957 als *Micrococcus glutamicus* von (Kinoshita *et al.*, 1957) aus Bodenproben isoliert. Es hat einen GC-Gehalt von 54 mol % und besitzt eine stäbchen- bis keulenförmige Gestalt. Es ist unbeweglich, bildet keine Sporen und ist Biotin-auxotroph. Bei Biotin-Mangel scheidet bereits der Wildtyp signifikante Mengen an L-Glutamat aus. Des Weiteren wurden auch Mutantenstämme isoliert, die sehr effizient L-Lysin sekretieren. Die große industrielle Bedeutung wird auch dadurch illustriert, dass das 3309 kb große Genom (Nakagawa, 2002) dieses Bakteriums in den letzten Jahren unabhängig voneinander durch vier Industrie-Unternehmen sequenziert wurde. Auf Basis dieser Informationen konnte die Produktion von L-Glutamat und L-Lysin mit Stämmen, die ursprünglich überwiegend durch ungerichtete Mutagenese erhalten worden waren, durch *metabolic engineering* weiter verbessert werden (Kimura, 2003; Ohnishi *et al.*, 2002; Pfefferle *et al.*, 2003). Derzeit werden mit *C. glutamicum* rund 1.000.000 t/a L-Glutamat und ca. 600.000 t/a L-Lysin hergestellt (Eggeling *et al.*, 2001; Pfefferle *et al.*, 2003).

Die Aminosäure L-Serin wurde 1865 bei Untersuchungen an Rohseide entdeckt (Cramer, 1865). Obwohl diese Aminosäure nicht essentiell ist, kann sie unter bestimmten Bedingungen das Wachstum von Zellkulturen limitieren (de Koning *et al.*, 2003). Ein besonderer Aspekt ist, dass L-Serin nicht nur für die Protein-Biosynthese benötigt wird, sondern auch als Vorstufe für die Synthese verschiedener Zellbausteine dient (Abb. 1). So wird es für die Bildung von Glycin, L-Tryptophan, L-Cystein, Selenocystein sowie L-Methionin benötigt (Brown *et al.*, 1990; Landi *et al.*, 1966; Ravnkar und Somerville, 1987; Sawers, 1998). Darüber hinaus ist L-Serin in die Biosynthese von Phospholipiden (Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin), Sphingolipiden, Ceramiden (Florin-Christensen *et al.*, 1995) und in die Synthese von Purinen (de Koning *et al.*, 2003) involviert. In *E. coli* z. B. werden

pro Gramm Zellmasse etwa 1500 μmol L-Serin synthetisiert, wovon nur etwa 200 μmol direkt zur Proteinsynthese genutzt werden (Neidhardt *et al.*, 1990).

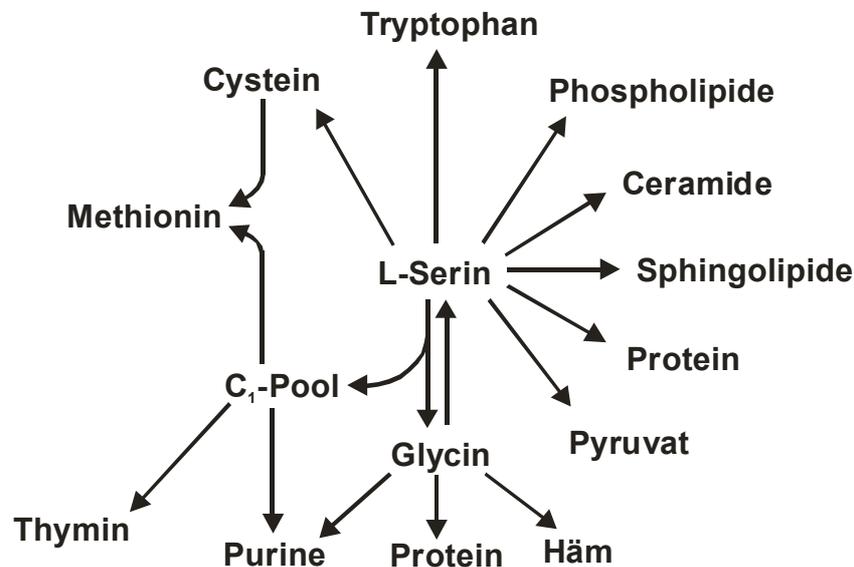


Abb. 1: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege an denen L-Serin beteiligt ist.

L-Serin ist von zunehmendem wirtschaftlichem Interesse. Diese Aminosäure wird zur Herstellung von Infusionslösungen, dem Anti-Parkinsonmittel Benserazid (Birkmayer *et al.*, 1974) oder dem Breitband-Antibiotikum Cycloserin (Martin, 1966) sowie als Zusatzstoff für Kosmetika eingesetzt (Izumi *et al.*, 1993). Auch bei der biotechnologischen Herstellung der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan ist L-Serin von großer Bedeutung (Ikeda und Katsumata, 1999; Somerville, 1983). Der jährliche Bedarf an L-Serin beträgt derzeit etwa 300 t (Ullmann, 2003), wobei ein Teil durch Extraktion aus Melasse oder proteinogenen Rohstoffen nach saurer Hydrolyse hergestellt wird. Dieses Verfahren ist jedoch kostenintensiv und ökologisch nachteilig. Es ist somit erstrebenswert, L-Serin in einem schonenden Verfahren biotechnologisch herzustellen. Als geeigneter Organismus bietet sich hierfür das Bakterium *C. glutamicum* an, da dieses wie beschrieben schon erfolgreich als Aminosäure-Produzent eingesetzt wird. Ferner ist das Verständnis zum *metabolic engineering* speziell an diesem Organismus sehr weit vorangetrieben und es liegt die vollständige Genomsequenz vor. Damit sind ideale Voraussetzungen gegeben, um die Syntheseleistung zu steigern. Wegen der zentralen Stellung von L-Serin im

Stoffwechsel sind wahrscheinlich aber auch der Abbau sowie die Bereitstellung glykolytischer Vorstufen bei einer Stammentwicklung zu berücksichtigen.

1. Die L-Serin-Biosynthese

Für die Biosynthese von L-Serin sind zwei Stoffwechselwege bekannt. Ausgangssubstanz ist dabei jeweils das Glykolyseintermediat 3-Phosphoglycerat. In den meisten heterotrophen Bakterien wie z. B. *Escherichia coli* (Umbarger *et al.*, 1963) oder *Salmonella typhimurium* (Umbarger und Umbarger, 1962) und eukaryotischen Zellen wie z. B. *Saccharomyces* (Ulane und Ogur, 1972) oder Leberzellen (Cheung *et al.*, 1969) erfolgt die L-Serin-Biosynthese über phosphorylierte Intermediate. Die L-Serin-Biosynthese über die nicht-phosphorylierten Intermediate Glycerat und Hydroxypyruvat konnte z. B. in *Neurospora crassa* (Sojka und Garner, 1967), *Rhodopseudomonas capsulata* (Beremand und Sojka, 1977) sowie in Leberzellen von Fröschen und Säugern (Walsh und Sallach, 1966) nachgewiesen werden. Da die weitere Umwandlung von L-Serin zu Glycin in einer reversiblen Reaktion erfolgt, kann die Rückreaktion von Glycin zu L-Serin als ein dritter Syntheseweg aufgefasst werden.

Die L-Serin-Biosynthese erfolgt in *C. glutamicum* über den phosphorylierten Weg und sie wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht (Peters-Wendisch *et al.*, 2002). Dabei konnten die für die drei Biosyntheseenzyme 3-Phosphoglyceratdehydrogenase, Phosphoserinaminotransferase und Phosphoserinphosphatase kodierenden Gene *serA*, *serC* und *serB* (Abb. 2) isoliert und überexprimiert werden. Die L-Serin-Biosynthese wird durch die Umsetzung des Glykolyseintermediates 3-Phosphoglycerat zu Phosphohydroxypyruvat eingeleitet. Diese Reaktion wird durch das Schlüsselenzym der L-Serin-Biosynthese, der 3-Phosphoglyceratdehydrogenase, katalysiert. Peters-Wendisch *et al.* (2002) konnten zeigen, dass dieses Enzym in *C. glutamicum* einer allosterischen Kontrolle durch das Endprodukt L-Serin unterliegt (*feedback*-Hemmung). Die Aktivität des Enzyms wird durch 10 mM L-Serin um etwa 40 % gehemmt. Durch Verkürzen der regulatorischen Domäne der 3-Phosphoglyceratdehydrogenase konnte ein Mutein hergestellt werden, welches nicht mehr durch L-Serin *feedback* gehemmt wird. Von *E. coli* ist auch eine Regulation auf transkriptioneller Ebene bekannt: Neben der Repression des für die 3-Phosphoglyceratdehydrogenase kodierenden Gens *serA* durch cAMP (McKittrick

und Pizer, 1980) ist Lrp (*Leucine-responsive regulatory protein*) als Activator in Anwesenheit von Leucin beschrieben (Lin *et al.*, 1990). Das Enzym Phosphoserinaminotransferase wird durch *serB* kodiert und katalysiert die Umsetzung von Phosphohydroxypyruvat zu Phosphoserin. Im letzten Schritt wird Phosphoserin durch die Phosphoserinphosphatase, welche durch *serC* kodiert wird, zu L-Serin dephosphoryliert.

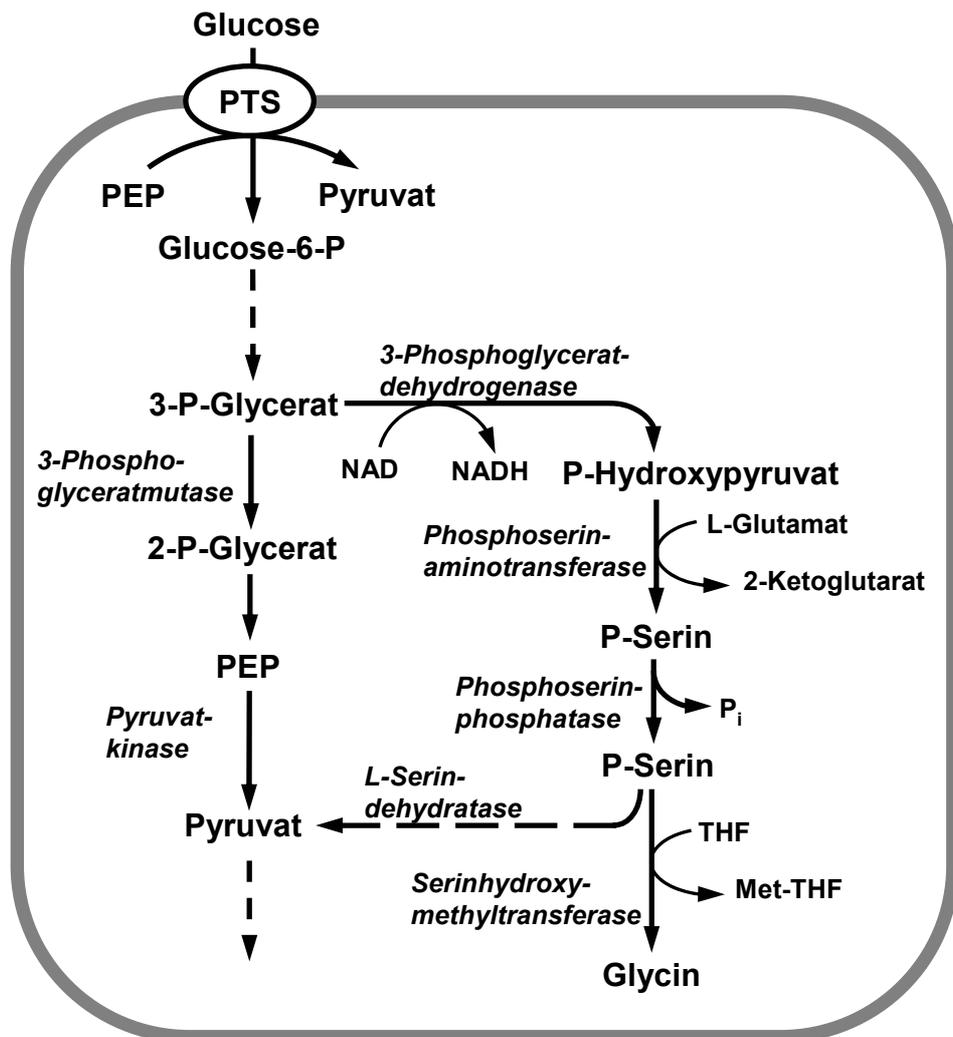


Abb. 2: Schematische Darstellung der Glykolyse und des L-Serin-Stoffwechsels in *C. glutamicum*.

2. Der Abbau von L-Serin

Ein L-Serin umsetzendes Enzym in *C. glutamicum* ist die Serinhydroxymethyltransferase, die durch *glyA* kodiert wird (Simic *et al.*, 2002). Die bei der Reaktion auf Tetrahydrofolat übertragene C₁-Einheit wird unter anderem für die L-Methionin- und Purin-Biosynthese benötigt. Es ist bekannt, dass das Enzym in *E. coli* dem-

entsprechend auch von Regulatorproteinen aus beiden Biosynthesewegen, dem *metR*-Genprodukt (Plamann und Stauffer, 1989) und dem *purR*-Genprodukt (Steiert *et al.*, 1990) auf transkriptioneller Ebene kontrolliert wird. Darüber hinaus wird die Expression des *glyA*-Gens durch verschiedene Verbindungen, die in den C₁-Stoffwechsel involviert sind, beeinflusst, wie L-Serin, Glycin, L-Methionin, Purine und Folate (Stauffer, 1987). In *E. coli* kann die Synthese von C₁-Einheiten alternativ auch durch Spaltung von Glycin durch das sogenannte *Glycine cleavage system* (GCV) erfolgen (Newman *et al.*, 1974). Dieses System ist in *C. glutamicum* sehr wahrscheinlich nicht vorhanden, da gezeigt wurde, dass das *glyA*-Gen essentiell ist und die Serinhydroxymethyltransferase somit die einzige C₁-Einheiten bildende Reaktion katalysiert (Simic *et al.*, 2002). Des Weiteren konnten im Genom von *C. glutamicum* keine Gene identifiziert werden, die für ein *glycine cleavage system* kodieren (Ikeda und Nakagawa, 2003). Die Tatsache, dass die Serinhydroxymethyltransferase auch die Rückreaktion katalysiert, ist benutzt worden, um mit *C. glycinophilum* auch L-Serin zu synthetisieren. Von diesem Organismus konnten Mutanten mit Defekt im L-Serin-Abbau hergestellt werden, deren enzymatische Charakterisierung eine L-Serindehydratase-Aktivität ergab, die in den Mutanten abwesend war (Kubota, 1984). Dieses Enzym katalysiert die Desaminierung von L-Serin zu Pyruvat, was somit dem Zentralstoffwechsel zugeführt wird.

Ein weiteres am L-Serin-Abbau beteiligtes Enzym ist die L-Serindehydratase. L-Serindehydratasen sind weitverbreitete Enzyme, und sie konnten in den verschiedensten Bakterien (Alfoldi und Rasko, 1970; Farias *et al.*, 1991; Grabowski und Buckel, 1991; Hofmeister *et al.*, 1993; Kubota, 1984; Laroche *et al.*, 2003; Morikawa *et al.*, 1974; Pukall *et al.*, 2003; Su und Newman, 1991; Vining und Magasanik, 1981; Zinecker *et al.*, 1998) sowie in Leberzellen (Ogawa *et al.*, 1989), Hefen (Boll und Holzer, 1965) und Pflanzen (Madan und Nath, 1983) nachgewiesen werden. Während eukaryotische L-Serindehydratasen Pyridoxalphosphat (PLP) als prosthetische Gruppe besitzen und neben L-Serin auch L-Threonin desaminieren können (Grabowski *et al.*, 1993), konnte bisher für keine der untersuchten bakteriellen L-Serindehydratasen eine Abhängigkeit von PLP festgestellt werden (Flint und Allen, 1996). Grabowski und Buckel (1991) konnten bei Untersuchungen der L-Serindehydratase aus dem anaeroben Eubakterium *Peptostreptococcus asaccharolyticus* erstmals zeigen, dass das Enzym einen Eisen-Schwefel-Cluster und kein PLP als prosthetische Gruppe besitzt. Bezüglich ihrer Regulation sind zwei

L-Serindehydratasen (LSD1 und LSD2) aus *E. coli* eingehend untersucht. Beide Enzyme zeigen auf DNA-Ebene 73 % Identität zueinander (Shao und Newman, 1993), werden jedoch unterschiedlich reguliert. So wird die Expression des *sdaA*-Gens, welches für LSD1 kodiert (Su *et al.*, 1989), durch den globalen Regulator Lrp reprimiert (McFall und Newman, 1996) und durch verschiedene Umweltfaktoren wie Anaerobiosis, DNA-schädigende Agentien und hohe Temperaturen induziert (Newman *et al.*, 1982b; Newman *et al.*, 1985b). Demgegenüber wird das *sdaB*-Gen, welches für LSD2 kodiert und nur in Komplexmedium exprimiert wird, in erster Linie durch Katabolitrepression via cAMP und CRP (*cyclic AMP receptor protein*) kontrolliert (Shao und Newman, 1993). Beide Proteine werden in einer inaktiven Form synthetisiert und benötigen wahrscheinlich weitere, bisher unbekannte Enzyme zur Aktivierung (Newman *et al.*, 1985a). Darüber hinaus ist noch ein drittes für eine L-Serindehydratase kodierendes Gen, *tdcG*, bekannt, dessen Genprodukt jedoch noch nicht charakterisiert ist (Sawers, 1998). Über die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* ist bisher nichts bekannt. Daher wurde das Enzym in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

3. Vorstufenbereitstellung für die L-Serin-Biosynthese

Die ausreichende Verfügbarkeit von Vorstufen ist für die mikrobielle Aminosäure-Produktion von großer Bedeutung. Da der L-Serin-Biosyntheseweg vom Glykolyseintermediat 3-Phosphoglycerat abzweigt, ist es naheliegend, an diesem Punkt den Glykolysefluss gezielt zu reduzieren, um so den Fluss Richtung L-Serin zu steigern. Dies könnte durch Reduktion der 3-Phosphoglyceratmutase-Aktivität erfolgen. Das Enzym katalysiert die reversible Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat und konkurriert so mit der 3-Phosphoglyceratdehydrogenase um das gemeinsame Substrat 3-Phosphoglycerat. Es wurden zwei strukturell und funktionell unabhängige Gruppen von Phosphoglyceratmutasen unterschieden (Fothergill-Gilmore und Watson, 1989), zum einen Phosphoglyceratmutasen, die von 2,3-Bisphosphoglycerat als Co-Faktor-abhängig sind (dPGM) und zum anderen Co-Faktor-unabhängige Enzyme (iPGM). Interessanterweise besitzen einige wenige Eubakterien wie z. B. *E. coli* und *B. subtilis* Gene für beide Enzymgruppen (Fraser *et al.*, 1999; Rigden *et al.*, 2001). In Sporen verschiedener *Bacillus*-Spezies dient 3-Phosphoglycerat als Energie-Speicherstoff. Dabei wird während der Sporenbildung

die Aktivität der 3-Phosphoglyceratmutase drastisch reduziert, um 3-Phosphoglycerat akkumulieren zu können (Chander *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 1993). Dies zeigt, dass eine Verringerung der Phosphoglyceratmutase-Aktivität geeignet ist, um 3-Phosphoglycerat in der Zelle zu akkumulieren. Somit könnte eine Inaktivierung dieses Enzyms in *C. glutamicum* erhebliche Auswirkungen auf die L-Serin-Bildung zeigen. Ein weiteres Glykolyseenzym, dessen Inaktivierung zu einem Anstau von Vorstufenmetaboliten der L-Serin-Biosynthese führen könnte, ist die Pyruvatkinase. Das Enzym katalysiert die irreversible Umsetzung von PEP zu Pyruvat, wobei ein Molekül ATP gewonnen wird. Interessanterweise ist bereits eine Pyruvatkinase-negative Mutante eines L-Lysin-Produktionsstammes von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* beschrieben, welche die Glykolyseintermediate Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd akkumuliert (Gubler *et al.*, 1994).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Glykolyseenzyme 3-Phosphoglyceratmutase und Pyruvatkinase für die Bereitstellung von Vorstufen für die L-Serin-Biosynthese in *C. glutamicum* zu untersuchen. Zusätzlich sollte auch die Bedeutung dieser Enzyme für das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoff-Quellen untersucht werden. Ein weiteres Ziel waren Untersuchungen zum L-Serin-Abbau in *C. glutamicum*. Hierzu sollte geprüft werden, ob *C. glutamicum* eine L-Serindehydratase-Aktivität besitzt und welche Funktion dieses Enzym in *C. glutamicum* hat. Schließlich sollte auch der Einfluss der Serinhydroxymethyltransferase auf die L-Serin-Umsetzung untersucht werden und durch Kombination der verschiedenen Veränderungen sollte letztlich ein L-Serin produzierender Stamm hergestellt werden.

III MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien und Enzyme

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

2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

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

Stamm	Merkmale	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α MCR	<i>endA1 supE44 recA1 gyrA96 relA1 deoR U169 Φ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
S17-1	<i>thi-1 F endA1 hsdR17 supE44 λ pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21 (DE3)	<i>F ompT hsdS_B(r_B- m_B-) gal dcm (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1);</i> Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen λ DE3, der das T7-Phagen RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors trägt	Studier und Moffatt, 1986
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtypisolat	Abe <i>et al.</i> , 1967
WT:: <i>pgm1</i>	Wildtyp mit einer Disruption des <i>pgm1</i> -Gens durch pK18 <i>mob</i> nach 196 bp	diese Arbeit
WT:: <i>pgm2</i>	Wildtyp mit einer Disruption von <i>pgm2</i> -Gens durch pK18 <i>mob</i> nach 276 bp	diese Arbeit

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

Stamm	Merkmale	Referenz/Herkunft
WT Δ <i>pyk</i>	Derivat von ATCC13032 mit einer Deletion von 1063 bp im <i>pyk</i> -Gen	diese Arbeit
WT PSR	Suppressormutante von WT Δ <i>pyk</i> isoliert nach Wachstum auf Ribose	diese Arbeit
WT PSA	Suppressormutante von WT Δ <i>pyk</i> isoliert nach Wachstum auf Acetat	diese Arbeit
WT Δ <i>pgm1</i>	Derivat von ATCC13032 mit einer Deletion von 433 bp im <i>pgm1</i> -Gen	diese Arbeit
WT Δ <i>sdaA</i>	Derivat von ATCC13032 mit einer Deletion von 414 bp im <i>sdaA</i> -Gen	diese Arbeit
WT Δ <i>panBC</i>	Derivat von ATCC13032 mit einer Deletion von 1293 bp, welche die <i>panBC</i> -Gene beinhalten	Radmacher <i>et al.</i> , 2002
WT Δ <i>panBC</i> Δ <i>sdaA</i>	Derivat von WT- Δ <i>panBC</i> mit einer Deletion von 414 bp im <i>sdaA</i> -Gen	diese Arbeit

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

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz/Herkunft
pGEM-T	Amp ^R ; Linearisierter Klonierungsvektor mit einem 3'-T-Überhang zur effizienten Klonierung von mit <i>Taq</i> -Polymerase amplifizierten PCR-Produkten mit einem 3'-A-Überhang	Promega, Madison, USA
pUC18	Amp ^R ; Klonierungsvektor	Norrander <i>et al.</i> , 1983
pET28a	Kan ^R ; Expressionsvektor mit T7 <i>lac</i> -Promotor zur Konstruktion von Fusions-Proteinen mit sechs N- oder sechs C-terminalen Histidin-Resten (<i>His</i> ₆ - <i>tag</i>)	Novagen, Madison, USA
pK18 <i>mob</i>	Kan ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> ; mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor zur Konstruktion von Integrationsmutanten	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>sacB</i> ; mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor zur Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994

Tab. 2(ff): In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz/Herkunft
pZ1	Kan ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> ; <i>E. coli-C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor	Menkel <i>et al.</i> , 1989
pJC1	Kan ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> ; <i>E. coli-C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pXMJ19	Cm ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> , <i>lacI^q</i> , <i>Ptac</i> ; <i>E. coli-C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor mit IPTG-induzierbarem <i>tac</i> -Promotor	Jakoby <i>et al.</i> , 1999
pVWEx1	Kan ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> , <i>lacI^q</i> , <i>Ptac</i> ; <i>E. coli-C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor mit IPTG-induzierbarem <i>tac</i> -Promotor	Wendisch, 1997
pGEM-T_ <i>pgm1</i> _{int}	Amp ^R ; pGEM-T mit einem 217 bp internen PCR-Fragment des <i>pgm1</i> -Gens	diese Arbeit
pGEM-T_ <i>pgm2</i> _{int}	Amp ^R ; pGEM-T mit einem 252 bp internen PCR-Fragment des <i>pgm2</i> -Gens	diese Arbeit
pGEM-T_ <i>pyk</i> _{int}	Amp ^R ; pGEM-T mit einem 398 bp internen PCR-Fragment des <i>pyk</i> -Gens	diese Arbeit
pGEM-T_ Δ <i>pyk</i>	Amp ^R ; pGEM-T mit einem 1,06 kb <i>cross over</i> -PCR Fragment	diese Arbeit
pGEM-T_ <i>mez</i> _PSA	Amp ^R ; pGEM-T mit einem 2,0 kb PCR-Fragment aus WT-PSA, welches das <i>mez</i> -Gen sowie 596 bp stromaufwärts des Start- und 227 bp stromabwärts des Stopcodons enthält	diese Arbeit
pGEM-T_ <i>sdaA</i> -P	Amp ^R ; pGEM-T mit einem 1,78 kb PCR-Fragment, welches das <i>sdaA</i> -Gen sowie 254 bp stromaufwärts des Start- und 142 bp stromabwärts des Stopcodons enthält	diese Arbeit
pUC18_ <i>mez</i>	Amp ^R ; pUC18 mit einem 1,25 kb PCR-Fragment, welches das <i>mez</i> -Gen sowie eine RBS enthält, kloniert in die <i>SmaI</i> -Schnittstelle nach einer Auffüllreaktion	diese Arbeit

Tab. 2(ff): In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz/Herkunft
pET28a_hisN_sdaA	Kan ^R ; pET28a-Derivat mit einem 1,36 kb PCR-Fragment, welches das <i>sdaA</i> -Gen enthält, in den <i>EcoRI</i> - und <i>XhoI</i> -Schnittstellen, zur Überproduktion von LSD mit acht N-terminalen Aminosäureresten (LEHHHHHH)	diese Arbeit
pK18mob_pgm1 _{int}	Kan ^R ; pK18mob mit einem 209 bp-Fragment aus pGEM-T_pgm1 _{int} , kloniert in die <i>EcoRI</i> - und <i>Sall</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pK18mob_pgm2 _{int}	Kan ^R ; pK18mob mit einem 252 bp-Fragment aus pGEM-T_pgm2 _{int} , kloniert in die <i>EcoRI</i> - und <i>PstI</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pK18mob_pyk _{int}	Kan ^R ; pK18mob mit einem 404 bp-Fragment aus pGEM-T_pyk _{int} , kloniert in die <i>EcoRI/Sall</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pK19mobsacB_Δpgm1	Kan ^R ; pK19mobsacB mit einem 1,22 kb <i>cross over</i> -PCR-Fragment, kloniert in die <i>XbaI/HindIII</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pK19mobsacB_Δpyk	Kan ^R ; pK19mobsacB mit einem 1,04 kb <i>cross over</i> -PCR-Fragment, kloniert in die <i>XbaI/PstI</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pK19mobsacB_ΔsdaA	Kan ^R ; pK19mobsacB mit einem 1,04 kb „ <i>crossover</i> “-PCR-Fragment, kloniert in die <i>SmaI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pVWEx1_sdaA-hisC	Kan ^R ; pVWEx1 mit 1,4 kb PCR-Fragment, welches <i>sdaA</i> mit einer C-terminalen für acht Aminosäuren kodierenden Sequenz (LEHHHHHH) und eine RBS enthält, kloniert in die <i>XbaI/PstI</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pVWEx1_sdaA-strepC	Kan ^R ; pVWEx1 mit 1,4 kb PCR-Fragment, welches <i>sdaA</i> mit einer C-terminalen für zehn Aminosäurereste kodierenden Sequenz (VEWSHPQFEK) und eine RBS enthält, kloniert in die <i>XbaI/PstI</i> -Schnittstellen	diese Arbeit

Tab. 2(ff): In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz/Herkunft
pXMJ19_fruRKA_PSR	Cm ^R ; pXMJ19 mit einem 4,08 kb PCR-Fragment aus WT-PSR, kloniert in die <i>EcoRI/XbaI</i> Schnittstellen	diese Arbeit
pXMJ19_mez	Cm ^R ; pXMJ19 mit einem 1,24 kb-Fragment aus pUC18_mez, kloniert in die <i>EcoRI/XbaI</i> -Schnittstellen	diese Arbeit
pXMJ19_sdaA	Cm ^R ; pXMJ19 mit 1,41 kb <i>sdaA</i> PCR-Fragment, kloniert in die <i>EcoRI/XbaI</i> Schnittstellen	diese Arbeit
pXMJ19_sdaA-hisN	Cm ^R ; pXMJ19 mit 1,56 kb Fragment aus pET28a_hisN_sdaA, kloniert in die <i>SmaI</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pZ1serA	Kan ^R ; pZ1-Derivat mit einem 1,59 kb Fragment, welches <i>serA</i> enthält	Peters-Wendisch, persönliche Mitteilung
pZ1serA Δ 197	Kan ^R ; pZ1-Derivat mit einem <i>serA</i> -Fragment, welches für ein um 197 Aminosäuren verkürztes Mutein von SerA kodiert	Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 2002
pEC-T18mob_serA*CB	Tet ^R ; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor mit einem Fragment, welches die Gene <i>serA*CB</i> enthält	Peters-Wendisch, persönliche Mitteilung
pJC1_sdaA-P	Kan ^R ; pJC mit einem 1,8 kb Fragment aus pGEM-T_sdaA-P, kloniert in die <i>XbaI/PstI</i> Schnittstellen	diese Arbeit
pK18mob_glyA'	Kan ^R ; pK18mob-Derivat mit einem 2,0 kb Fragment, welches ein 5'-terminales 437 bp Fragment von <i>glyA</i> , <i>lacI^R</i> und <i>Ptac</i> enthält	Simic <i>et al.</i> , 2002

3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die von MWG Biotech bezogen wurden und bei DNA-Sequenzierungen und Polymerasekettenreaktionen (PCR) eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung dargestellt. Die relevanten Merkmale der Primer sind unterstrichen (Restriktionsschnittstellen), fett (Sequenzen für einen His₆-tag bzw. Strep-tagII), kursiv (komplementäre Sequenzen in den „crossover“-PCR-Primern Δ...-2 und Δ...-3) bzw. grau hinterlegt (Sequenz für die Ribosomenbindestelle aus dem T7-Phagen, Gen 10) gedruckt.

Primer	Sequenz	Bemerkung
PCR-Primer		
pgm1_for	<u>AGTCGACCT</u> GCAAACATCGCACTGAAC	<i>Sall</i> -Schnittstelle
pgm1_rev	<u>AGAATTC</u> GAGTACTCTGCGTCATCCG	<i>EcoRI</i> -Schnittstelle
pgm2_for	<u>AGTCGACACCC</u> ACACTGAGGTGGATTC	<i>Sall</i> -Schnittstelle
pgm2_rev	<u>AGAATTC</u> ACTGATCATACGCCAGGTCC	<i>EcoRI</i> -Schnittstelle
pyk_for	<u>AGTCGACCGT</u> CATCTGTGAGGTTGTTG	<i>Sall</i> -Schnittstelle
pyk_rev	<u>AGAATTCT</u> AACTGGCTTTGCGTTCTCA	<i>EcoRI</i> -Schnittstelle
pgm1_int_for	CGTCACGGTCAGAGCGAATGGA	Kontrolle der <i>pgm1</i> -Integration
pgm2_int_for	CACGGGCAGACTGAATACAA	Kontrolle der <i>pgm2</i> -Integration
pyk_int_for	GCGAGGCGGCGGAGAAGACT	Kontrolle der <i>pyk</i> -Integration
Int-glyA_upper1	TGTGCGCGGTCGAAATCAAGGTA	Kontrolle der <i>glyA</i> -Integration
Int-glyA_lower1	TCATAGAAGGCGGCGGTGGAATC	
Int-glyA_upper2	CTCCGCCATCGCCGCTTCCACTT	
Int-glyA_lower2	TTAAAACGCGCATGACATCCTCTGACAA	
Δpgm1_1	<u>GCTCTAG</u> AATCTGCGCGTCATTATTTGTG GCGG	<i>XbaI</i> -Schnittstelle
Δpgm1_2	CCCATCCACTAAACTTAAACAGATTGACG TCGACCCATCCAGTGAAC	
Δpgm1_3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCGAAACCG TCCTCATCGCAGCACAC	
Δpgm1_4	CCCAAGCTT TGGGTGGACGTCGAGTGAG TG GTTTTCT	<i>HindIII</i> -Schnittstelle
Δpyk_1	<u>GCTCTAG</u> AGGCATCCGAATCAACACCATC GTC	<i>XbaI</i> -Schnittstelle
Δpyk_2	CCCATCCACTAAACTTAAACACAACATCC ATGCCGTCTTCTACCAA	
Δpyk_3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCGAGCCACC TGCCACTGCTCGTG	
Δpyk_4	AACTGCAGCCGACGCGAAGGCTAACTGC ATC	<i>PstI</i> -Schnittstelle
ΔsdaA_1	TCGTGCAACTTCAGACTC	

Tab. 3(ff): Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Primer	Sequenz	Bemerkung
Δ sdaA_2	CCCATCCACTAAACTTAAACACGTCATAAT GAACCCACC	
Δ sdaA_3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCCGACTAA TGGTGCTGCG	
Δ sdaA_4	CGGGAAGCCCAAGGTGGT	
Δ pgm1_K_rv	CGTTTTCGGATTCGTCGGAGGCATAGAT	Kontrolle von Δ pgm1
cgtS4_EcoRI_rv	GGTGAATTCAGTTCGTTGATCATGTCGG C	
Δ pgm1_K_for	GCAGGTGCTGATCAAGGCGGTTGC	
Δ pyk_K_rev	TTCGAGGGCGGTCAACATAGAGC	Kontrolle von Δ pyk
Δ pyk_for	TCTTCGCTTTGTTGATGTGGGCTGAC	
Δ pyk_for2	GCAAGATTCATCGAGAATTAATGGTAG	
Δ pyk_rev2	GCATCTGCTGGGGAACGTACGAAGGACA	
Δ pyk_rev3	GCCACGAAAAATGCGCTGACACC	
Δ pyk_rev4	CCGTGTCAAGTAAATTCTTAAATGAGG	
Δ pyk_for3	GGGCTTTGGAAATCTACTATCGGGTAGA	
Δ pyk_rev5	GCGAACGAGAGGGGTGCCATTGCGA	
Δ pyk_rev6	GGCAGCCAAGCTCTCTTGGGTATCGA	
Δ sdaA_5	CAAGTGTGAATCCTGAAAGC	Kontrolle von Δ sdaA
Δ sdaA_6	ATCTCGTCGCAAAGCAACC	
2019_for	GCTCTAGAAAGGAGATATAGATATGACTG AGGCCACATCATG	<i>Xba</i> I; Amplifizierung der Gene <i>orf2019-2021</i>
2021_rev	GCGAATTCAGACATCGGGTCAAGGTCC G	<i>Eco</i> RI-Schnittstelle
1888_for	GCTCTAGAAAGGAGATATAGATATGACCA TCGACCTGCAGCG	<i>Xba</i> I; Amplifizierung des <i>mez</i> - Gens
1888_rev	GCGAATTCATTGGCGCCTCGACGGG	<i>Eco</i> RI-Schnittstelle
mez+_for	CCACTTTGTTTGTGATTGCTG	Amplifizierung des <i>mez</i> -Gens
mez+_rev	CGCATGCGAATATCTACCAC	sowie 596 bp stromaufwärts des Start- und 227 bp stromabwärts des Stopcodons
sdaA_for_his2	CCGGAATTCATGGCTATCAGTGTGTTGTA TC	<i>Eco</i> RI, <i>sdaA</i> in pET28a
sdaA_rev_his2	GGCCTCGAGACACTCCGTCATCGACACC	<i>Xho</i> I-Schnittstelle
sdaA_for	GCTCTAGAAAGGAGATATAGATATGGCTA TCAGTGTGTTGAT	<i>Xba</i> I-RBS-Linker; <i>sdaA</i> in pXMJ19
sdaA_rev	GCGAATTCGCCAAGCAAGACAAAATCCAA GCC	<i>Eco</i> RI-Schnittstelle
sdaA_P_for	GCTCTAGAAAGGAGATATAGATAAGTGGG ACAAGTGTGAATC	<i>Xba</i> I-RBS-Linker; <i>sdaA</i> in pJC1; <i>Eco</i> RI-Schnittstelle
sdaA_P_rev	GCGAATTCGTTATGTGCAACCGGCTGCC GTG	
sdaA_tag_for	GCCTGCAGAAGGAGATATAGATATGGCTA TCAGTGTGTTGATC	<i>Pst</i> I-RBS-Linker; <i>sdaA</i> in pVWEx1

Tab. 3(ff): Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Primer	Sequenz	Bemerkung
sdaA-hisC_rev	CGTCTAGACTAGTGGTGGTGGTGGTGGT GACTCTCCGTCATCGACAC	<i>Xba</i> I-Stop-His ₆ ; Herstellung einer His-Fusion am C-Terminus von <i>sdaA</i> ; in pVWEx1 kloniert
sdaA_tag_for	GCCTGCAGAAGGAGATATAGATATGGCTA TCAGTGTGTTGATC	<i>Pst</i> I-RBS-Linker; <i>sdaA</i> in pVWEx1
sdaA_strepC_rev	CGTCTAGACTATTTTTCGAACTGCGGGTG GCTCCAAGCGCTACACTCCGTCATCGACA C	<i>Xba</i> I-Stop-Strep-tagII; Herstellung einer StrepII-Fusion am C-Terminus von <i>sdaA</i> ; in pVWEx1 kloniert
RSP	CACAGGAAACAGCTATGACCATG	reverse Universal-M13-Primer
USP	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	forward Universal-M13-Primer
Sequenzierprimer		
Uni_for	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Sequenzierung von pGEM-T- und pK19 <i>mobsacB</i> -Derivaten
Uni_rev	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	
pXMJ19_for	GTATAATGTGTGGAATTGTG	Sequenzierung von pXMJ19- und pVWEx1-Derivaten
pXMJ19_rev	ATTTAATCTGTATCAGGCTG	
P_t7_for	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung von pET28a_ <i>sdaA</i> -his2
P_t7_rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
810-265-R1	TCCGCGACATGCGCGATC	Sequenzierung von pGEM-T- <i>mez</i>
810-265-F1	GCCCACAGAATTGCTTCTG	
810-265-F2	ACACCCCTGACCTTTATTGC	
810-265-F3	AGGGATAGCCTTCAGGCCAG	
810-265-F4	CTGAGACAGCTCAGGATCG	
810265-F5	CACAAGACGCAGAAATTCTG	

4. Nährmedien

E. coli-Stämme wurden in Luria-Bertani-Medium (LB) kultiviert (Sambrook, 1989). Zur Regeneration der Zellen nach Transformation wurde SOC-Komplexmedium eingesetzt (Miller und Nickoloff, 1995). Die Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen in Vollmedium erfolgte im allgemeinen in *Brain-Heart-Infusion*-Medium (BHI, Difco Laboratories, Detroit, USA). Als Minimalmedium wurde CGXII-Medium genutzt (Keilhauer *et al.*, 1993), wobei je nach Fragestellung Glucose, Ribose, Maltose, Lactat, Pyruvat bzw. Acetat in Konzentrationen von 6-200 mM zugesetzt wurde. Nach Elektroporation wurden die Zellen in BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M

Sorbitol) regeneriert und auf LBHIS (18,5 g/l BHI, 18,5 g/l LB, 91 g/l Sorbitol)- oder BHIS (37 g/l BHI, 15 g/l Agar, 91 g/l Sorbitol)-Platten ausgestrichen. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 1,5 % (w/v) Agar (Difco) zugesetzt.

4.1 Medienzusätze

Zur Selektion und zur Haltung von Stämmen, die Plasmide enthalten, wurden die in Tabelle 4 angegebenen Antibiotikakonzentrationen eingesetzt. Nalidixinsäure wurde verwendet, um nach Konjugationsexperimenten das Wachstum von *E. coli* zu unterdrücken. Bei Vorliegen einer Ampicillin-Resistenz wurde das strukturverwandte Carbenicillin eingesetzt, was zu einer verringerten Bildung von Satellitenkolonien führte.

Tab. 4: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen sowie deren Stammlösungen.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>		Stammlösung
	Selektion und Haltung	Selektion	Haltung	
Carbenicillin	50 µg/ml	-	-	50 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	30 µg/ml	-	-	30 mg/ml in 50 % Ethanol
Kanamycin	50 µg/ml	15 µg/ml	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol	30 µg/ml	4 µg/ml	10 µg/ml	10 mg/ml in 70 % Ethanol

5. Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37°C. *C. glutamicum* wurde bei 30°C kultiviert und zur Herstellung kompetenter Zellen nach van der Rest *et al.* (1999) bei 18°C. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Das Nährmediumvolumen betrug 50 ml und die Schüttelgeschwindigkeit 120 Upm. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300 pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt, wobei die Kulturen so mit 0,9 % NaCl verdünnt wurden, dass die

gemessenen OD_{600} -Werte nie größer als 0,5 waren. Die im Verlauf von Kultivierungen gebildete Zelldichte ist als Differenz zwischen der maximal erreichten OD_{600} und der Anfangs- OD_{600} als ΔOD_{600} angegeben.

5.1 Stammhaltung von Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden die Stämme in Reagenzgläsern mit 5 ml Komplexmedium für 8-14 h bei 170 Upm kultiviert. Anschließend wurden 2 ml dieser Kultur abzentrifugiert (10 min, 5500 g, 4°C) und die Zellen in 1 ml BHI-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 800 µl sterilem Glycerin (87 %) wurde die Probe in sterile 2 ml-Cryo-Röhrchen überführt und bei -70°C gelagert. Für jeden Stamm wurden zwei parallele Dauerkulturen angelegt.

5.2 Kultivierung von *E. coli* zur Überexpression von Genen

50 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum wurden aus einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes angeimpft, der das gewünschte Expressionsplasmid trug. Bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,8 wurden die Kulturen bei 37°C und 120 Upm inkubiert. Die Expression des Zielgens wurde, sofern nicht anders angegeben, durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid) induziert. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C für 3 h weiter inkubiert. Vor Induktion sowie 1, 2 und 3 h danach wurde die OD_{600} bestimmt, je 1 ml-Probe entnommen und für 5 min bei 5500 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in $(OD_{600} \times 100) \mu\text{l}$ 1 \times LDS-Probenpuffer (Invitrogen, Groningen) aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -4°C gelagert.

5.3 Kultivierung von *C. glutamicum* zur Überexpression von Genen

50 ml BHI-Medium wurden mit dem *C. glutamicum*-Stamm beimpft, der das gewünschte Expressionsplasmid trug. Die Kultur wurde nach 8 h geerntet (5500 g, 10 min, 4°C) und zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen. Anschließend wurden 50 ml CGXII-Medium mit 200 mM Glucose auf eine OD_{600} von 0,5 angeimpft, 12 h kultiviert, geerntet (5500 g, 10 min, 4°C) und einmal in 0,9 % NaCl gewaschen. Zur Expression

des Zielgens wurden 50 ml CGXII-Medium mit 200 mM Glucose und 1 mM IPTG auf eine OD₆₀₀ von 2 angeimpft. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ zwischen 8 und 12 kultiviert, nachfolgend geerntet (5500 g, 10 min, 4°C), die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

6. Molekularbiologische Methoden

6.1 Isolierung von DNA

6.1.1 Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Plasmide wurden ausgehend von 5 ml Übernacht-Kultur oder ausgehend von 50 ml Übernacht-Kultur mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* oder dem *QIAfilter™ Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde ebenfalls mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* oder dem *QIAfilter Plasmid Midi Kit* präpariert. Aufgrund des im Vergleich zu *E. coli* dickeren Mureinsacculus ging jeweils eine 1-2-stündige Behandlung mit 15 µg/ml Lysozym bei 37°C voraus.

6.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte nach Eikmanns *et al.* (1994). Zur Ethanolfällung wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen Ethanol gemischt. Die präzipitierte DNA wurde durch 30 min Zentrifugation bei 15000 g und 4°C sedimentiert, mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 mM EDTA) gelöst.

6.1.3 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Extinktionsmessung einer wässrigen Nukleinsäurelösung erfolgte in einer 100 µl Mikroküvette aus Quarzglas, dabei wurden folgende Umrechnungsfaktoren verwendet (Sambrook, 1989):

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

Oligonukleotide: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 33 µg/ml.

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

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

6.2 Rekombinante DNA-Techniken

6.2.1 Restriktion

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Produktinformationen für die einzelnen Enzyme (Roche Diagnostics). Die notwendigen Pufferbedingungen wurden durch Zusatz von 1/10 Volumenanteilen 10-fach konzentriertem Restriktionspuffer eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der erforderlichen Menge an Enzym gestartet. Es wurden Ansätze mit einem Volumen von insgesamt 25 µl (analytische Restriktion) oder 50-100 µl (präparative Restriktion) und 10-30 U Enzym hergestellt. Die Reaktionsansätze wurden mindestens 2 h bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mit 1/5 Volumenanteilen Gel-Ladepuffer (Promega, Mannheim) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

6.2.2 5'-Dephosphorylierung gespaltener Plasmid-DNA

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 (Sambrook, 1989). 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 30-45 min bei 37°C inkubiert.

6.2.3 Auffüllreaktion mit Hilfe der „Klenow-Polymerase“

Um überhängende 5'-Enden eines DNA-Fragments aufzufüllen, wurde zu einem bereits mit einem Restriktionsenzym verdauten 20 µl-Ansatz 2 µl Klenow-Polymerase (2 U/µl) und 1 µl dNTP-Mix (Endkonzentration von dATP, dGTP, dCTP und dTTP im Ansatz betrug je 0,5 mM) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert (Sambrook, 1989). Da die Anwesenheit von Enzymen und Puffersubstanzen weitere Arbeiten beeinträchtigen kann, wurde die DNA nach Behandlung mit Restriktionsenzymen aus den Reaktionsansätzen mit dem *MinElute Reaction Clean up-Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

6.2.4 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 nach Sambrook, (1989) bei 16°C im Wasserbad über Nacht eingesetzt. Darüber hinaus wurden Ligationen bei Raumtemperatur mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt, wobei die Ligationszeit auf 30 min verlängert wurde. Die verwendete Vektor-DNA wurde in einem Mengenverhältnis von 1:2 bis 1:4 (Vektor : Insert) mit Insert-DNA gemischt, nachdem die DNA-Mengen beider Fragmente nach einer Gelelektrophorese anhand eines DNA-Standards abgeschätzt worden waren.

6.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

6.2.5.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook (1989), wobei Ultra-Pure Agarosepulver (GibcoBRL)

verwendet wurde. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumenanteilen Gelladepuffer (Promega, Mannheim) versetzt aufgetragen. Zur Elektrophorese wurden Spannungen zwischen 17 und 100 Volt eingestellt. Als Standard dienten die DNA-Molekulargewichtsmarker 1 kb-DNA-Standard und 100 bp-DNA-Standard (Promega, Mannheim). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele durch 10-minütige Inkubation in einer Lösung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (0,5 mg/l) gefärbt, zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz 20 min in H₂O inkubiert und unter UV-Licht mit einem *ImageMaster*[®]VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) photographiert.

6.2.5.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Reinheit isolierter RNA wurde durch Elektrophorese in Formaldehyd-Agarosegelen untersucht. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook (1989). Dazu wurde eine Agaroselösung aus 0,25 g Agarose, 5 ml 5 × MOPS, 15,75 ml DEPC-H₂O aufgekocht, anschließend 4,25 ml Formaldehyd zugegeben und nach Abkühlen auf etwa 60°C in eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Die RNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5 x Ladepuffer (50 % Formamid, 20 % Formaldehyd, 20 % 5 × MOPS, 10 % Farbstoff, 0,7 % Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)) versetzt, 10 min bei 95°C und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS (40 mM MOPS, 10 mM Essigsäure, 2 mM EDTA in DEPC-Wasser gelöst, pH 7). Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mit einem *Image Master*[®]VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) photographiert.

6.3 Transformationstechniken

6.3.1 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der RbCl₂-Methode (Hanahan, 1985). Zur Transformation wurde ein Aliquot von 50 µl kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA oder 20 µl eines Ligationsansatzes versetzt, vorsichtig gemischt und 30-45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 90 s bei 42°C im Wasserbad zur Induktion der Aufnahme der DNA in die

Zellen inkubiert. Die Zellen wurden danach 2 min auf Eis abgekühlt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert, um den Bakterien die Möglichkeit zur Expression der Antibiotika-Resistenz-Gene zu geben. Volumina von 100-300 µl wurden auf selektive LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.3.2 Transformation von *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen von *C. glutamicum* erfolgte nach einem Protokoll von van der Rest *et al.* (1999). Dabei wurden 50 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und 16 h bei 30°C inkubiert. 100 ml Epo-Medium (LB-Medium, 4 g/l Isoniazid, 25 g/l Glycin, 1 % (v/v) Tween 80; (Schäfer *et al.*, 1994) wurden mit dieser Vorkultur inokuliert, so dass die Kultur eine Start-OD₆₀₀ von 0,3 besaß. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 (ca. 24-28 h) wurde die Kultur bei 18°C und 120 Upm inkubiert, anschließend 10 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (10 min, 4200 g, 4°C). Es folgten vier Waschschrte mit 50 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin, danach wurden die Zellen in 0,5 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und je 100 µl in eiskalte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert. Zur Herstellung kompetenter Zellen des Stammes 13032Δ*pgm1* wurde die Kultivierung in BHI-Medium statt LB-Medium durchgeführt. Zur Durchführung der Elektroporation wurde ein 100 µl-Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl DNA gemischt (100-250 ng DNA für Plasmidtransformation; 1-2 µg DNA für eine chromosomale Integration) und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden anschließend mittels einem *Gene Pulser*TM (Biorad, München) einem Strompuls ausgesetzt, wobei folgende Parameter eingestellt wurden: Spannung, 2,5 kV; Kapazität, 25 µF; Widerstand, 600 Ω (Liebl *et al.*, 1989). Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml BHIS-Medium zugegeben und der Ansatz in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 6 min bei 46°C, danach wurden die Zellen zur Regeneration unter leichtem Schütteln 90 min bei 30°C in 1 ml BHIS-Medium inkubiert und auf selektive LBHIS- oder BHIS-Platten ausplattiert.

6.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona, 1987) sowie zur Kontrolle von Insertions- und Deletionsmutanten eingesetzt. Dazu wurden jeweils zwei, den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierende Oligonukleotide eingesetzt, die bei MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen wurden. Die Anlagerungstemperatur der PCR-Primer lag zwischen 55-75°C. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Biozym Diagnostics (Oldendorf) durch mindestens 30 sich wiederholende Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 94°C, Anlagerung der Oligonukleotide (*annealing*) bei 50-64°C und DNA-Kettenverlängerung (*elongation*) mittels thermostabiler *Taq*-DNA-Polymerase bei 72°C (Tindall und Kunkel, 1988). Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungen verwendet wurden, erfolgte mit dem *Expand High Fidelity Kit* (Roche), der ein Gemisch aus *Taq*-Polymerase und der fehlerkorrigierenden *Pwo*-Polymerase (Barnes, 1994) enthält. Die optimale Anlagerungstemperatur (T_a) für die PCR wurde entweder vom Hersteller der Oligonukleotide angegeben oder aus der Basenzusammensetzung berechnet (Sambrook, 1989), wobei nur der Bereich des Oligonukleotides berücksichtigt wurde, der bereits im ersten Zyklus an die DNA-Matrize anlagert ($T_a = (4 \times [G+C] + 2 \times [A+T]) - 4$). Die Elongationszeit wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert, wobei routinemäßig 1 min pro 1000 Basen berechnet wurde. Als DNA-Matrize wurde chromosomale DNA sowie Plasmid-DNA eingesetzt, aber auch DNA aus aufgeschlossenen Zellen. Dabei wurde eine Kolonie in 50 µl Wasser mittels Vortex (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Inkubation für 10 Minuten bei 95°C. Anschließend wurden 5 µl dieser Suspension als DNA-Matrize zur PCR eingesetzt. Aliquots der PCR-Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten nach Gelelektrophorese wurde das *QIAEX II Gel Extraction-Kit* (Qiagen, Hilden) genutzt. Alternativ wurden die DNA-Fragmente direkt mit dem *QIAquick PCR Purification-Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt, wenn in der Gelkontrolle keine unspezifischen Nebenprodukte nachweisbar waren.

6.5 Konstruktion von Deletions- und Insertionsmutanten

Deletionsmutanten von *C. glutamicum* wurden durch eine Kombination von „crossover“-PCR (Link *et al.*, 1997) mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) konstruiert. Für die „crossover“-PCR wurden zunächst zwei etwa 500 bp große PCR-Produkte hergestellt, die den 5'-flankierenden und 3'-flankierenden Bereich des zu deletierenden Genbereiches umfassten. Die äußeren Primer ($\Delta\dots-1$ und $\Delta\dots-4$; Tab. 3) enthielten eine Restriktionsschnittstelle, die für die Klonierung in pK19*mobsacB* genutzt wurde. Die inneren Primer ($\Delta\dots-2$ und $\Delta\dots-3$; Tab. 3) enthielten eine 21 bp lange komplementäre Sequenz an ihrem 5'-Ende. Die beiden PCR-Produkte wurden gereinigt und in einer anschließenden „crossover“-PCR mit den äußeren Primern als Matrize eingesetzt. Dabei konnten die beiden Fragmente über die 21 bp-Sequenzen miteinander hybridisieren und verlängert werden, so dass ein Fusionsprodukt mit der gewünschten Deletion entstand. Das Fusionsprodukt wurde restrigiert und über die terminalen Schnittstellen in den entsprechend restrigierten pK19*mobsacB*-Vektor kloniert. Dieser Vektor ist mobilisierbar (enthält einen „origin of transfer“, *oriT*) und kann in *C. glutamicum* nicht replizieren (Schäfer *et al.*, 1994). Die durch PCR erhaltenen Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft, fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation in *C. glutamicum* eingebracht und auf Kanamycin-Resistenz selektioniert. Da pK19*mobsacB* und seine Derivate nicht in *C. glutamicum* repliziert werden, sollte in Kanamycin-resistenten Klonen das Plasmid über homologe Rekombination im Bereich des Deletionskonstruktes in das Chromosom integriert worden sein. Um auf ein zweites Rekombinationsereignis zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone für 12 h in BHI-Medium kultiviert und auf BHIS-Platten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert.

Das *sacB*-Gen kodiert für das Exoenzym Levansucrase, welches Saccharose in Glucose und das Fructose-Polymer Levan umsetzt (Bramucci und Nagarajan, 1996). Dieses Polymer verhindert das Wachstum vieler gram-negativer und gram-positiver Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder *C. glutamicum*. Deshalb sollte bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein zweites Rekombinationsereignis aus dem Chromosom entfernt worden sein, wobei entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt wird. Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden mittels PCR-Analysen unter Verwendung von außerhalb des Deletionskonstruktes liegenden Primern (Tab. 3) überprüft.

Integrationsmutanten wurden erzeugt, indem ein internes Fragment des zu unterbrechenden Genes in den Vektor pK18*mob* kloniert wurde. Auch dieser Vektor ist in *C. glutamicum* nicht replizierbar. Nach Einbringen des Plasmids in *C. glutamicum* durch Elektroporation konnten durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz Insertionsstämme isoliert werden.

6.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

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

Zum Bearbeiten der erhaltenen Sequenzen, Erstellen von Vektorkarten sowie zur Analyse von offenen Leserahmen wurde das Programm *Clone Manager* für Windows (Version 5.02, Scientific & Educational Software) genutzt. Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Homologien zu den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen erfolgten mit Hilfe der Programme *BLASTX*, *BLASTN* und *BLASTP* (Altschul *et al.*, 1997) und den am National Center for Biotechnology Information (NCBI, Washington, USA) zur Verfügung stehenden Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Zur weiteren Untersuchung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde das Programmpaket *DNA-STAR* für Windows (Lasergene, Madison, USA) verwendet. Zum Vergleich mehrerer Proteinsequenzen wurden Sequenzalignments mit einem Programm des Baylor College of Medicine (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) erstellt und unter Zuhilfenahme des *BOXSHADE*-Programms von K. Hoffmann und M.D. Baron identische und ähnliche Aminosäuren farblich markiert. Um anhand von Genomsequenzen zu ermitteln, welche Stoffwechselwege in bestimmten Bakterien möglich sind, wurde die Datenbank *KEGG, Metabolic pathways* verwendet (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Eine weitere Datenbank, die zur Untersuchung von DNA- und Proteinsequenzen sowie von Funktionen von Proteinen und Stoffwechselwegen eingesetzt wurde, war die *ERGO database* von Integrated Genomics (<http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO/>).

7. Biochemische Methoden

7.1 Messung von Enzymaktivitäten

7.1.1 Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung

Für die Enzymtests zur Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität und der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität wurden *C. glutamicum*-Zellen aus 50-70 ml CGXII-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet (10 min, 5200 g, 4°C). Zur Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität wurden sowohl *C. glutamicum*-Stämme in 50 ml CGXII-Medium kultiviert und in unterschiedlichen Wachstumsphasen geerntet, als auch *E. coli*-Stämme in 50 ml LB-Medium kultiviert und in der frühen stationären Phase geerntet (10 min, 5200 g, 4°C). Die Zellen wurden anschließend jeweils einmal mit dem im Enzymtest eingesetzten Puffer gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert, so dass das Endvolumen 1-2 ml betrug. Zur Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität wurden dieser Zellsuspension zur Stabilisierung 3 mM FeSO₄, 10 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend in ein vorgekühltes 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität wurde die Zellsuspension zur Stabilisierung der Serinhydroxymethyltransferase zusätzlich mit Pyridoxalphosphat (PLP, Endkonzentration 20 µM) und Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration 1 mM) versetzt und zum Zellaufschluss in vorgekühlte 10 ml-Glashörnchen überführt.

Der Zellaufschluss wurde im Eisbad mittels eines Ultraschalldesintegrators (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA) durchgeführt. Die Parameter für Aufschlüsse in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden wie folgt eingestellt: Beschallintensität 2,5, Pulslänge 20 %, Beschalldauer 10 min für *C. glutamicum*-Suspensionen und 5 min für *E. coli*-Suspensionen. Für Aufschlüsse von *C. glutamicum*-Suspensionen in 10 ml-Glashörnchen wurde eine Pulslänge von 100 % und eine Beschalldauer von 6 min gewählt. Im Anschluss an die Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 14000 g, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde als zellfreier Rohextrakt direkt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten eingesetzt.

7.1.2 Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität

Die Pyruvatkinase katalysiert die nachfolgend dargestellte Reaktion:



Die Aktivität wurde mit einem modifizierten Test nach Bergmeyer (1983) und Peters-Wendisch (1992) bestimmt. Der Testansatz enthielt in 1 ml 100 mM Tris/HCl (pH 7,0), 15 mM MgCl₂, 1 mM ADP, 0,25 mM NADH, 5,5 U Lactatdehydrogenase, 12 mM PEP und 10 µl Rohextrakt. Das durch die Pyruvatkinase gebildete Pyruvat wird durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert. Hierbei wird NADH zu NAD⁺ umgesetzt, was durch Abnahme der Extinktion bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) spektrophotometrisch (Ultrospec 3300 pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt wurde. Der Test wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

7.1.3 Bestimmung der Malat-Enzym-Aktivität

Das Malat-Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Die Aktivität wurde von M. Krause (AG Wendisch, IBT-1, Forschungszentrum Jülich) mit einem Test nach Gourdon *et al.* (2000) bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8), 5 mM MgCl₂, 0,6 mM NADP⁺ und 40 mM D,L-Di-Natrium-Malat. Die bei der Reaktion stattfindende Reduktion von NADP⁺ zu NADPH wurde spektrophotometrisch (Shimadzu UV-1601PC spectrophotometer) anhand der Zunahme der Extinktion bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) gemessen. Der Test wurde bei 30°C durchgeführt.

7.1.4 Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität

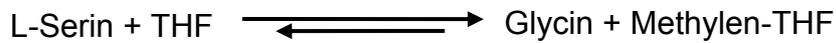
Die L-Serindehydratase katalysiert die Desaminierung von L-Serin zu Pyruvat und Ammoniak:



Zur Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität wurde das in der Reaktion gebildete Pyruvat mittels *reversed phase* HPLC bestimmt. Dabei wurde das Pyruvat mit dem aromatischen Diamin 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzol (DDB) zu einer fluoreszierenden Verbindung (2-Hydroxy-6,7-dimethoxy-3-methylquinoxalin) derivatisiert und anschließend mittels HPLC über einen Fluoreszenzdetektor detektiert (Ohmori *et al.*, 1991). Diese Methode ist sehr empfindlich und hochselektiv für die Bestimmung von α -Ketosäuren. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES-Puffer (pH 8,0, 10 % Glycerin), 10 mM DTT, 1-500 mM L-Serin und 10-100 μ l Rohextrakt. Die Reaktion wurde durch L-Serin-Zugabe gestartet und durch Mischen mit DDB-Reagenz im Verhältnis 1:1 abgestoppt. Das DDB-Reagenz enthielt 4 mg 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzol (Dojindo, Dojindo Laboratories, Japan) in 50 ml 0,5 M HCl, 0,21 M β -Mercaptoethanol. Anschließend erfolgte die Derivatisierung durch Inkubation für 2 h bei 102°C. Die Proben konnten im Anschluss bis zu 12 Tagen bei Raumtemperatur oder bis zu 90 Tagen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Die Quantifizierung des gebildeten Pyruvat erfolgte durch *reversed phase* HPLC unter isokratischen Bedingungen bei einer Flussrate von 1 ml/min, wobei als mobile Phase ein Acetonitril/Methanol/40 mM KH_2PO_4 -Puffer, pH 7,0 (40/65/95, v/v/v; Keen *et al.*, 1993) verwendet wurde. Die Detektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 362 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Zur säulenchromatographischen Auftrennung, Detektion und Auswertung wurde das unter Kapitel III8.1. beschriebene HPLC-Gerät verwendet. Eine Enzymaktivität von 1 Unit ist definiert als 1 μ mol gebildetes Pyruvat \times min⁻¹.

7.1.5 Bestimmung der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität

Die Serinhydroxymethyltransferase katalysiert die folgende Reaktion:



Die Bestimmung der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität erfolgte durch M. Stolz (AG Eggeling, IBT-1, Forschungszentrum Jülich) nach Simic *et al.* (2002), wobei das in der Reaktion gebildete Glycin mittels *reversed phase* HPLC quantifiziert (Kap. III8.1) wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 60 mM HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,0), 0,2 mM PLP, 0,9 mM THF (in 0,1%-iger (w/v) DTT-Lösung), 20 mM L-Serin und 200 µl Rohextrakt. Die Reaktion wurde nach 5-minütiger Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe des Substrats (vorgewärmt auf 37°C) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde 2 min inkubiert, da eine lineare Zunahme der Glycinbildung nur über diesen Zeitraum messbar ist (Kap. IV2.1). Jeweils 500 µl des Reaktionsansatzes wurden daher nach 0 und 2 min durch Zugabe von 125 µl 25%iger (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Durch Inkubation auf Eis für 15 min und nachfolgender Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) wurden die in der Lösung befindlichen Proteine abgetrennt. 480 µl des Überstandes wurden mit 40 µl Neutralisierungspuffer (31,8 g K₂CO₃ in 100 ml Tris/HCl (20 mM, pH 8,0)) neutralisiert. In dieser Lösung wurde Glycin durch *reversed phase* HPLC quantifiziert. Zur Kontrolle wurde der Enzymtest parallel ohne Zugabe von Rohextrakt durchgeführt.

7.2 Proteinreinigung

7.2.1 Zellaufschluss mit einer French-Press

Für den Aufschluss von *C. glutamicum*-Zellen wurden diese in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (10 min, 5200 g, 4°C) geerntet, einmal mit HEPES-Puffer (HEPES 50 mM, pH 8,0, 10 % Glycerin) gewaschen, in 4 ml Aufschlusspuffer (HEPES 50 mM, pH 8,0, 10 % Glycerin, 10 mg/ml Lysozym/g Feuchtwicht) resuspendiert und 45 min bei 37°C und 120 Upm inkubiert. Bei der Aufreinigung der L-Serindehydratase mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie enthielt der Aufschlusspuffer zusätzlich 3 mM FeSO₄ und 10 mM DTT. Anschließend wurden der Zellsuspension eine Spatelspitze DNase I und ein Protease-Inhibitor-

Cocktail (*Complete Mini EDTA-free*, Roche Diagnostics, Mannheim) in der vom Hersteller angegebenen Konzentration zugegeben. Der Aufschluss erfolgte in einer auf 4°C vorgekühlten French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments) bei 207 MPa. Die Effizienz des Aufschlusses nach 5 Passagen wurde mikroskopisch kontrolliert. Zur Aufreinigung der L-Serindehydratase mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde die Suspension nach Zugabe von 50 µg/ml Avidin (aus Hühnereiweiß, Sigma) 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 15000 g, 4°C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (90 min, 40000 g, 4°C), die zur Abtrennung der Membranfraktion führte. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Überstand auf Eis gelagert.

7.2.2 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von L-Serindehydratase-Fusionsproteinen, die einen N- oder C-terminalen Hexa-Histidin-„tag“ enthielten, erfolgte über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Porath *et al.*, 1975). Hierbei bilden die sechs Histidinreste des Fusionsproteins eine Chelatbindung mit Nickelkationen aus, welche über Nitriltriessigsäure an eine Sepharosematrix gebunden sind.

Zur Aufreinigung der L-Serindehydratase (LSD) mit C-terminalem His₆-tag nach homologer Expression unter nativen Bedingungen wurde der Ultrazentrifugationsüberstand auf eine mit 25 ml TNI5-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule (Qiagen, Hilden) mit einem Bettvolumen von 2 ml gegeben. Die Zahl im TNI-Puffer gibt die Imidazolkonzentration in mM an. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 ml TNI5- und 10 ml TNI30-Puffer entfernt. Spezifisch gebundene Proteine sollten mit den Puffern TNI100 bzw. TNI200 eluiert werden. Proteine, die dann immer noch an die Ni²⁺-Ionen gebunden sind, sollten durch Waschen mit 10 ml TNI400 entfernt werden. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 10 µl des Eluats mit jeweils 250 µl *Coomassie-Plus-Protein-Assay-Reagenz* (Pierce) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung zeigte an, ob die Fraktion Protein enthielt. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

Die Aufreinigung der L-Serindehydratase mit N-terminalem His₆-tag nach heterologer Expression unter denaturierenden Bedingungen wurde mit Hilfe des *Ni*²⁺-NTA-Spin-Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

7.2.3 StrepTactin-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der L-Serindehydratase mit einem C-terminalen Strep-tagII (Sequenz: WSHHPQFEK) wurde Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose eingesetzt (Skerra und Schmidt, 2000). Dazu wurde der Ultrazentrifugationsüberstand mit 4 ml in HEPES-Puffer (50 mM, pH 8,0, 10 % Glycerin) äquibrierter StrepTactin-Sepharose (IBA, Göttingen) für 45 min bei 4°C gerührt. Die Suspension wurde anschließend auf eine 15 ml Polypropylen-Säule aufgetragen und mit einer Fritte bedeckt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 8 x 1 ml Puffer W (50 mM HEPES, pH 8,0, 10% Glycerin, 100 mM NaCl, 10 mM DTT) entfernt, spezifisch gebundene Proteine wurden mit 8 x 1 ml Puffer E (Puffer W, 5 mM Biotin) eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 10 µl des Eluats mit jeweils 250 µl *Coomassie-Plus*-Protein-Assay-Reagenz (Pierce) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung zeigte an, ob die Fraktion Protein enthielt oder nicht. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

7.2.4 Rekonstitution

Zur Rekonstitution der His-„getaggten“ L-Serindehydratase wurden 1,5 ml der Proteinlösung mit aufgereinigtem, denaturiertem Protein in einem Dialyse-Schlauch aus Cellulose (cut off 10.000) gegen 3 x 600 ml Renaturierungspuffer-Puffer (50 mM HEPES, pH 8,0; 10 % Glycerin; 10 mM DTT; 1 mM FeSO₄; 4 Tabletten/l Protease-Inhibitor, Roche) bei 4°C für 18 h dialysiert.

7.3 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford mit dem *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, München) bestimmt (Bradford, 1976). Das Prinzip beruht auf der Bindung des Säurefarbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G250* an aromatische und basische Aminosäurereste, insbesondere Arginin. Durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein kommt es zu einer Stabilisierung des Farbstoffes in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form, was im sauren Milieu zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm führt. 200 µl der Bio-Rad Stammlösung wurden mit 800 µl einer verdünnten Proteinlösung versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Messungen erfolgten in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300 pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels des *NuPAGE*[®]-Systems (Invitrogen, Groningen) analysiert. Die Auftrennung erfolgte in 10 %igen Bis-Tris Polyacrylamidgelen, wobei zur Probenvorbereitung ein vom Hersteller mitgelieferter Lithium-Dodecylsulfathaltiger (LDS) Gel-Ladepuffer verwendet wurde. Als Laufpuffer wurde ein MES-haltiger (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) SDS-Puffer verwendet (50 mM MES, 50 mM Tris, 1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3). Zur Größenabschätzung wurde der vorgefärbte Standard *See Blue*TM (14-200 kDa) von Invitrogen (Groningen) verwendet. Die Proteine wurden mit Hilfe eines kolloidalen Coomassie-Farbstoffes (*GelCode*[®] *Blue Stain Reagent*, Pierce) für 2-12 h direkt angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen für 1 h in H₂O entfernt.

7.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie, modifiziert nach Schaffer *et al.* (2001), wurde von Axel Niebisch (AG Bott, IBT-1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Für Peptidmassen-Analysen wurden entweder Gelstückchen aus Proteinbanden von

Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mit Pasteurpipetten ausgestochen oder vollständige Proteinbanden mit einem Skalpell herausgeschnitten, zerkleinert und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis und Langen, 1997). Die Gelstückchen wurden 2×10 min mit $350 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ Ammoniumbicarbonat gewaschen und anschließend in 30% (v/v) Acetonitril für 20 min in einer Vakuumzentrifuge (Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY) getrocknet. Die Proben wurden mit $1 \mu\text{l}$ 3 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) mit $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Trypsin (*Sequencing grade modified Trypsin*; Promega, Mannheim) rehydratisiert und nach 20 min erfolgte die Zugabe von weiteren $2 \mu\text{l}$ 3 mM Tris/HCl (pH 8,8) ohne Trypsin. Anschließend wurden die Proben bei 37°C über Nacht verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von $6 \mu\text{l}$ Wasser, 15 min Inkubation, Zugabe von $5 \mu\text{l}$ $0,1 \%$ (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30% (v/v) Acetonitril und nochmals 10 min Inkubation eluiert. Ein Aliquot von $0,5 \mu\text{l}$ der erhaltenen Peptidlösung wurden auf einer Probenplatte mit $0,5 \mu\text{l}$ einer gesättigten Lösung von α -Cyano-4-Hydroxy-trans-Zimtsäure in 50% (v/v) Acetonitril, $0,25 \%$ (v/v) TFA gemischt. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der *Calibration Mixtures 1* und *2* des *Sequazyme Peptide Mass Standard Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt), die unmittelbar neben dem Probenspot aufgetragen wurden. Die Analyse der Proben erfolgte in einer *Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation* (Applied Biosystems) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63% Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns . Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die *Voyager Control Panel Software 5.0* und die *Voyager Data Explorer Software 3.5* (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der *GPMW-Software 4.0* (Lighthouse Data) oder dem *MS-Fit*-Programm (Clauser *et al.*, 1999) genutzt.

8. Bestimmung von Aminosäuren

8.1 Quantitative Bestimmung mittels *reversed phase* HPLC

Zur Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen wurden von der jeweiligen Kultur zum entsprechenden Zeitpunkt 500 - $1000 \mu\text{l}$ Proben entnommen

und die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min, 5200 g). Der Überstand wurde anschließend zur Entfernung aller Zellen über einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (SPARTAN 13/0,2, Schleicher & Schuell, Dassel) gegeben und zur Analyse eingesetzt.

Die Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe der *reversed phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) nach Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (Lindroth und Mopper, 1979). Diese Reaktion erfolgte in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung, wobei je 2,5 µl Probenlösung mit 20 µl *o*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol-Lösung (Pierce Europe BV, Niederlande) gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones und Gilligan, 1983) wurden anschließend über eine RP-HPLC Säule (Hypersil ODS 5 µm, 120 × 4 mm) mit vorgeschalteter Vorsäule (Hypersil ODS 5 µm, 40 × 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) durch einen Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration aufgetrennt. Als polares Laufmittel diente 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2) und die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Die Detektion der fluoreszierenden Derivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und 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 Aminosäurekonzentration der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als zusätzlichem internem Standard berechnet.

8.2 Silikonölzentrifugation

Zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen wurde die Methode der Silikonölzentrifugation nach Klingenberg und 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 mit einer Dichte von 1,04 g/cm³ befüllt. Um ausreichend Probenmaterial zu erhalten, wurden pro Probennahme 3 × 100 µl

Zellsuspension in je 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 *reversed phase* HPLC eingesetzt. Zur Quantifizierung der intrazellulären Aminosäuren wurden die in der Perchlorsäurephase vorliegenden, pelletierten Zellen zunächst nach der Methode von Hoischen und Krämer (1990) aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen nach Resuspendieren durch eine 5-minütige Inkubation im Ultraschallbad (Branson, Heusenstamm) aufgeschlossen. Anschließend wurde die erhaltene Suspension mit 5 M KOH und 1 M Triethanolamin neutralisiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 g und 4°C wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Die so erhaltenen Überstände wurden zur Bestimmung der Aminosäuren mittels *reversed phase* HPLC eingesetzt. Die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

$$C_{\text{int}} = \frac{(C_{\text{int, gem}} \times 100) - (C_{\text{ex}} \times 0,0599 \times \text{OD}_{600})}{0,04 \times \text{OD}_{600}}$$

- C_{int} : errechnete intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
- $C_{\text{int, gem}}$: 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 ($C_{\text{int, gem}} \times 100$), eines Korrekturfaktors, der den Fehler einbezieht, der durch die Aminosäurekonzentration im an den Zellen anhaftenden Medium bedingt ist ($C_{\text{ex}} \times 0,0599 \times \text{OD}_{600}$) und des intrazellulären Volumens der eingesetzten Zellen ($0,04 \times \text{OD}_{600}$). 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 und Krämer, 1994) beträgt.

9. Quantifizierung von Glykolyseintermediaten und Zuckern

9.1 Quantifizierung von Glykolyseintermediaten mittels HPLC

Der qualitative und quantitative Nachweis unphosphorylierter Glykolyseintermediate (Glycerinaldehyd, Glycerat, Dihydroxyaceton) in Kulturüberständen erfolgte mit dem D-7000 HPLC-System von Merck Hitachi (UV-Detektor L7400, Säulenofen L7350, Probengeber L7200, Pumpe L7100, Computerschnittstelle D7000). Die Probenauftrennung erfolgte isokratisch (0,6 ml/min) über eine Aminex-Säule (HPX-87H, 300 x 7,8 mm, BioRad, München) bei 65°C (*Guide to Aminex HPLC-Columns*). Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Kationenaustauschsäule, die mit Protonen belegt war, so dass die Auftrennung auf dem Ionenausschlussprinzip basiert. Als mobile Phase wurde über 0,2 µm Sterilfilter filtrierte Schwefelsäure (6 mM) verwendet. Es wurden jeweils 50 µl Standard oder Probe injiziert. Die Laufzeit der Probe betrug 20 min. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 206 nm. Die Auswertung erfolgte mit der *Multi-HSM-Manager 4.0 Software* (Merck Hitachi).

9.2 Enzymatische Bestimmung der Glucose- und Maltosekonzentration

Die Bestimmung von Glucosekonzentrationen in Kulturüberständen erfolgte mit Hilfe eines Glucose-Bestimmungs-Kits (r-biopharm, Darmstadt) entsprechend des Herstellerprotokolls. Der Test beruht auf der Umsetzung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch die Hexokinase und die anschließende NADP⁺-abhängige Reaktion von Glucose-6-Phosphat zu Gluconat-6-Phosphat. Die daraus resultierende NADPH-Zunahme wurde spektrophotometrisch anhand der Extinktionsänderung bei 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300 pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt.

Maltose wurde mittels eines Maltose-Bestimmungs-Kits (r-biopharm) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll ermittelt. Dabei wurde die Maltose zunächst durch die α -Glucosidase in zwei Glucose-Moleküle gespalten. Die weiteren Schritte entsprechen den zuvor für die Glucose-Bestimmung beschriebenen Reaktionen.

10. Genexpressionsanalysen

10.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde mit dem *RNeasy Mini-Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Dabei wurden ca. 25 ml einer *C. glutamicum*-Kultur in vorgekühlte, mit 25 g Eis beladene 50-ml Falcon-Gefäße gefüllt und abzentrifugiert (5 min, 4200 g, 4°C). Das Zellpellet wurde entweder direkt zur RNA-Präparation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Für die weitere Präparation wurden die abzentrifugierten Zellen in 350 µl RLT-Puffer (RNeasy, Qiagen) resuspendiert und in Gegenwart von 250 mg Zirkonium/Silica-Perlen ($\varnothing = 0,1\text{mm}$, Roth, Karlsruhe) 30 s in einem Amalgamator mechanisch aufgeschlossen (Silamat, Vivadent, Ellwangen). Nach Abtrennen von Zelltrümmern und intakten Zellen durch Zentrifugation (2 min, 14000 g) wurde der Überstand mit 250 µl Ethanol (abs.) vermischt, auf die RNeasy-Säulchen aufgetragen und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Die Membran wurde mit 350 µl RW1 Puffer (RNeasy, Qiagen) gewaschen (15 s, 8000 g) und anschließend wurde ein Mix aus 10 µl DNase I (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden) und 70 µl RDD Puffer (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden) auf die Säulchenmembran gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und mit 500 µl RPE Puffer (RNeasy, Qiagen) gewaschen. Die Säulchen wurden für 15 s bei 8000 g zentrifugiert und erneut mit 500 µl RPE Puffer gewaschen (2 min, 14000 g). Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, um restliches Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde die RNA mit 30-50 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert (1 min, 10000 g). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Kap. III 6.1.3). Die Reinheit (E_{260}/E_{280} , i.d.R. 1,7-2,0) wurde darüber hinaus durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Kap. III 6.2.5.2). Die Lagerung von präparierter RNA erfolgte bei -20°C.

10.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

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

10.3 DNA-Chip-Technologie

Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Chip-Technologie zur Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster und das verwendete Robotersystem zur Herstellung von DNA-Chips beruht auf dem an der Stanford University entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996) und wurde am Institut für Biotechnologie durch Dr. V.F. Wendisch und Dr. T. Polen etabliert (Lehnen *et al.*, 2002; Polen, 2002; Wendisch *et al.*, 2001). Dabei werden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden

gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2000). Detaillierte Informationen sind zusätzlich im Internet unter MGuide, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide> einzusehen. Die in dieser Arbeit verwendeten Chips wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe V.F. Wendisch zur Verfügung gestellt. Auf die Chips wurden 3530 PCR-Produkte (ca. 300-500 bp) von 3567 putativen *C. glutamicum*-Genen aufgebracht. *C. glutamicum* ATCC 13032 diente als Matrize für die Amplifizierung der Genfragmente mittels PCR. Die verwendeten Primer wurden durch die Firma Gene Scan AG (Freiburg) synthetisiert. Für die spätere Immobilisierung der DNA auf dem Chip wurden die DNA-Chip-Glasobjektträger zunächst mit Poly-L-Lysin beschichtet (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2000). Die Auftragung der PCR-Produkte (150-300 ng/ μ l) erfolgte mit einem computergesteuerten Robotersystem auf eine Fläche von 2 cm \times 2 cm auf einen Objektträger. Dabei wurden etwa 0,1-1,0 nl PCR-Produkt pro Spot aufgetragen. Die Spots hatten einen Durchmesser von etwa 60-120 μ m. Neben den PCR-Produkten der amplifizierten *C. glutamicum*-Gene wurden zusätzlich Hybridisierungskontrollen (Lambda-DNA, PCR-Produkt eines *E. coli*-Gens und genomische DNA von *E. coli*) auf den Chip aufgebracht. Für die Datennormalisierung (Kap. III10.7) wurde genomische *C. glutamicum*-DNA an verschiedenen Stellen auf dem Chip angeordnet.

10.4 Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Bevor die hergestellten DNA-Chips in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden, erfolgte eine chemische Nachbehandlung. Diese diente einerseits der Blockierung von Nukleinsäure-bindenden ϵ -Aminogruppen freier Seitenketten von Poly-L-Lysin an Stellen, an denen keine DNA aufgetragen wurde, und andererseits zur Immobilisierung der DNA. Zur Erzeugung hybridisierungsfähiger einzelsträngiger DNA aus der doppelsträngigen DNA erfolgte eine thermische Nachbehandlung. Um die mögliche Verlustrate von DNA-Chips zu minimieren, erfolgte jede Nachbehandlung mit nur 10 DNA-Chips, die in kurzer Zeit (max. 5 Wochen) durch Hybridisierungsexperimente verbraucht wurden. Für eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Spot-Fläche, wurden die DNA-Chips im ersten Schritt der Nachbehandlung durch Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (Sigma, Deisenhofen) über der Oberfläche einer 1 \times SSC-Lösung inkubiert (100 ml,

15 min). Da die aufgetragene DNA zur Herstellung der DNA-Chips ursprünglich in $3 \times$ SSC-Lösung gelöst vorlag, zieht das getrocknete Salz und die DNA innerhalb jeder Spot-Fläche Wasser aus der umgebenden feuchten Kammerluft an. Die Spots auf den DNA-Chips rehydratisierten, was an der Bildung von den die Spot-Fläche umspannenden Wassertröpfchen zu erkennen war. Während der Inkubation (15 min) verteilen sich infolge der Brown'schen Molekularbewegung die DNA-Moleküle, deren negativ geladene Phosphatreste noch nicht ausreichend durch die positiv geladenen ϵ -Aminogruppen der Poly-L-Lysin-Seitenketten fixiert wurden. Zur Fixierung der DNA-Moleküle auf der Oberfläche erfolgte nach dem Rehydratisieren eine „Blitztrocknung“ für 5 Sekunden bei 100°C (Shalon *et al.*, 1996). Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung ($650 \mu\text{J}$, UV-Stratalinker, Stratagene) erneut auf den Objektträger immobilisiert. Zum Blockieren der freien Poly-L-Lysin beschichteten Oberfläche, die nicht mit DNA bedeckt war, erfolgte eine 25-minütige Inkubation in Methyl-2-Pyrrolidinon-Lösung ($0,2 \text{ M}$ Bernsteinsäure-Anhydrid, 50 mM Na-Borat). Dabei reagieren die ϵ -Aminogruppen der freien Seitenketten des Poly-L-Lysins mit Bernsteinsäure-Anhydrid (Shalon *et al.*, 1996). Unmittelbar danach wurden die DNA-Chips für 2 min bei 95°C im Wasserbad zum Denaturieren der DNA-Doppelstränge inkubiert. Um eine anschließende Renaturierung der DNA-Doppelstränge zu verhindern, wurden die Chips in eiskaltem Ethanol inkubiert (2 min, 95 % Ethanol, 4°C) und auf diese Weise die DNA-Einzelstränge „fixiert“. Danach erfolgte zur Trocknung eine Zentrifugation (5 min, 50 g). Die trockene Lagerung der nachbehandelten DNA-Chips bis zu ihrer Verwendung erfolgte im Exikator (Shalon *et al.*, 1996).

10.5 DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Die vereinigten und aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden wurden dazu in $20 \mu\text{l}$ Hybridisierungspuffer ($20 \mu\text{g}$ Poly-A; $3 \times$ SSC; 25 mM HEPES pH 7,0, $0,23 \%$ (v/v) SDS) für 2 min bei 100°C denaturiert und anschließend für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Poly-A (Sigma, Deisenhofen) diente als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz und die

Endkonzentration von $3 \times \text{SSC}$ sicherte stringente Hybridisierungsbedingungen (Zimmer *et al.*, 2000). Vor der Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) ein Spezialdeckgläschen gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung über der DNA-Chip-Fläche sicher zu stellen (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA). Damit die Probenlösung während der Hybridisierung bei 65°C nicht austrocknet, wurden zur Gewährleistung einer ausreichend hohen Feuchtigkeit in der Kammer mehrfach kleine Tropfen $3 \times \text{SSC}$ -Lösung am Rand des DNA-Chips aufgetragen, dann die vorbereitete Probenlösung unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer wasserdichten Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., York Haven, USA) 5-16 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte DNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen der DNA-Chips für je 5 min in $1 \times \text{SSC}/0,03 \%$ (w/v) SDS und danach in $0,05 \times \text{SSC}$ bei Raumtemperatur (Zimmer *et al.*, 2000). Durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

10.6 Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips

Um die mRNA-Spiegel zu bestimmen, wurde die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Da das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben korreliert, ist es ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon *et al.*, 1996). Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenePix 4000 A laser scanner (Axon Inc., USA) verwendet. Die DNA-Chip-Oberfläche ($10 \times 10 \mu\text{m}$ Raster) wird zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppe von Cy3- und Cy5-dUTP mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen bestrahlt, je eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und Cy5-dUTP (635 nm), und die daraufhin emittierte Fluoreszenz wird mit lichtempfindlichen Kathoden bei 570 nm (Cy3-Fluoreszenz) und bei 670 nm (Cy5-Fluoreszenz) registriert. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird. Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Software wurde die

ortsaufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIF-Format elektronisch gespeichert (*GenePix Pro 3.0 Software*). Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die *GenePix Array List* (erstellt von G. Sindelar und C. Lange, AG Dr. Wendisch) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen bzw. zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen (genomische *C. glutamicum*-DNA, λ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *E. coli*).

10.7 Auswertung von DNA-Chips

Die Berechnung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{Spot-Hintergrund}}$. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um die durch die Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen *et al.*, 1998). Die Normalisierung erfolgte für jeden DNA-Chip über die genomische DNA von *C. glutamicum*.

Anhand des Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisses, das bei Hybridisierung der Sonden mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* gemessen wurde und gleich 1 sein sollte (Eisen *et al.*, 1998), wurden die einzelnen Spots normiert. Es wurde ein Korrekturfaktor ermittelt, der bei Multiplikation mit dem experimentellen Ergebnis ein Verhältnis von 1 für die chromosomale DNA ergab und die Verhältnisse aller genspezifischen Spots wurden dann mit diesem Faktor multipliziert (Khodursky *et al.*, 2000). Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die Berechnung von p-Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, *EXCEL 2000*, Microsoft). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse

genomischer DNA verglichen (Khodursky *et al.*, 2000). Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit p-Werten $>0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant verändert gegenüber der genomischen DNA betrachtet. Ein p-Wert von 0,05 bedeutet, dass die ermittelten relativen RNA-Level sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von den mRNA-Leveln genomischer DNA unterscheiden.

IV ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Vorstufenbereitstellung für die L-Serin-Biosynthese

Es gibt etwa 12 Verbindungen, die zu den Vorstufenmetaboliten im bakteriellen Stoffwechsel gezählt werden können. Dabei handelt es sich um Intermediate der Glykolyse/Glukoneogenese, des Tricarbonsäurezyklus und des Pentosephosphatweges (Lengeler *et al.*, 1999). Ein solcher zentraler Vorstufen-Metabolit ist das Glykolyseintermediat 3-Phosphoglycerat. Ausgehend davon wird L-Serin in nur drei Schritten synthetisiert. Um eine Verbesserung der Bereitstellung von 3-Phosphoglycerat für die L-Serin-Biosynthese zu erreichen, war es ein Ziel, die Glykolyse an definierten Stellen zu unterbrechen. Hierzu sollte einerseits das *pyk*-Gen deletiert werden, welches für das Glykolyseenzym Pyruvatkinase kodiert, da bekannt ist, dass eine Pyruvatkinase-Mutante eines Lysin-Produktionsstammes von *C. glutamicum ssp. lactofermentum* unphosphorylierte Glykolyseintermediate in das Medium ausscheidet (Gubler *et al.*, 1994). Andererseits sollte die 3-Phosphoglycerat-Mutase-Aktivität, welche die direkte Konkurrenzreaktion zur L-Serin-Biosynthese darstellt, ausgeschaltet werden.

1.1 Untersuchungen zur Pyruvatkinase aus *C. glutamicum*

Die Pyruvatkinase ist eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse und katalysiert die irreversible Umwandlung von PEP und ADP zu Pyruvat und ATP. Um die Bedeutung dieses Enzyms und die Akkumulation von glykolytischen Vorstufen für die L-Serin-Biosynthese zu ermitteln, wurde das Gen *pyk* im Wildtyp ATCC13032 inaktiviert.

1.1.1 Konstruktion einer *pyk*-Deletionsmutante

Die Konstruktion einer genetisch stabilen Mutante erfolgte in Anlehnung an eine von Schäfer *et al.* (1994) beschriebene Methode. Hierbei wird das intakte chromosomale *pyk*-Gen durch ein mittels definierter Deletion um 1063 bp verkürztes *pyk*-Gen

ersetzt. Zur Konstruktion des für den Genaustausch verwendeten Vektors wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen ein 539 bp großer 5'-flankierender Bereich (mit Primerkombination $\Delta pyk-1/\Delta pyk-2$; Tab. 3) sowie ein 538 bp großer 3'-flankierender Bereich (mit Primerkombination $\Delta pyk-3/\Delta pyk-4$; Tab. 3) des zu deletierenden Fragments amplifiziert. Da die beiden Primer $\Delta pyk-2$ und $\Delta pyk-3$ an ihrem 5'-Terminus zueinander komplementäre 21 bp große Linkersequenzen tragen, konnte in einer dritten, sogenannten „crossover“-PCR (Link *et al.*, 1997) mittels der beiden äußeren Primer $\Delta pyk-1$ und $\Delta pyk-4$ ein Deletionskonstrukt amplifiziert werden, wobei die beiden zuvor amplifizierten PCR-Produkte als Matrize dienten. Das so erhaltene 1056 bp große Δpyk -Deletionskonstrukt wurde zunächst mit dem Vektor pGEM-T ligiert und durch Restriktionskartierung überprüft. Anschließend wurde das Konstrukt als *XbaI/PstI*-Fragment in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Der daraus resultierende Deletionsvektor pK19*mobsacB* Δpyk wurde nach Sequenzierung (Primerkombination Uni_for/Uni_rev; Tab. 3) mittels Elektroporation in *C. glutamicum* ATCC13032 eingebracht. Über homologe Rekombination des Δpyk -Fragments des Vektors mit den entsprechenden chromosomalen Genbereichen konnte der Deletionsvektor ins Chromosom integrieren. Die erfolgreiche Integration am gewünschten Genlocus wurde durch PCR mit der Primerkombination USP/ Δpyk_K _rev und RSP/ $\Delta pyk-3$ (Tab. 3) überprüft. Nach Selektion auf Kanamycin-Resistenz wurde ein Klon erhalten, der die durch den Vektor vermittelte Saccharose-Sensitivität zeigte. Durch Kultivierung dieses Klons in BHI-Medium ohne Kanamycin und Saccharose wurde die Deletion des Vektors durch ein zweites Rekombinationsereignis ermöglicht. Nach Selektion auf Saccharose-Resistenz und Kanamycin-Sensitivität wurden 24 Klone erhalten, die in PCR-Analysen überprüft wurden. Dabei konnte für 15 Klone die gewünschte Deletion nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Primerkombinationen a) Δpyk_K _for/ Δpyk_K _rev, b) Δpyk_K _for/ Δpyk _rev5 und c) Δpyk_K _for/ Δpyk _rev2 eingesetzt. Im Falle einer erfolgreichen Deletion sollten dabei Banden der Größe a) 1535 bp, b) 1310 bp und c) kein Signal erhalten werden, während bei Wildtyp-Situation Banden der Größe a) 2561 bp, b) 2336 bp und c) 1145 bp auftreten sollten. In Abbildung 3 sind für drei dieser Klone sowie für den Wildtyp die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente gezeigt.

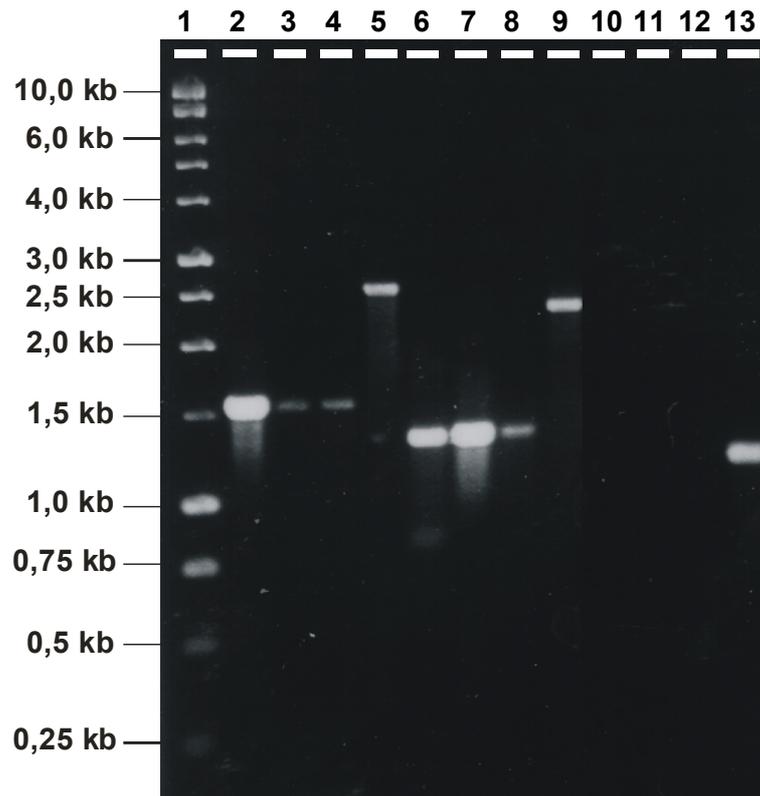


Abb. 3: Agarosegelphoto zum Nachweis der chromosomalen Deletion eines 1063 bp-Fragments des *pyk*-Gens in drei Klonen von 13032 Δ *pyk*.

- Spur 1: 1 kb-Leiter
 Spur 2-4: 13032 Δ *pyk*, Klon 1-3, Primerkombination a)
 Spur 5: 13032WT, Primerkombination a) (Kontrolle)
 Spur 6-8: 13032 Δ *pyk*, Klon 1-3, Primerkombination b)
 Spur 9: 13032WT, Primerkombination b) (Kontrolle)
 Spur 10-12: 13032 Δ *pyk*, Klon 1-3, Primerkombination c)
 Spur 13: 13032WT, Primerkombination c) (Kontrolle)

Die Deletion des *pyk*-Gens sollte zu einem Stamm ohne Pyruvatkinase-Aktivität führen. Um dies zu überprüfen, wurde die Enzymaktivität in der hergestellten Δ *pyk*-Mutante und im Wildtyp ermittelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Δ *pyk*-Mutante keine Pyruvatkinase-Aktivität mehr besitzt (Tab. 5), was die genetischen und physiologischen Ergebnisse bestätigte.

Tab. 5: Spezifische Pyruvatkinase-Aktivität in Rohextrakten der Stämme *C. glutamicum* 13032WT und 13032 Δ *pyk*. Die Anzucht der Zellen erfolgte in BHI-Medium.

Stamm	Spezifische Aktivität [U/mg]
13032WT	0,81
13032 Δ <i>pyk</i>	< 0,01

Um die Mutante im Vergleich zum Wildtyp weiter zu charakterisieren, wurden Wachstumsexperimente in CGXII-Minimalmedium mit Glucose bzw. Ribose als einziger C (Kohlenstoff)-Quelle durchgeführt.

1.1.2 Physiologische Charakterisierung der *pyk*-Deletionsmutante

Das Ausschalten der Pyruvatkinase führt dazu, dass dieser *C. glutamicum*-Stamm nicht mehr in der Lage ist, Pyruvat aus PEP zu bilden. Gubler *et al.* (1994) konnten zeigen, dass die Pyruvatkinase-Mutante eines L-Lysin-Produktionsstammes von *C. lactofermentum* zwar auf Glucose, nicht aber auf Ribose als alleiniger C (Kohlenstoff)-Quelle wachsen konnte. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Ribose, anders als Glucose, nicht über ein PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem aufgenommen wird und eine Pyruvatkinase-Mutante daher nicht in der Lage ist, bei Wachstum auf nicht-PTS-Zuckern, wie z. B. Ribose, Pyruvat zu generieren. Um dies im Wildtyp von *C. glutamicum* zu überprüfen, wurden Wachstumsexperimente mit der Δ *pyk*-Mutante in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose bzw. 100 mM Ribose als einziger C-Quelle durchgeführt.

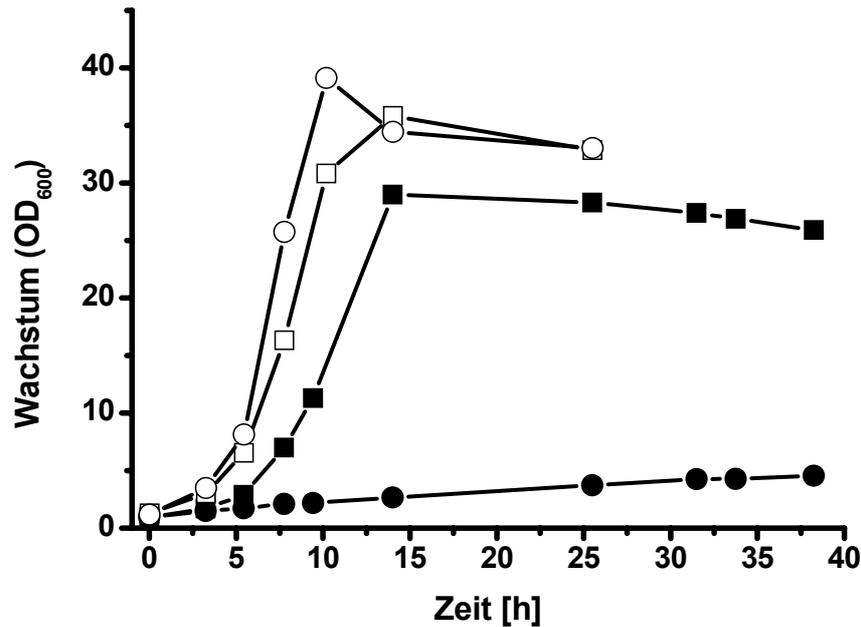


Abb. 4: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032WT (□ ■) und 13032 Δ pyk (○ ●) in CGXII-Medium mit 100 mM Glucose (offene Symbole) bzw. 100 mM Ribose (geschlossene Symbole).

Aus Abbildung 4 wird deutlich, dass die Δ pyk-Mutante mit Glucose als einziger C-Quelle vergleichbar mit dem Wildtyp wächst. Wie erwartet, war die Mutante jedoch nicht mehr in der Lage, mit Ribose als einziger C-Quelle zu wachsen. Aufgrund der Tatsache, dass *C. glutamicum* über verschiedene anaplerotische Reaktionen verfügt (Petersen *et al.*, 2000), wäre es vorstellbar, dass auch bei Wachstum auf Ribose Pyruvat über die Reaktionen der PEP-Carboxylase/Oxalacetat-Decarboxylase oder PEP-Carboxylase/Malatdehydrogenase/Malat-Enzym gebildet werden kann. Da jedoch kein Wachstum auf Ribose möglich war, ist es naheliegend, dass zumindest einige dieser Enzyme in *C. glutamicum* nicht ausreichend aktiv sind, um die Synthese von Pyruvat zu ermöglichen.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Mutante in Anwesenheit der glukoneogenetischen Substrate Pyruvat, Acetat und Citrat verhält. Wie die Daten in Tabelle 6 zeigen, wuchsen die Δ pyk-Mutante und der Wildtyp mit Pyruvat als einziger C-Quelle annähernd identisch. Da *C. glutamicum* nicht über eine nachweisbare PEP-Synthetase verfügt, wird im Wildtyp als auch in der Mutante das im Tricarbonsäure-Zyklus gebildete Oxalacetat durch das Enzym PEP-Carboxykinase zu PEP umgesetzt. Somit sind beide Stämme in der Lage über die Glukoneogenese alle zum Wachstum notwendigen Glykolyseintermediate zu bilden. Wurde jedoch Acetat oder

Citrat als C-Quelle angeboten, so war die Deletionsmutante überraschenderweise im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage zu wachsen (Tab. 6). Die Δpyk -Mutante kann Pyruvat nur aus Oxalacetat über die Oxalacetat-Decarboxylase oder aus Malat über das Malat-Enzym bilden. Offensichtlich ist jedoch keines der beiden für *C. glutamicum* beschriebenen Enzyme (Gourdon *et al.*, 2000; Jetten und Sinskey, 1995) ausreichend aktiv, um die Synthese von Pyruvat zu katalysieren, was in dem beobachteten Wachstumsdefekt resultiert. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Pyruvatkinase auch essentiell für das Wachstum auf den glukoneogenetischen Substraten Acetat und Citrat ist und dass die Enzyme Oxalacetat-Decarboxylase und Malat-Enzym unter diesen Bedingungen nicht ausreichend aktiv sind.

In Wachstumsexperimenten in denen Acetat (200 mM) und Ribose (80 mM) in äquimolaren Kohlenstoff-Konzentrationen eingesetzt wurden, konnte der Bedarf an Pyruvat für das Wachstum der Δpyk -Mutante auf Acetat bzw. Ribose ermittelt werden. Interessanterweise konnte das Wachstum der Δpyk -Mutante auf Acetat schon durch Zugabe von 6 mM Pyruvat wiederhergestellt werden (Tab. 6), was zeigte, dass bei Wachstum auf Acetat nur geringe Mengen Pyruvat als Supplement benötigt werden, um die unmittelbar von diesem Metaboliten ausgehenden Reaktionen zur Biomassebildung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu konnte das Wachstum auf Ribose erst durch Zugabe von 133 mM Pyruvat wieder hergestellt werden (Tab. 6). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei Wachstum der Δpyk -Mutante auf Ribose zusätzliches Pyruvat als Co-Substrat benötigt wird, um einerseits die unmittelbar von diesem Metaboliten ausgehenden Reaktionen zur Biomassebildung und andererseits die Reaktionen des Tricarbonsäure-Zyklus zur Energiegewinnung und Biomassebildung aufrechtzuerhalten.

Tab. 6: Wachstumsrate und gebildete Zelldichte bei Kultivierung von *C. glutamicum* 13032 Δ *pyk* und *C. glutamicum* 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen.

Stamm	Substrat	Co-Substrat/ Supplement	Wachstumsrate [h ⁻¹]	Zelldichte [Δ OD ₆₀₀]
WT	--	100 mM Pyruvat	0,28	8,9
WT	100 mM Citrat		0,15	13,3
WT	100 mM Acetat		0,25	5,9
WT	100 mM Ribose	--	0,31	28
Δ <i>pyk</i>	--	100 mM Pyruvat	0,28	9,2
Δ <i>pyk</i>	100 mM Citrat		0	0,7
Δ <i>pyk</i>	200 mM Acetat		0,09	1,9
Δ <i>pyk</i>	80 mM Ribose	--	0,09	0,6
Δ <i>pyk</i>	--	6 mM Pyruvat	n. b.	0,7
Δ <i>pyk</i>	200 mM Acetat	6 mM Pyruvat	0,29	13,7
Δ <i>pyk</i>	200 mM Acetat	133 mM Pyruvat	0,25	17,6
Δ <i>pyk</i>	80 mM Ribose	--	0,09	0,6
Δ <i>pyk</i>	80 mM Ribose	133 mM Pyruvat	0,28	32,0

n. b.: nicht bestimmbar

1.1.3 Untersuchungen zur Akkumulation von Glykolyseintermediaten mit der Δ *pyk*-Mutante

Ziel der Inaktivierung der Pyruvatkinase war die Verbesserung der Bereitstellung von Glykolyseintermediaten für die L-Serin-Bildung. Wie Gubler *et al.* (1994) zeigen konnten, akkumulierte eine Pyruvatkinase-Mutante eines Lysin-Produktionsstammes von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* 52 mM Dihydroxyaceton und 49 mM Glycerinaldehyd. Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung des *pyk*-Gens in *C. glutamicum* ATCC13032 ebenfalls zu einer Akkumulation von Glykolyseintermediaten führt, wurden die Δ *pyk*-Mutante und der Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose kultiviert. Die Kulturüberstände wurden mittels HPLC auf die Anwesenheit unphosphorylierter Glykolyseintermediate untersucht.

Tab. 7: Glykolyseintermediate nach 23 h Kultivierung in Überständen von *C. glutamicum* 13032 Δ *pyk* und 13032WT. Beide Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose kultiviert.

Stamm	Glycerat [mM]	Glycerinaldehyd [mM]	Dihydroxyaceton [mM]
Δ <i>pyk</i>	1,0	15,0	6,7
WT	< 0,001	7,4	< 0,001

Die in Tabelle 7 dargestellten Daten zeigen, dass die Inaktivierung des *pyk*-Gens beim Wachstum auf Glucose die Ausscheidung der unphosphorylierten Glykolyseintermediate Dihydroxyaceton, Glycerinaldehyd und Glycerat ins Medium zur Folge hatte, während der Wildtyp lediglich geringe Mengen Glycerinaldehyd ausschied. Somit hat die Inaktivierung der Pyruvatkinase eindeutig Auswirkungen auf die Glykolyse, obwohl hinsichtlich des Wachstumsverhaltens keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Das kann darauf zurückgeführt werden, dass die Mutante nur geringe Mengen an Intermediaten ins Medium ausschied. Somit ist davon auszugehen, dass durch die Inaktivierung des *pyk*-Gens eine Steigerung der Vorstufenbereitstellung zur L-Serin-Biosynthese bewirkt wurde.

1.1.4 Isolierung und Charakterisierung von Pyruvatkinase-Suppressor-mutanten

Wie zuvor beschrieben ist die Δ *pyk*-Mutante nicht in der Lage, auf Ribose als C-Quelle zu wachsen. Allerdings zeigte sich, dass nach längerer Inkubation in Ribose-Minimalmedium es doch zu Wachstum kam (Abb. 5). Dieses Phänomen konnte analog auch bei Inkubation der Mutante in Acetat- und Citrat-Minimalmedium beobachtet werden.

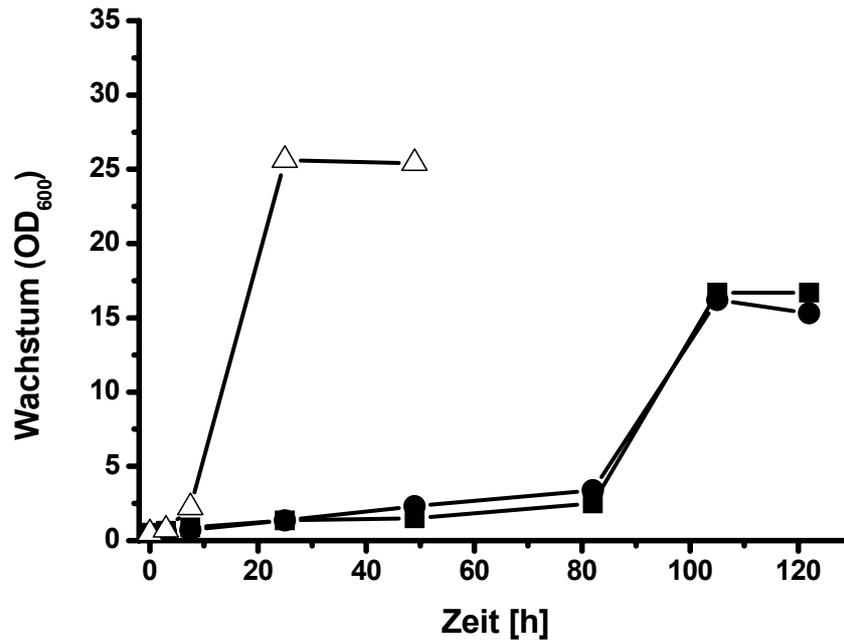


Abb. 5: Wachstum der *C. glutamicum* Stämme 13032 Δ *pyk* (●, ■; 2 verschiedene Klone) und 13032WT (△) in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Ribose.

Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass bei Kultivierung der Δ *pyk*-Mutante eine oder mehrere Suppressormutationen auftraten, die in der Lage waren, die Inaktivierung des *pyk*-Gens zu kompensieren. Diese zum Wachstum auf Ribose befähigte Mutante wurde isoliert und wird nachfolgend als Suppressormutante PSR bezeichnet. Die Wachstumsrate der Suppressormutante auf Ribose lag mit $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$ deutlich unter der des Wildtyps mit $\mu = 0,31 \text{ h}^{-1}$. Da die Mutante ohne lag-Phase auf Ribose wachsen konnte, war es möglich, adaptive Effekte auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob der Stamm genotypisch immer noch dem Δ *pyk*-Stamm entsprach, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung durch PCR mit den Primerkombinationen Δ *pyk*_for/ Δ *pyk*_rev_2 und Δ *pyk*_for/ Δ *pyk*_4 (Tab. 3) auf die vorhandene *pyk*-Deletion hin untersucht. In allen untersuchten Proben konnte die Deletion des *pyk*-Fragments nachgewiesen werden. Somit unterschieden sich die auf Ribose gewachsenen Zellen an diesem Genlocus offenbar nicht von der Δ *pyk*-Mutante. Da die Suppressormutante jedoch sehr wahrscheinlich wieder in der Lage war, Pyruvat zu synthetisieren, wurde in Enzymtests überprüft, ob die Suppressormutation zu einer Pyruvatkinase-Aktivität geführt hat. Wie in Tabelle 8 dargestellt, konnte in Rohextrakten der

Suppressormutante ebenso wie in Rohextrakten der Deletionsmutante keine Pyruvatkinase-Aktivität nachgewiesen werden. Demzufolge muss durch die Suppressormutation(en) eine alternative Pyruvatbildung in der Mutante möglich sein.

Tab. 8: Spezifische Pyruvatkinase-Aktivität in Rohextrakten der Stämme *C. glutamicum* 13032WT, 13032 Δ *pyk* und 13032PSR. Die Anzucht der Zellen erfolgte in BHI-Medium.

Stamm	Spezifische Aktivität [U/mg]
13032WT	1,1
13032 Δ <i>pyk</i>	< 0,01
13032PSR	< 0,02

Im Folgenden wurde mittels DNA-Chiptechnologie untersucht, ob eine veränderte Genexpression für die Suppression verantwortlich ist. Zunächst wurde überprüft, ob sich durch Vergleich des Genexpressionsmusters der PSR-Mutante mit dem des Wildtyps Hinweise auf die Lokalisation der potentiellen Suppressormutation(en) finden lassen. Dazu wurden beide Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Ribose als einziger C-Quelle über ca. 10 Generationen kultiviert (Experiment I). Durch mehrfaches Überimpfen wurden die Kulturen in der exponentiellen Phase gehalten und bei einer OD₆₀₀ von ca. 4 geerntet. Dabei hatte die PSR-Mutante mit $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ eine erheblich geringere Wachstumsrate als der Wildtyp mit $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$. Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Genexpressionsmuster der beiden Stämme aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsraten unterscheiden. In einem weiteren DNA-Chip-Experiment wurden auch die Genexpressionsmuster der PSR-Mutante und des Wildtyps nach Wachstum in LB-Medium miteinander verglichen (Experiment II). Da beide Stämme unter diesen Bedingungen gleich wuchsen, konnten wachstumsbedingte Unterschiede im Genexpressionsmuster ausgeschlossen werden. Um diese Experimente miteinander vergleichen zu können, wurde ein drittes Chipexperiment mit den Stämmen Δ *pyk* und Wildtyp nach Wachstum in LB-Medium durchgeführt (Experiment III). Gene, die in diesem Versuch sowie in Experiment II ein gegenläufiges Expressionsniveau zeigen, sind wahrscheinlich durch die Suppressormutation(en) und nicht durch die *pyk*-Deletion in ihrer Expression beeinflusst. In Tabelle 9 sind die Gene dargestellt, die in der PSR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein mindestens zweifach erhöhtes oder

reduziertes Expressionsniveau zeigten sowie die mRNA-Level dieser Gene bei Vergleich der Δpyk -Mutante mit dem Wildtyp bei Wachstum in LB-Medium.

Tab. 9: Differentielle Genexpression in *C. glutamicum* 13032PSR (PSR) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032WT (WT) bei Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Ribose (I) und bei Wachstum in LB-Medium (II) sowie der Δpyk -Mutante (Δpyk) im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei Wachstum in LB-Medium (III). Die Gene, die für ein putatives Fructose-Operon kodieren, sind grau hinterlegt.

Orf Nr.	NCgl Nr.	Beschreibung	mRNA-Spiegel ^{a)}		
			I PSR/WT	II PSR/WT	III Δpyk /WT
1313	0752	mögliches Membranprotein	4,7	2,6 ^{b)}	1,8
1349	0776	mögliches Membranprotein	2,0	2,0	4,1
1618	0995	hypothetisches Protein	0,4	0,4 ^{b)}	n.a.
1800	1152	Terminationsfaktor	0,5	0,5 ^{b)}	0,7
1903	2916	mögliches Membranprotein	0,5	0,5	1,1
1925	2936	hypothetisches Protein	2,2	2,0 ^{b)}	1,6
2019	1859	Regulator im Zuckerstoffwechsel	6,4	0,9 ^{b)}	0,7
2020	1860	1-Phosphofruktokinase	2,4	n.a.	n.a.
2021	1861	PTS-Komponente EII BC ^{Fru}	6,2	2,6 ^{b)}	0,5
2212	2008	Pyruvatkinase	0,5	0,5	0,2
2347	1418	hypothetisches Protein	2,0	2,0 ^{b)}	1,0
2486	1525	Phosphoglyceratkinase	2,3	2,1 ^{b)}	1,0
2671	1305	EII ^{Glc}	2,1	2,5 ^{b)}	1,2
2887	2476	Succinyl-CoA-Synthetase	3,9	3,9	1,6

n.a.: nicht auswertbar

^{a)} Es wurden nur Gene aufgelistet, die in mindestens zwei Vergleichen ein mindestens zweifach verändertes Expressionsniveau aufwiesen.

^{b)} Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten

Da die mRNA-Spiegel der Gene *orf1313*, *1349*, *1800*, *1925*, *2212* und *2887* sowohl in der PSR (Experiment I + II)- als auch der Δpyk (Experiment III)-Mutante jeweils erhöht oder verringert waren, kann dies auf die Deletion des *pyk*-Gens zurückgeführt werden. Demgegenüber ist der stark erhöhte mRNA-Spiegel des Gens *orf2021* spezifisch für die PSR-Mutante, da der mRNA-Spiegel des Gens in der Δpyk -Mutante deutlich reduziert ist. Darüber hinaus zeigte auch *orf2019* in der PSR-Mutante ein erhöhtes Expressionsniveau bei Wachstum in Ribose-Minimalmedium, während der mRNA-Spiegel dieses Gens in der Δpyk -Mutante leicht reduziert war (1,4-fach). Diese beiden in der PSR-Mutante und der Δpyk -Mutante gegenläufig exprimierten

Gene kodieren für einen Regulator der DeoR-Familie und eine fructosespezifische Permease (EIIABC^{Fru}) und flankieren das Gen *pfk* (*orf2020*), welches sehr wahrscheinlich für eine 1-Phosphofruktokinase kodiert und ebenfalls in der PSR-Mutante ein erhöhtes Expressionsniveau zeigte. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Gene in einem Operon liegen. Somit ist es naheliegend, dass das Gen *orf2019* für einen positiven Regulator der Gene *pfk* und *fruA* kodiert. Eine vergleichbare Genanordnung ist z. B. in *Streptococcus mutans* beschrieben, wo die Gene für eine 1-Phosphofruktokinase und eine Fructose-Permease (EII^{Fru}) stromabwärts eines positiven transkriptionellen Regulators mit Homologie zu FruR aus *E. coli* (Ramseier *et al.*, 1995) ein induzierbares Fructose-Operon bilden (Wen *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Befunde werden die drei Gene *orf2019*, *orf2020* und *orf2021* in der Folge als putatives Fructose-Operon *fruRKA* bezeichnet (Abb. 6).

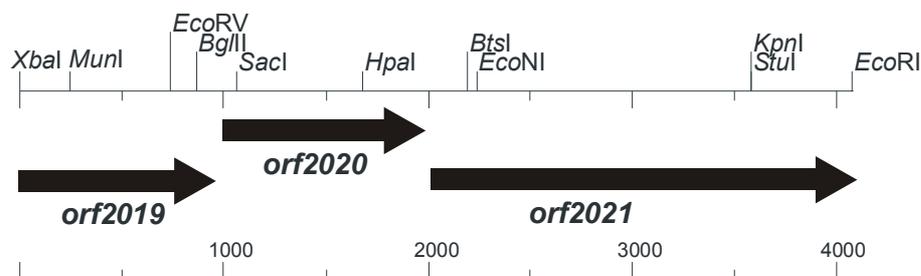


Abb. 6: Restriktionskarte des putativen Fructose-Operons *fruRKA*. Gezeigt ist die Anordnung der Gene *orf2019*, *orf2020* und *orf2021* im Chromosom von *C. glutamicum* 13032WT, die in NCBI als transkriptioneller Regulator des Zuckerstoffwechsels (*orf2019*), putative 1-Phosphofruktokinase (*orf2020*) und Fructose-PTS-Komponente EIIc (*orf2021*) annotiert sind.

Die Ergebnisse der DNA-Chipexperimente legen nahe, dass die verstärkte Expression der Gene des putativen Fructose-Operons in der PSR-Mutante zu einem phosphorylierenden Transport von Ribose über ein Fructose-PTS führt. Da das PTS-System bei einem solchen Prozess PEP zu Pyruvat dephosphorylieren würde, könnte so das Wachstum der PSR-Mutante in Ribose-Minimalmedium erklärt werden. Ausgehend von dieser Vermutung sollte es möglich sein, durch Überexpression der *fruRKA*-Gene aus der PSR-Mutante das Wachstum der Δ *pyk*-Mutante mit Ribose wieder herzustellen.

Um dies zu überprüfen, wurde der Expressionsvektor pXMJ19_*fruRKA*_PSR hergestellt. Hierzu wurde mit Hilfe der Primerkombination 2019_for/2021_rev (Tab. 3)

durch PCR, wobei chromosomale DNA der PSR-Mutante als Matrize diente, ein 4088 bp-Fragment amplifiziert, welches die Gene *fruR* (*orf2019*), *fruK* (*orf2020*) und *fruA* (*orf2021*) enthielt. Dieses wurde in den Expressionsvektor pXMJ19 kloniert, wo die Gene unter der Kontrolle des mit IPTG induzierbaren Promotors *P_{tac}* (Amann *et al.*, 1983; de Boer *et al.*, 1983) stehen. Dieser ist auch in coryneformen Bakterien funktionell (Tsuchiya und Morinaga, 1988) und sollte die Überexpression des *fruRKA_PSR*-Gen-Clusters in *C. glutamicum*-Stämmen gewährleisten. Nach Kontrolle des Vektors durch Restriktionskartierung wurde dieser durch Elektroporation in die Δpyk -Mutante eingebracht. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten des so hergestellten Stammes 13032 Δpyk pXMJ19_ *fruRKA_PSR* mit dem der Δpyk -Mutante und des Wildtyps in CGXII-Medium mit 1 mM IPTG und 100 mM Ribose untersucht. Dabei konnte jedoch kein verbessertes Wachstum des Stammes 13032 Δpyk pXMJ19_ *fruRKA_PSR* gegenüber der Δpyk -Mutante festgestellt werden. Die Überexpression der Gene des putativen Fructose-Operons war somit nicht ausreichend, um das Wachstum mit Ribose als einziger C-Quelle wieder herzustellen.

Wie gezeigt wurde, konnte die Δpyk -Mutante auch mit Acetat als einziger C-Quelle nicht wachsen. Jedoch zeigte sich auch hier, dass nach längerer Inkubation in Acetat-Minimalmedium eine Suppressormutante isoliert werden konnte, die nachfolgend mit PSA bezeichnet wird. Auch in dieser Suppressormutante wurde die *pyk*-Deletion durch PCR mit den Primerkombinationen $\Delta pyk_{for}/\Delta pyk_{rev_2}$ und $\Delta pyk_{for}/\Delta pyk_4$ sowie in Enzymtests das Fehlen von Pyruvatkinase-Aktivität nachgewiesen (Tab. 10).

Tab. 10: Spezifische Pyruvatkinase-Aktivität in Rohextrakten der Stämme *C. glutamicum* 13032WT, 13032 Δpyk und 13032PSA. Die Anzucht der Zellen erfolgte in BHI-Medium.

Stamm	Spezifische Aktivität [U/mg]
13032WT	1,1
13032 Δpyk	< 0,01
13032PSA	< 0,01

Wachstumsversuche in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Acetat zeigten, dass die Suppressormutante PSA mit Acetat als einziger C-Quelle mit einer maximalen

Wachstumsrate von $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$ etwa 23 % langsamer als der Wildtyp ($\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$) wuchs (Abb. 7a). Dies zeigt, dass auch bei der PSA-Mutante die Suppressor-mutation(en) nicht zu einer vollständigen Kompensation des Wachstumsdefektes führten.

Ebenso wie zuvor für die PSR-Mutante wurden auch mit der PSA-Mutante Transkriptomanalysen mittels DNA-Chips durchgeführt, um die Ursache für die Fähigkeit wieder mit Acetat als einziger C-Quelle wachsen zu können, aufzuklären. Dazu wurden die PSA-Mutante und der Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 240 mM Acetat kultiviert. Die Kulturen wurden durch mehrmaliges Überimpfen für ca. 10 Generationen in der exponentiellen Phase gehalten und anschließend geerntet. Die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten DNA-Chip-Experimenten, die in Tabelle 11 aufgeführt sind, führten zur Identifizierung einer begrenzten Anzahl von Genen, deren mRNA-Spiegel reproduzierbar verändert war. Dabei zeigten zwei Gene eine mindestens 2-fach erhöhte mRNA-Menge sowie ein Gen eine 2-fach reduzierte mRNA-Menge. Die Untersuchungen ergaben, dass die Expression des *mez*-Gens, welches für das Malat-Enzym kodiert, in der PSA-Mutante bei Wachstum mit Acetat als einziger C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht ist. Dies ist gleichzeitig die stärkste signifikante Änderung im Genexpressionsmuster der Mutante unter diesen Bedingungen und demzufolge ein starker Hinweis darauf, dass die Bildung von Pyruvat und somit das Wachstum durch eine verstärkte Produktion des Malat-Enzyms möglich ist. Des Weiteren zeigten auch die Gene des *ilvBNC*-Operons, die für Enzyme der Isoleucin-Biosynthese kodieren, erhöhte mRNA-Mengen. Ein reduziertes Expressionsniveau konnte für zwei nebeneinander liegende Gene gezeigt werden, die für eine putative Phenolhydroxylase (*orf423*) und eine putative Zink-abhängige Hydroxylase (*orf424*) kodieren.

Tab. 11: Differentielle Genexpression in *C. glutamicum* 13032PSA (M) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032WT (WT) bei Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 240 mM Acetat. Die Spalte n gibt die Anzahl der Experimente an, in denen die Gene auswertbar waren.

Orf-Nr.	NCgl-Nr.	Beschreibung	Gen	mRNA-Spiegel M/WT ^{a)}	n	p-Wert
1888	2904	Malat Enzym	<i>malE</i>	2,1	3	0,04
2793	1222	Acetolactat-Synthase	<i>ilvB</i>	2,0	2	0,04
2792	1223	Acetolactat-Synthase	<i>ilvN</i>	1,4	4	>0,05
2791	Bp1340543 -1340725	Hypothetisches Protein		1,5	2	0,01
2790	1224	Acetohydroxysäure-Isomeroreduktase	<i>ilvC</i>	1,4	2	>0,05
424	0051	Putative Zink-abhängige Hydroxylase		0,7	1	n.b.
423	0050	Putative Phenolhydroxylase		0,5	2	0,02

a) Mittelwerte aus mehreren (n) unabhängig durchgeführten Experimenten.

Um zu überprüfen, ob sich die signifikant erhöhte Expression des *mez*-Gens in der PSA-Mutante auch in einer gesteigerten Enzym-Aktivität widerspiegelt, wurde die Malat-Enzym-Aktivität bei Wachstum auf Acetat im Wildtyp und der PSA-Mutante untersucht (Tab. 12).

Tab. 12: Malat-Enzym-Aktivität in Rohextrakten von *C. glutamicum* 13032WT und 13032PSA. Die Stämme wurden in CGXII-Minimalmedium mit 240 mM Acetat kultiviert. Aufgeführt sind die Mittelwerte der spezifischen Aktivität aus jeweils 3 unterschiedlichen Rohextraktkonzentrationen.

Stamm	Spezifische Aktivität [mU/mg]
WT	27
PSA	71

Die spezifische Aktivität des Malat-Enzyms in der PSA-Mutante war 2,6-fach höher als im Wildtyp. Dies bestätigt die Ergebnisse der Transkriptomanalysen, bei denen das *mez*-Gen ein 2,1-fach erhöhtes Expressionsniveau zeigte. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression des *mez*-Gens als auch die Aktivität des entsprechenden Genprodukts in der PSA-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht ist.

Es wurde daraufhin untersucht, ob durch Überexpression des *mez*-Gens in der Δ *pyk*-Mutante das Wachstum mit Acetat als einziger C-Quelle wieder hergestellt werden kann. Dazu wurde ein 1252 bp großes Fragment, welches das 1179 bp große *mez*-Gen sowie eine Ribosomenbindestelle enthielt, mit der Primerkombination 1888_for/1888_rev (Tab. 3) durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pXMJ19 kloniert. Der resultierende Vektor pXMJ19_*mez* wurde durch Restriktionskartierung verifiziert und anschließend durch Elektroporation in die Stämme 13032 Δ *pyk* und 13032WT eingebracht. Die so hergestellten Stämme wurden zunächst auf ihre Malat-Enzym-Aktivität hin untersucht (Tab. 13).

Tab. 13: Spezifische Aktivität des Malat-Enzyms in Rohextrakten von *C. glutamicum* WT pXMJ19, WT pXMJ19_*mez*, Δ *pyk* pXMJ19, Δ *pyk* pXMJ19_*mez*. Die Zellen wurden in LB-Medium mit 1 mM IPTG kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Aktivität aus drei unabhängigen Kultivierungen und jeweils 3 unterschiedlichen Rohextraktkonzentrationen.

Stamm	Spezifische Aktivität [mU/mg]
WT pXMJ19	34
WT pXMJ19_ <i>mez</i>	106
Δ <i>pyk</i> pXMJ19	34
Δ <i>pyk</i> pXMJ19_ <i>mez</i>	144

Die Ergebnisse der Enzymtests zeigen deutlich, dass die Überexpression des *mez*-Gens im Wildtyp zu einer dreifachen, in der Δ *pyk*-Mutante sogar zu einer vierfachen Steigerung der spezifischen Enzymaktivität im Vergleich zu den Stämmen mit Leervektor führte.

Um zu untersuchen, ob durch Überexpression des *mez*-Gens in der Δ *pyk*-Mutante das Wachstum mit Acetat bzw. Citrat als einziger C-Quelle wieder hergestellt werden kann, wurden die *C. glutamicum*-Stämme 13032WT pXMJ19_*mez*, 13032 Δ *pyk* pXMJ19_*mez*, 13032WT pXMJ19 und 13032 Δ *pyk* pXMJ19 in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Acetat bzw. Citrat kultiviert (Abb. 7).

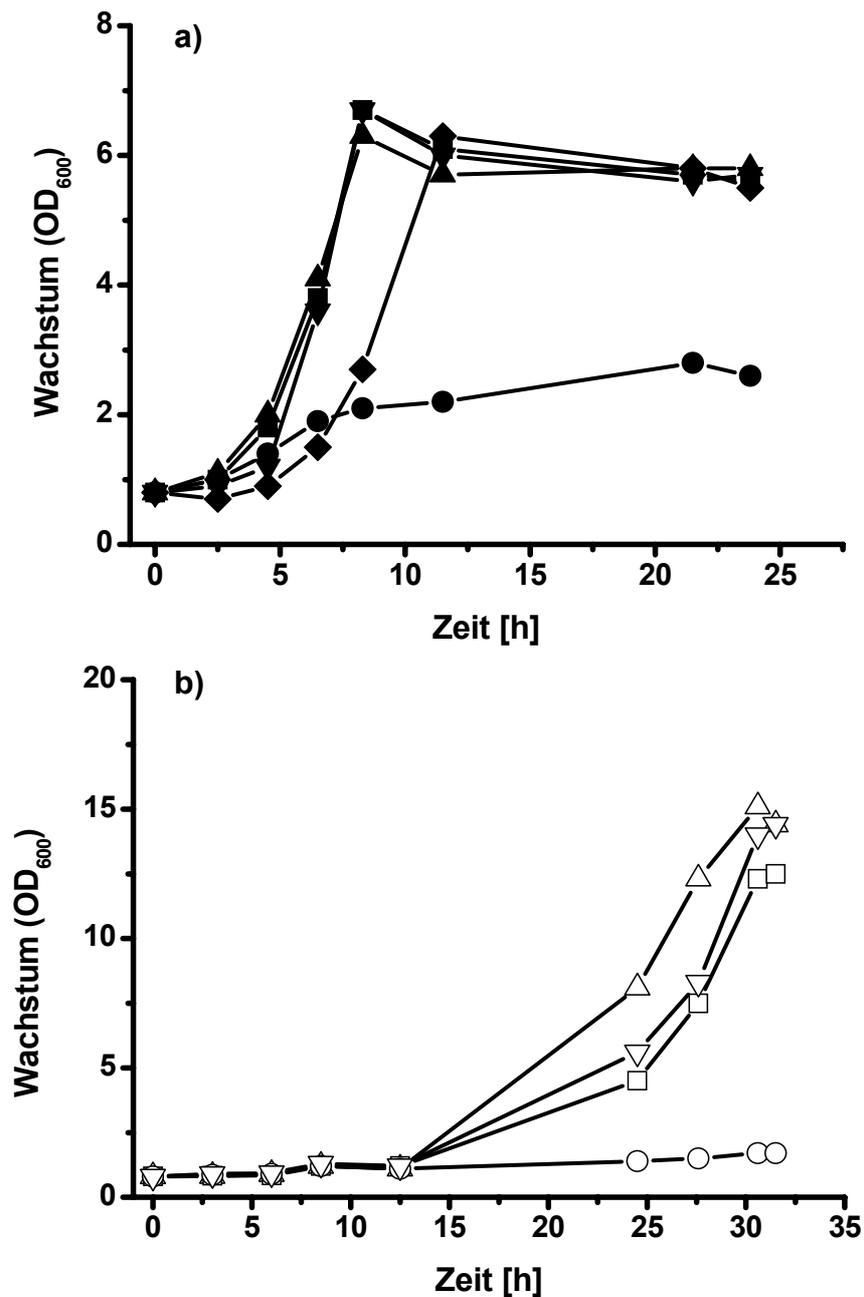


Abb. 7: Wachstum von *C. glutamicum*-Stämmen in CGXII-Minimalmedium mit 1 mM IPTG und **a)** 100 mM Acetat (geschlossene Symbole) bzw. **b)** 100 mM Citrat (offene Symbole) als einziger C-Quelle: (■ □) *C. glutamicum* 13032Δpyk pXMJ19_mez, (● ○) *C. glutamicum* 13032Δpyk pXMJ19, (▲ △) *C. glutamicum* 13032WT pXMJ19_mez, (▼ ▽) *C. glutamicum* 13032WT pXMJ19, (◆) *C. glutamicum* 13032PSA.

Die in Abbildung 7 dargestellten Wachstumskurven zeigen, dass durch die Überexpression des *mez*-Gens in der Δpyk-Mutante die Fähigkeit auf Acetat als einziger C-Quelle zu wachsen wieder vollständig hergestellt werden konnte. Die Mutante zeigte nun ein identisches Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp

und wuchs somit deutlich besser als die Suppressormutante. Eine Überexpression von *mez* im Wildtyp führte indes zu keiner weiteren Steigerung des Wachstums auf Acetat. Auch auf Citrat konnte durch Überexpression des *mez*-Gens das Wachstum der Δpyk -Mutante wieder hergestellt werden. Dabei war das Wachstum dieses Stammes mit dem des Wildtyps vergleichbar. Im Gegensatz zum Wachstum auf Acetat führte die Überexpression des *mez*-Gens im Wildtyp unter diesen Bedingungen zu einem etwas besseren Wachstum im Vergleich zum Wildtyp mit Leervektor und dem Stamm Δpyk pXMJ19_*mez*. Mit den zuvor dargestellten Versuchsergebnissen konnte somit gezeigt werden, dass die Suppressormutation, die die PSA-Mutante wieder zu Wachstum auf Acetat und Citrat befähigte, zu einer verstärkten Expression des *mez*-Gens führte.

Um zu untersuchen, ob diese Suppressormutation in der Promotorregion des *mez*-Gens lokalisiert ist und eine verstärkte Expression auslöst, wurde aus der PSA-Mutante mittels PCR (Primerkombination *mez+*_for/*mez+*_rev; Tab. 3) ein Genfragment amplifiziert, welches neben dem *mez*-Gen noch 596 bp stromaufwärts als auch 227 bp stromabwärts enthielt und in den Vektor pGEM-T kloniert. Das 2001 bp große Insert des resultierenden Konstrukts pGEM-T_*mez*_PSA wurde anschließend vollständig doppelsträngig durchsequenziert, wobei die Primer 810-265 R1 und 810-265 F1-F5 (Tab. 3) verwendet wurden. Interessanterweise konnte in dem gesamten untersuchten Bereich kein Basenaustausch festgestellt werden. Somit kann eine Mutation in der Promotorregion des *mez*-Gens ausgeschlossen werden. Dies legt nahe, dass eine Mutation *in trans* in einem möglichen Regulatorgen stattgefunden hat, die sich auf die Expression des *mez*-Gens auswirkt. Gourdon *et al.* (2000) vermuteten, dass die Expression des *mez*-Gens mit der im Medium vorhandenen C-Quelle zusammenhängt. Bisher gibt es jedoch keine weiteren Informationen zur Regulation des Malat-Enzyms aus *C. glutamicum*.

Die hier vorgestellten Versuche, die in Zusammenarbeit mit M. Krause und Dr. V. Wendisch (IBT-1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt wurden, können als eindrucksvolles Beispiel betrachtet werden, wie eine Mutation, die zu Veränderungen im Zentralstoffwechsel führt, mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie aufgeklärt werden kann.

1.2 Untersuchungen zur 3-Phosphoglyceratmutase aus *C. glutamicum*

Das Enzym 3-Phosphoglyceratmutase (PGM) katalysiert die reversible Reaktion von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat. Es konkurriert damit direkt mit dem ersten Enzym des L-Serin-Biosyntheseweges, der 3-Phosphoglyceratdehydrogenase um das gemeinsame Substrat 3-Phosphoglycerat. Ziel war es daher, die 3-Phosphoglyceratmutase-Aktivität auszuschalten, um auf diese Weise den Kohlenstofffluss vom Substrat Glucose direkt in die L-Serin-Biosynthese umzulenken (Abb. 8). Hierzu wurde zunächst in der Genomsequenz von *C. glutamicum* nach einem Gen gesucht, welches für die 3-Phosphoglyceratmutase kodiert.

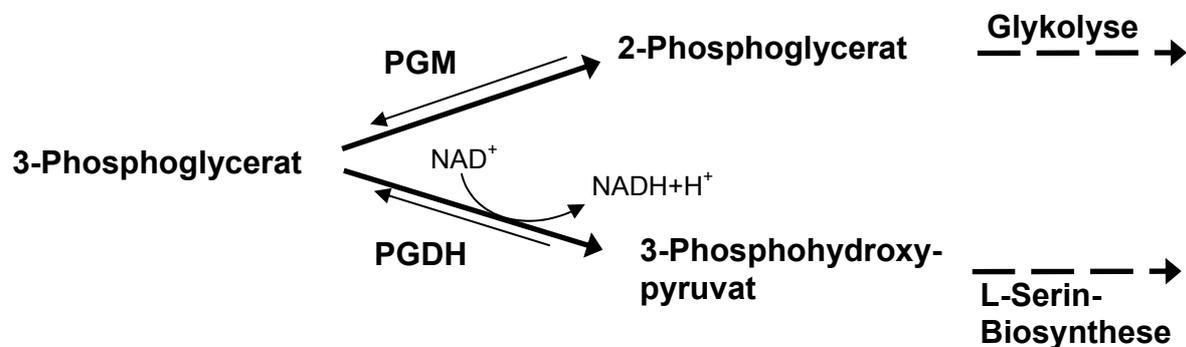


Abb. 8: Konkurrenzreaktionen der Enzyme 3-Phosphoglyceratmutase (PGM) und 3-Phosphoglyceratdehydrogenase (PGDH) um das gemeinsame Substrat 3-Phosphoglycerat.

1.2.1 Identifizierung und Charakterisierung der Gene *pgm1* und *pgm2*

Im *C. glutamicum*-Genom konnten zwei Gene identifiziert werden, die für potentielle 3-Phosphoglyceratmutasen kodieren. Die Gene werden im Folgenden als *pgm1* und *pgm2* bezeichnet. Die Produkte beider Gene (Pgm1 und Pgm2) zeigen mit 19,5 % nur geringe Identität zueinander. Sequenzvergleichsanalysen auf Aminosäureebene ergaben, dass die Pgm1 aus *C. glutamicum* hohe Identität zu 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängigen Phosphoglyceratmutasen aus verschiedenen anderen Organismen wie z. B. *Streptomyces coelicolor* (68,1 %), *Mycobacterium tuberculosis* (64,5 %), *M. leprae* (61,9 %) und auch *E. coli* (51,2 %) zeigt. Das Protein Pgm2 aus *C. glutamicum* ergab dagegen, im Vergleich mit anderen 3-Phosphoglyceratmutasen, deutlich niedrigere Identitäten (31 % Identität zu einer

putativen Phosphoglyceratmutase aus *Streptomyces coelicolor* und 22 % Identität zur 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängigen Pgm2 aus *E. coli*).

Um zu untersuchen, ob in *C. glutamicum* beide Proteine funktionell sind, wurden Integrationsmutanten hergestellt, in denen jeweils *pgm1* bzw. *pgm2* inaktiviert worden war. Um den Stamm WT::*pgm1* herzustellen, wurde ein 209 bp großes internes Fragment in den Inaktivierungsvektor pK18*mob* kloniert. Der resultierende Vektor pK18*mob_pgm1*_{int} wurde durch Restriktionskartierung verifiziert und mittels Elektroporation in *C. glutamicum* 13032WT transferiert. Zur Konstruktion des Stammes WT::*pgm2* wurde analog dazu der Integrationsvektor pK18*mob_pgm2*_{int} hergestellt, der ein 252 bp großes internes Fragment von *pgm2* trägt. Anschließend konnten durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz Integrationsmutanten erhalten werden. Die gewünschte Integration wurde durch PCR-Analysen mit den Primerkombinationen *pgm1*_int_for/RSP und *pgm2*_int_for/RSP nachgewiesen. Die Integrationsmutanten wurden anschließend auf Kanamycin-haltigen CGXII-Minimalmedium-Agarplatten die jeweils 4 % Glucose bzw. 4 % Ribose enthielten charakterisiert. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mit dem Leervektor pZ1 verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032::*pgm1*, 13032::*pgm2* und 13032WT auf Minimalmedium-Platten mit 4 % Glucose bzw. 4 % Ribose als einziger C-Quelle.

Stamm	4 % Glucose	4 % Ribose
13032:: <i>pgm1</i>	-	-
13032:: <i>pgm2</i>	++	+
13032WT pZ1	++	+

In den Plattentests konnte gezeigt werden, dass die Mutante 13032::*pgm1* weder in der Lage war, auf Glucose noch auf Ribose als einziger C-Quelle zu wachsen. Dies zeigt, dass das *pgm1*-Genprodukt essentiell für das Wachstum auf diesen Substraten ist. Die Inaktivierung des Gens *pgm2* in der Mutante 13032::*pgm2* zeigte keinerlei Effekte bezüglich der Fähigkeit, auf den angebotenen Substraten zu wachsen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Gen *pgm2* unter den gegebenen Bedingungen nicht funktionell exprimiert wird. Dies bedeutet, dass in *C. glutamicum* nur eine aktive 3-Phosphoglyceratmutase vorkommt, die vermutlich

zur Gruppe der 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängigen Enzyme zählt. Da die Integrationsmutante WT::*pgm1* in Experimenten in Flüssigkultur mit Glucose als einziger C-Quelle einen instabilen Phänotyp aufwies und darüber hinaus über eine für weitere gentechnische Arbeiten unerwünschte Kanamycin-Resistenz verfügt, wurde im Folgenden eine Deletionsmutante hergestellt.

1.2.2 Konstruktion einer *pgm1*-Deletionsmutante

Zur Herstellung der *pgm1*-Deletionsmutante wurde das intakte *pgm1*-Gen durch ein durch gerichtete Deletion um 433 bp verkürztes *pgm1*-Gen ersetzt. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Deletionsvektor pK18*mobsacB* Δ *pgm1* hergestellt. Hierzu wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen ein 650 bp großer 5'-flankierender (Primerkombination Δ *pgm1*_1/ Δ *pgm1*_2; Tab. 3) und ein 618 bp großer 3'-flankierender Bereich (Primerkombination Δ *pgm1*_3/ Δ *pgm1*_4; Tab. 3) amplifiziert. In einer dritten „crossover“-PCR, in der beide Fragmente als Matrize dienten (Primerkombination Δ *pgm1*_1/ Δ *pgm1*_4; Tab. 3), wurde das 1228 bp große Deletionsfragment erhalten und nachfolgend in die *Xba*I/*Hind*III-Schnittstellen des Vektors pK19*mobsacB* kloniert. Der resultierende Deletionsvektor pK19*mobsacB* Δ *pgm1* wurde durch Sequenzierung (Uni_for/Uni_rev) verifiziert und mittels Elektroporation in *C. glutamicum* Wildtyp eingebracht. Nach zwei homologen Rekombinationsereignissen wurden 43 Saccharose-resistente und Kanamycin-sensitive Klone erhalten. Durch PCR-Analysen mit den Primerkombinationen a) Δ *pgm1*_1/ Δ *pgm1*-K-rv, b) Δ *pgm1*_1/cgtS4-EcoRI-rv und c) Δ *pgm1*_1/ Δ *pgm1*_4 konnte gezeigt werden, dass bei sechs Klonen die gewünschte Deletion erfolgt war. Um die Bedeutung der 3-Phosphoglyceratmutase für die Glykolyse und Glukoneogenese zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumsexperimente durchgeführt.

1.2.3 Physiologische Charakterisierung der *pgm1*-Deletionsmutante

Durch das Ausschalten der 3-Phosphoglyceratmutase-Aktivität ist neben der Glykolyse gleichzeitig auch die Glukoneogenese unterbrochen. Um zu untersuchen, welche Konsequenzen diese Mutation für beide Stoffwechselwege hat, wurde das Wachstumsverhalten der Δ *pgm1*-Mutante in CGXII-Minimalmedium, das entweder

1 % Glucose, 2 % Lactat oder 2 % Acetat als einzige C-Quelle enthielt, im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

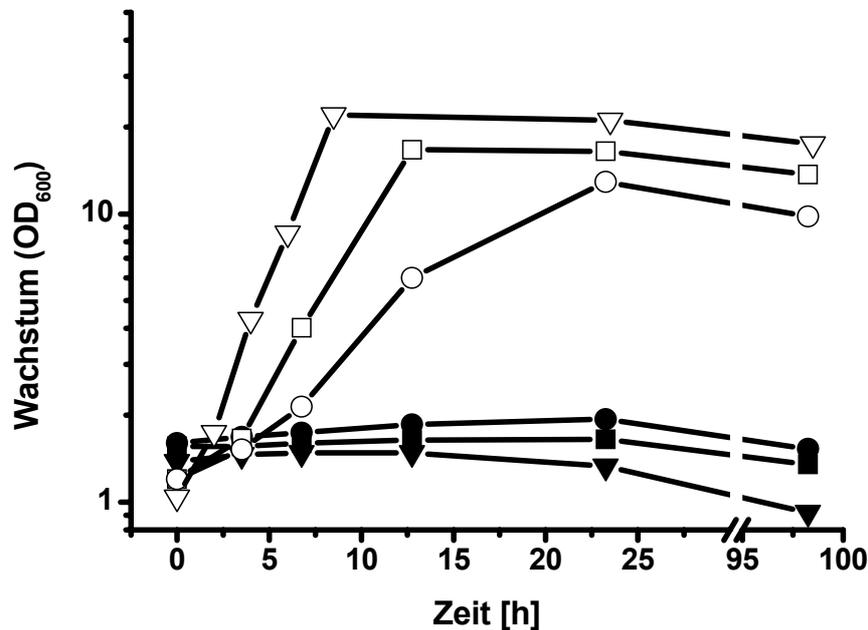


Abb. 9: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032 Δ *pgm1* (geschlossene Symbole) und 13032WT (offene Symbole) in CGXII-Minimal-Medium mit jeweils 1 % Glucose (▼ ▽), 2 % Acetat (■ □) und 2 % Lactat (● ○).

Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, führte das Ausschalten der 3-Phosphoglyceratmutase-Aktivität zu einem vollständigen Wachstumsverlust auf jedem der untersuchten Substrate. So war die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage, auf Glucose zu wachsen. Wie die Wachstumskurven weiterhin zeigen, war die Δ *pgm1*-Mutante auch nicht mehr in der Lage, auf den glukoneogenetischen Substraten Lactat und Acetat zu wachsen. Durch die Inaktivierung des *pgm1*-Gens hat die Mutante unter diesen Bedingungen keine Möglichkeit mehr Intermediate, die oberhalb des enzymatischen Blocks liegen, zu synthetisieren. Dies macht deutlich, dass die 3-Phosphoglyceratmutase auch ein essentielles Enzym der Glukoneogenese ist.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Δ *pgm1*-Mutante wieder mit einem glykolytischen Substrat wachsen kann, wenn das Medium zusätzlich mit einer glukoneogenetischen C-Quelle supplementiert wird. Um dies zu zeigen, wurden die Δ *pgm1*-Mutante und der Wildtyp in CGXII-Medium mit 1 % Glucose und jeweils 2 % Pyruvat, 2 % Lactat und 2 % Acetat kultiviert. Die in Abbildung 10 dargestellten Wachstumskurven zeigen, dass das Wachstum auf Glucose durch Zugabe von

Pyruvat, Lactat und Acetat wieder hergestellt werden konnte. Die Mutante konnte unter diesen Bedingungen Glucose sehr wahrscheinlich bis zum 3-Phosphoglycerat metabolisieren. Das angebotene Pyruvat bzw. Lactat kann über den Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt werden und infolge dessen kann über die PEP-Carboxykinase aus Oxalacetat PEP generiert werden. Das gebildete PEP ermöglicht dann die Aufnahme von Glucose über das PEP-abhängige glucosespezifische PTS und ist darüber hinaus als Vorstufe zur Synthese der aromatischen Aminosäuren notwendig. Die Wachstumsexperimente zeigen weiter, dass sich Pyruvat und Lactat gleichermaßen als Co-Substrate eignen. Die Mutante erreicht mit der Substratkombination Glucose-Pyruvat eine Wachstumsrate von $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$ und mit Glucose-Lactat $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$. Bei der Kultivierung mit Acetat als Co-Substrat zeigte die Mutante eine deutliche lag-Phase von ca. 7 h und erreichte auch nur eine Wachstumsrate von etwa $0,17 \text{ h}^{-1}$.

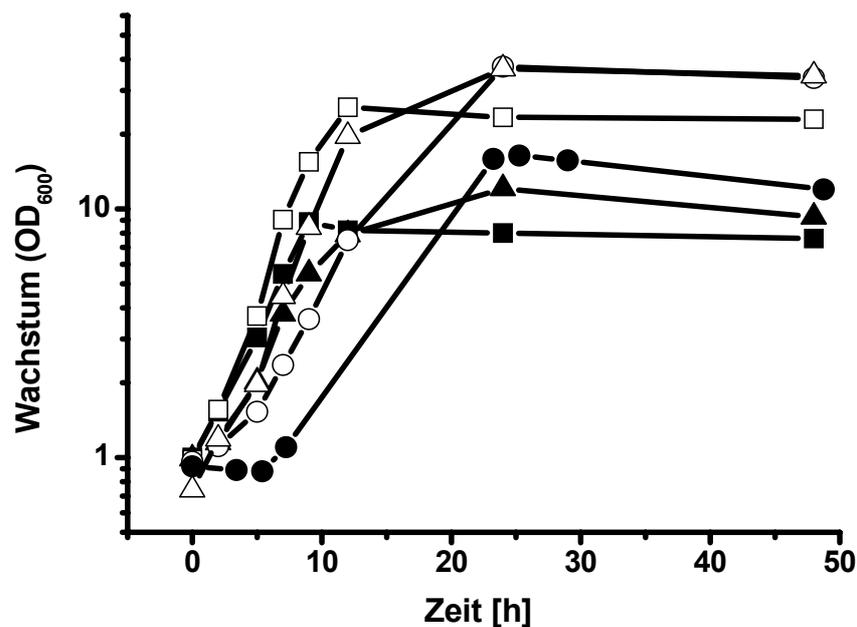


Abb. 10: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032 Δ pgm1 (geschlossene Symbole) und 13032WT (offene Symbole) in CGXII-Minimalmedium mit jeweils 1 % Glucose und zusätzlich jeweils 2 % Pyruvat (■ □), 2 % Acetat (● ○) bzw. 2 % Lactat (▲ △).

In den Experimenten wurde jedoch auch deutlich, dass das Wachstum der Δ pgm1-Mutante unter diesen Bedingungen nicht wieder vollständig wiederhergestellt werden konnte. Der Wildtyp erreichte mit der Substratkombination Glucose-Pyruvat eine Wachstumsrate von $\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$, mit Glucose-Lactat $\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$ und mit Glucose-

Acetat $\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$. Somit konnte auch der Wildtyp mit Pyruvat und Lactat als Co-Substrat gleich gut wachsen, während die Anwesenheit von Acetat, wie schon für die $\Delta pgm1$ -Mutante beobachtet, eine Wachstumshemmung verursachte. Auch die erreichten Zelldichten waren in den Wildtyp-Kultivierungen wesentlich höher als in den $\Delta pgm1$ -Kultivierungen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Wildtyp die angebotenen Substrate vollständig verstoffwechseln konnte, während die Mutante sehr wahrscheinlich nur solange in der Lage war zu wachsen, wie Pyruvat, Lactat oder Acetat vorhanden waren.

Um zu ermitteln, in welchem Verhältnis die Mutante glykolytisches und glukoneogenetisches Substrat benötigt, wurden weitere Wachstumsexperimente durchgeführt. Dabei wurde die $\Delta pgm1$ -Mutante in CGXII-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und jeweils 10, 20, 40 und 100 mM Lactat kultiviert.

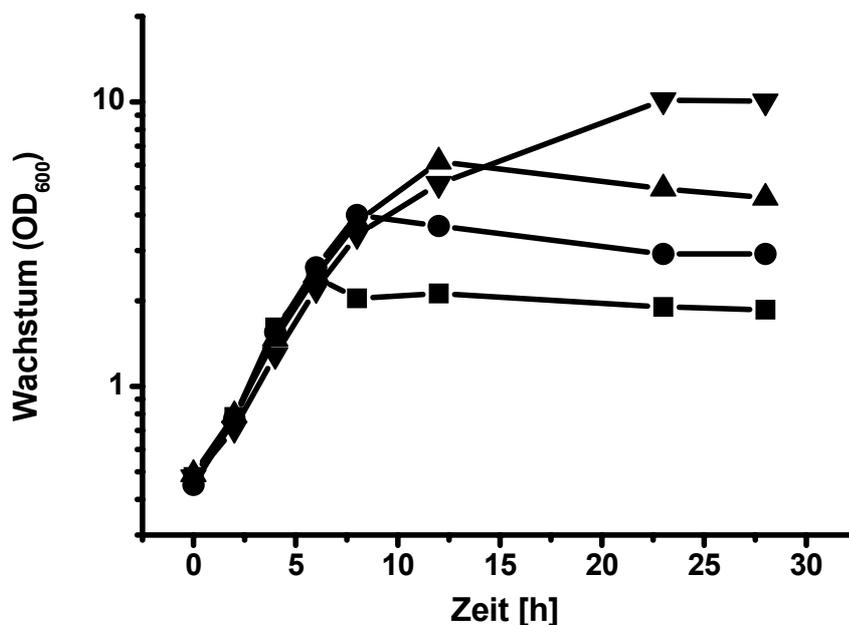


Abb. 11: Wachstum von *C. glutamicum* 13032 $\Delta pgm1$ in CGXII-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und jeweils 10 mM (■), 20 mM (●), 40 mM (▲) bzw. 100 mM (▼) Lactat.

Die Wachstumskurven in Abbildung 11 zeigen, dass die höchste OD_{600} in Anwesenheit von 100 mM Lactat erreicht wurde. Wie die quantitative Überprüfung mit Glucose-Teststäbchen (Diabur-Test 5000; Roche, Mannheim) ergab, wurde die Glucose unter diesen Bedingungen vollständig verstoffwechselt, während bei den niedrigeren Lactat- bzw. Pyruvatkonzentrationen ein Teil der Glucose nicht aufgenommen wurde (Daten nicht gezeigt). Somit wurde experimentell ermittelt, dass zur

Metabolisierung von 10 mM Glucose zwischen 40 und 100 mM Lactat notwendig sind.

1.2.4 Untersuchungen zur Akkumulation von Glykolyseintermediaten mit der $\Delta pgm1$ -Mutante

Durch die Inaktivierung der 3-Phosphoglyceratmutase sollte eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses aus der Glykolyse in die L-Serin-Biosynthese erreicht werden. Setzt man voraus, dass der L-Serin-Stoffwechsel einer *feedback*-Hemmung unterliegt, so war zu erwarten, dass es in der $\Delta pgm1$ -Mutante bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose und Pyruvat zu einem Anstau von oberhalb des enzymatischen Blocks liegenden Glykolyseintermediaten kommt. Um dies zu überprüfen, wurde sowohl die Mutante als auch der Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM Lactat kultiviert. Die Kulturüberstände wurden mittels HPLC auf die Anwesenheit der Glykolyseintermediate Dihydroxyaceton, Glycerat und Glycerinaldehyd sowie auf den Substratverbrauch untersucht (Tab. 15).

Tab. 15: Wachstumsparameter bei Kultivierung von *C. glutamicum* 13032 $\Delta pgm1$ und 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM Lactat.

Parameter	13032 $\Delta pgm1$	13032WT
Wachstumsrate μ_{\max} [h ⁻¹]	0,24	0,34
Gebildete Zelldichte [ΔOD_{600}]	13,0	38,5
Glucoseverbrauch [%]	19,3	100
Lactatverbrauch [%]	97,1	100
Glycerat [μ M]	184	8
Dihydroxyaceton [μ M]	< 1	< 1
Glycerinaldehyd [μ M]	< 1	< 1

Im Verlauf der Kultivierung konnten weder Dihydroxyaceton noch Glycerinaldehyd in den Überständen nachgewiesen werden. Allerdings schied die $\Delta pgm1$ -Mutante 184 μ M Glycerat ins Medium aus. Demgegenüber konnten in der Kultivierung mit dem Wildtyp lediglich 8 μ M nachgewiesen werden. Durch die Inaktivierung des

pgm1-Gens ist die Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat unterbrochen, was sehr wahrscheinlich intrazellulär zu einem Anstau von 3-Phosphoglycerat führte und extrazellulär zu einer 23-fach höheren Glyceratkonzentration im Vergleich zum Wildtyp. Somit konnte durch die Einführung des enzymatischen Blocks die Bereitstellung der Vorstufe 3-Phosphoglycerat für die L-Serin-Biosynthese erhöht werden.

1.2.5 Vergleich des Wachstums der $\Delta pgm1$ -Mutante mit Glucose und Maltose

Um auf Glucose wachsen zu können, benötigt die $\Delta pgm1$ -Mutante ein glukoneogenetisches Substrat einerseits zur Biomassebildung, ausgehend von Intermediaten unterhalb des enzymatischen Blocks, andererseits zur Bildung von PEP, um die Glucose aufnehmen zu können. Wenn die Glucose durch einen Zucker ersetzt wird, dessen Transport kein PEP verbraucht, so könnte das glukoneogenetische Substrat vollständig zur Biomassebildung zur Verfügung stehen, was in höheren Zelldichten resultieren sollte. Um dies zu prüfen, wurden Wachstumsexperimente durchgeführt bei denen als glykolytisches Substrat das aus zwei α -1 \rightarrow 4-verknüpften Glucosemolekülen bestehende Disaccharid Maltose eingesetzt wurde. Dabei wurde die $\Delta pgm1$ -Mutante und der Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 50 mM Maltose und 100 mM Lactat kultiviert. In den meisten Bakterien wird Maltose über einen spezifischen ATP-abhängigen ABC-Transporter aufgenommen (Boos und Shuman, 1998) und nachfolgend in zwei Moleküle Glucose gespalten. Zur Kontrolle wurden parallele Kultivierungen mit 100 mM Glucose und 100 mM Lactat durchgeführt, so dass in allen Ansätzen die Zucker in äquimolaren Kohlenstoff-Konzentrationen vorlagen (Tab. 16).

Tab. 16: Wachstumsparameter bei Kultivierung von *C. glutamicum* 13032 Δ *pgm1* und 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 50 mM Maltose und 100 mM Pyruvat bzw. 100 mM Glucose und 100 mM Pyruvat.

Substrat	Parameter	Δ <i>pgm1</i>	WT
50 mM Maltose + 100 mM Pyruvat	Wachstumsrate [h^{-1}]	0,33	0,43
	Zelldichte [ΔOD_{600}]	20,7	38,8
	Maltoseaufnahme [%]	41,2	96,5
100 mM Glucose + 100 mM Pyruvat	Wachstumsrate [h^{-1}]	0,22	0,41
	Zelldichte [ΔOD_{600}]	10,6	44,3
	Glucoseaufnahme [%]	14,3	100

Die Δ *pgm1*-Mutante zeigte auch in diesem Experiment wie erwartet einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp und nahm über den Versuchszeitraum auch lediglich 14,3 % der angebotenen Glucose auf. Überraschend war jedoch die Beobachtung, dass das Wachstum auf Maltose-Pyruvat-Medium deutlich verbessert war. Im Vergleich zum Wachstum im Glucose-Pyruvat-Medium stieg die Wachstumsrate um 50 % auf $\mu = 0,33 h^{-1}$ und die gebildete Zelldichte sogar um 95 % auf $\Delta OD_{600} = 20,7$. Allerdings erreichte die Mutante auch unter diesen Bedingungen nicht das Wachstumsverhalten des Wildtyps, das auf beiden Substratkombinationen vergleichbar war. Diese Daten zeigen, dass die Substitution von Glucose durch einen nicht-PTS-Zucker bei gleicher Co-Substrat-Konzentration das Wachstum der Δ *pgm1*-Mutante deutlich verbessern kann. In Kapitel IV4.2 ist beschrieben, welchen Einfluss diese Substratkombination auf die L-Serin-Bildung hat.

2. Effekte hoher L-Serin-Konzentrationen auf Wachstum und Genexpression von *C. glutamicum*

Hama *et al.* (1990) konnten zeigen, dass schon die Anwesenheit geringer Konzentrationen L-Serin (1 mM) im Medium das Wachstum von *E. coli* auf Glucose oder Lactat stark hemmen. Deshalb war es wichtig zu untersuchen, ob *C. glutamicum* in Anwesenheit von L-Serin im Wachstum beeinflusst wird.

2.1 Einfluss hoher L-Serin-Konzentrationen auf das Wachstum

Zunächst sollte das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* in Anwesenheit verschiedener L-Serin-Konzentrationen untersucht werden. Dazu wurde der Stamm 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose bei Zugabe von 0, 10, 50, 100 und 200 mM L-Serin kultiviert.

Tab. 17: Wachstumsparameter bei Kultivierung von *C. glutamicum* 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und verschiedenen L-Serin-Konzentrationen.

Serin [mM]	Wachstumsrate [h ⁻¹]	Gebildete Zelldichte [ΔOD_{600}]
0	0,41	30,3
10	0,40	30,1
50	0,39	33,3
100	0,39	36,7
200	0,37	40,2

Wie aus Tabelle 17 hervorgeht, nimmt die Wachstumsrate mit steigender L-Serin-Konzentration geringfügig ab, wohingegen die gebildete Zelldichte mit zunehmender L-Serin-Konzentration ansteigt. Im Vergleich zu *E. coli* haben hohe externe L-Serin-Konzentrationen nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum. Die mit steigender L-Serin-Konzentration ansteigende End-OD deutet darauf hin, dass L-Serin co-metabolisiert wird. Dies konnte in späteren Experimenten belegt werden (Kap. IV3.1.2).

Um zu überprüfen, wie sich hohe interne L-Serin-Konzentrationen auf das Wachstum von *C. glutamicum* auswirken, wurde ein L-Serin-Puls-Experiment durchgeführt. Dabei wurde der Stamm 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose kultiviert und in der exponentiellen Phase 1 mM Seryl-Tripeptid zugesetzt. Die Aufnahme dieses Tripeptids durch einen Oligopeptidtransporter und nachfolgende Hydrolyse zu L-Serin sollte in einem starken Anstieg der internen L-Serin-Konzentration resultieren. Parallel dazu wurde die Kultivierung ohne Tripeptid-Zugabe durchgeführt. Die Bestimmung der internen L-Serin-Konzentration erfolgte ab Zugabe des Tripeptids in beiden Kulturen über einen Zeitraum von 5,25 h (Abb. 12).

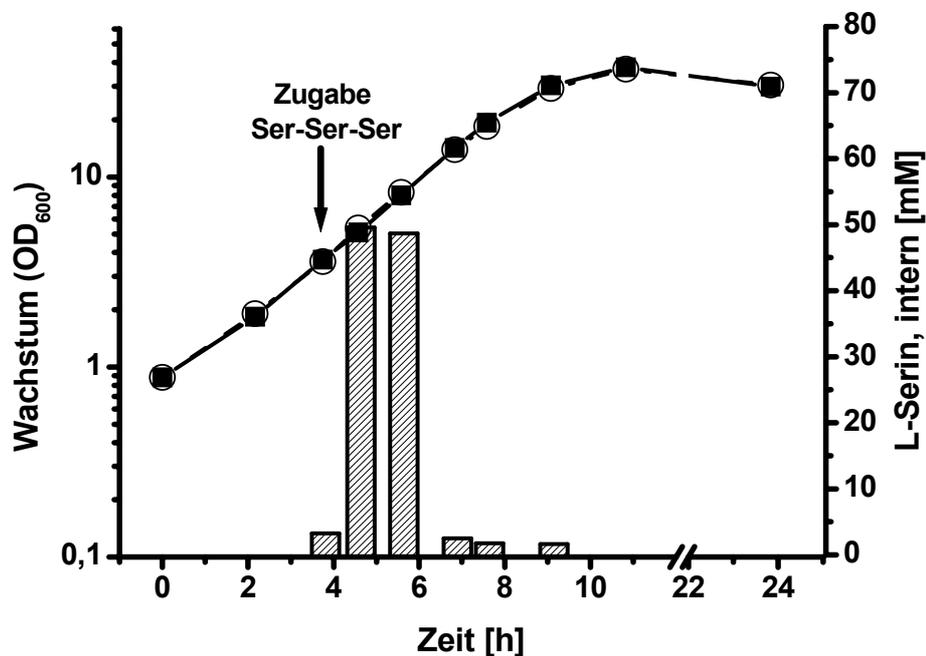


Abb. 12: Kultivierung von *C. glutamicum* 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose. In der exponentiellen Phase (nach 3,75 h) wurde einer Kultur 1 mM Seryl-Tripeptid zugesetzt (■). Dem Kontrollansatz wurde kein Peptid zugesetzt (○). Der Verlauf des Wachstums ist logarithmisch und die interne L-Serin-Konzentration nach Zugabe des Tripeptids (Säulen) ist linear gegen die Zeit aufgetragen.

Während in der Kultur ohne Seryl-Tripeptid-Zugabe über den gesamten Messzeitraum intrazellulär lediglich maximal 2,3 mM L-Serin nachgewiesen werden konnten, war in der Parallel-Kultur schon zum ersten Messpunkt 50 min nach Zugabe des Tripeptids eine interne L-Serin-Konzentration von 49,6 mM messbar. Interessanterweise war diese hohe interne L-Serin-Konzentration nur über einen Zeitraum von etwa einer Stunde zu beobachten. Das anschließende drastische

Abfallen der Konzentration könnte auf einen möglichen Abbau des L-Serins zu Glycin bzw. Pyruvat oder den Einbau von L-Serin in Biomasse zurückzuführen sein. Allerdings konnte jedoch weder ein Anstieg der internen Glycin-Konzentration im Vergleich zum Kontrollansatz noch eine verstärkte Biomassebildung festgestellt werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass zumindest ein Teil des L-Serins auch durch den Threoninexporter ThrE wieder ins Medium abgegeben wurde, da dieser neben L-Threonin auch L-Serin exportiert (Simic *et al.*, 2001). Trotz der transienten relativ hohen internen L-Serin-Konzentration ist kein Wachstumsnachteil im Vergleich mit der Kontrollkultur ohne Tripeptid-Zugabe zu erkennen, beide Kulturen wuchsen mit einer Wachstumsrate von $0,43 \text{ h}^{-1}$ identisch.

Diese Ergebnisse zeigen, dass weder hohe externe noch interne L-Serin-Konzentrationen einen starken negativen Effekt auf das Wachstum ausüben. Somit scheint *C. glutamicum* aufgrund dieser L-Serin-Toleranz ein geeigneter Organismus für die L-Serin-Produktion zu sein.

2.2 Einfluss hoher L-Serin-Konzentrationen auf das Genexpressionsmuster

Wie aus dem Experiment zum Wachstum auf Glucose plus L-Serin hervorging (Tab. 17), kann *C. glutamicum* offensichtlich L-Serin metabolisieren. Um zu untersuchen, ob durch eine hohe intrazelluläre L-Serin-Konzentration eine verstärkte Expression von Genen, die am L-Serin-Abbau beteiligt sind, gefunden werden kann, wurden DNA-Chipexperimente durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Experiment die Genexpressionsmuster von *C. glutamicum* Wildtyp bei Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin bzw. ohne L-Serin miteinander verglichen. Unter diesen Bedingungen konnten jedoch keine Gene identifiziert werden, die in Anwesenheit von L-Serin eine erhöhte Expression zeigten. Möglicherweise reichte die intrazelluläre L-Serin-Konzentration nicht für eine spezifische Antwort aus. Aus diesem Grund wurde ein Serin-Puls-Experiment bei Zugabe von Seryl-Tripeptid durchgeführt. Dabei wurde *C. glutamicum* Wildtyp in CGXII-Minimalmedium kultiviert und in der exponentiellen Phase 1 mM Seryl-Tripeptid zugesetzt. Als Referenz diente eine Parallelkultur ohne Tripeptid-Zugabe. Die Kulturen wurden eine Stunde weiterkultiviert und zur RNA-Isolierung bei einer OD_{600} von etwa 7 geerntet. Bis zu diesem Zeitpunkt war die interne L-Serin-

Konzentration auf 95 mM angestiegen, während in der Referenzkultur ohne Tripeptid-Zugabe lediglich 0,8 mM L-Serin gemessen wurden. Mittels DNA-Chip-Analyse konnten 22 Gene mit einem mindestens 2-fach erhöhten und 12 Gene mit einem mindestens 2-fach reduzierten mRNA-Niveau identifiziert werden. Die vollständige Liste ist im Anhang wiedergegeben. In Tabelle 18 sind die Gene, bei denen sich ein möglicher Zusammenhang zu L-Serin ergibt, zusammengefasst.

Interessanterweise zeigten eine Reihe von Genen, die für Enzyme kodieren, die im Aminosäuremetabolismus lokalisiert sind, ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau in Anwesenheit hoher interner L-Serin-Konzentrationen. Die entsprechenden Enzyme können selbst kein L-Serin umsetzen, gehören aber zu Stoffwechselwegen, die mit dem L-Serin-Metabolismus teilweise eng verknüpft sind.

Tab. 18: Differentielle Genexpression in *C. glutamicum* 13032WT bei Wachstum in Anwesenheit von 1 mM Seryl-Tripeptid (+) im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Seryl-Tripeptid (-). Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose kultiviert wurden.

Orf Nr.	NCgl Nr.	Funktion	Gen	mRNA-Spiegel +/-
2793	1222	Acetolactat-Synthase	<i>ilvB</i>	4,6
3236	2133	Glutamin-Synthetase I	<i>glnA</i>	2,4
3118	2227	Cystathionin-Beta-Lyase	<i>metC</i>	2,4
844	371	Formyltetrahydrofolat- Deformylase	<i>purU</i>	2,3
1500	895	Leucin-Transportprotein	<i>livM</i>	2,2
3696	2139	Threonin-Synthase	<i>thrC</i>	2,1
1396	811	Ammonium-Transportprotein	<i>cysQ</i>	2,0
3102	2241	Oligopeptid-Transporter ATP-Bindeprotein	<i>oppD</i>	1,9

Wie aus Tabelle 18 hervorgeht, führte die Anwesenheit hoher interner L-Serin-Konzentrationen zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Spiegel von Genen, die in den Biosynthesewegen von L-Isoleucin (*ilvB*), L-Glutamat (*glnA*) und L-Threonin (*thrC*) lokalisiert sind sowie von Genen die am Transport von Leucin (*livM*), Ammonium (*cysQ*) und Oligopeptiden (*oppD*) beteiligt sind. Darüberhinaus ist auch das Expressionsniveau des *metC*-Gens bei hohen internen L-Serin-Konzentrationen

erhöht. Dieses Gen kodiert für die Cystathionin-Beta-Lyase und ist im L-Methionin- und L-Cystein-Stoffwechsel aktiv. Für *Neurospora crassa* wurde gezeigt dass dieses Enzym auch als L-Serindehydratase fungiert (Flavin und Slaughter, 1964). Der erhöhte mRNA-Spiegel könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass auch in *C. glutamicum* die Cystathionin-Beta-Lyase eine L-Serin desaminierende Seitenreaktion besitzt.

3. Untersuchungen zum L-Serin-Abbau in *C. glutamicum*

Neben der Vorstufenbereitstellung ist der Abbau von L-Serin ein wichtiges Target für die gezielte Herstellung von L-Serin-Produktionsstämmen. Untersuchungen mit *C. glycinophilum*, einem Stamm, der L-Serin über die Serinhydroxymethyltransferase aus Glycin bildet, haben gezeigt, dass das Ausschalten der L-Serindehydratase durch ungerichtete Mutagenese zu einem drastischen Anstieg der L-Serin-Bildung führt (Kubota, 1984). Bisher gibt es keine Informationen über die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum*. Aus diesem Grund wurde das Gen, welches für die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* kodiert, isoliert und das Enzym charakterisiert.

3.1 Bedeutung der L-Serindehydratase im Serin-Abbau

Zunächst wurde das Gen *sdaA*, das für die L-Serindehydratase kodiert, in der Genomsequenz von *C. glutamicum* durch Sequenzvergleiche identifiziert. Die sich von dem 1350 bp großen Gen ableitende Aminosäuresequenz zeigte starke Übereinstimmung zu L-Serindehydratasen aus anderen Organismen wie z. B. *Pseudomonas putida* (48 %), *Streptomyces coelicolor* (47 %), *Mycobacterium leprae* (48 %), *E. coli* LSD1, TdcG (je 44 %), LSD2 (43 %), jedoch nur zu 24 % zu der aus zwei Untereinheiten bestehenden L-Serindehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. Die genannten Enzyme werden sämtlich der Fe-S-Cluster-Protein-Familie zugeordnet (Flint und Allen, 1996). In Abbildung 13 ist ein Homologievergleich dieser Proteine dargestellt. Auffällig ist, dass in den Sequenzen der L-Serindehydratase aus *P. asaccharolyticus* und der drei *E. coli*-Proteine vier hoch konservierte Cysteinreste zu erkennen sind. Demgegenüber sind in den Sequenzen der Proteine aus *C. glutamicum*, *S. coelicolor* und *M. tuberculosis*

lediglich drei dieser Cysteine vorhanden. Für *P. asaccharolyticus* wurde gezeigt, dass die drei C-terminalen Cysteinreste ausreichen, um ein [4Fe-4S]-Cluster auszubilden (Hofmeister *et al.*, 1997). Somit ist es wahrscheinlich, dass auch die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* zur Gruppe der Fe-S-Cluster-Proteine zählt.

<i>C.g.</i> _SdaA	1	--MAISVVDLFSIGIGPSSSHTVGPMAAALTYISEFPS-----SHVDTLHGSLAATGKGHCITRAVLL
<i>M.l.</i> _SdaA	1	--MTISVFDLFTIGIGPSSSHTVGPMAAARFVDCLAANGLLEDVCDLRFVLEGLSLAATGAGHGCTMSAIL
<i>S.c.</i> _SdaA	1	--MAISVFDLFSIGIGPSSSHTVGPMAAARMFARRRNEELLDSVASVRVLYGSLGATGCHGHPKAVL
<i>E.c.</i> _LSD1	1	---MISLFDVFKVIGIGPSSSHTVGPMAKAGQFVDDIVEKGLLDSVTRVAVDVYGSLSITGKGHHTDIAII
<i>E.c.</i> _LSD2	1	---MISVFDLFFKIGIGPSSSHTVGPMAKAGQFVDDLIARNLLKDVTRVVDVYGSLSITGKGHHTDIAII
<i>E.c.</i> _TdcG	1	---MISAFDFKIGIGPSSSHTVGPMAAGKSFIDRLSSGLLTATSHIVVLYGSLSLITGKGHATDVATII
<i>P.a.</i> _SDA_BA	1	MTDYSFEVVGPIVVGPSSTAGACKIANVATSIISNN-----YNQVEFQLHGSEFAHFFKGGHGTDRALV
<i>C.g.</i> _SdaA	62	GLVGVWEFTIVPDDAAISPGAPIPAKG-----SVNGPKGTVSYSITFDPHPLPFBHPNAVTFKGSSTR--
<i>M.l.</i> _SdaA	69	LGLEGEHPERTDADDVTRACMRAAGITCLGLGLIVIKFT-EADVLRPQTVLDRHPNMTIIVALARDGT
<i>S.c.</i> _SdaA	69	LGLEGDSPTRVDESADDRVETIKSSGRISLLGDHEIAFAYDDDMVLRKALFYHANGMTLWAYDAEGA
<i>E.c.</i> _LSD1	68	MGLAGNEPATVDIDSIFGFTRDVEERERLLAQGRHEVDFPRDNGMRFHNGNLPFHENGMRTHAYNGD-E
<i>E.c.</i> _LSD2	68	MGLAGNLPDVTVDISIFSFIQDYNTHGRMLANGQHEVEFPVDQCMFHADNLSLHENGMRITLALAGD-K
<i>E.c.</i> _TdcG	68	MGLAGNSPQVVDIDIEPAFELVTRSGRVPVSAHAIVDFPVAKNIIFHPEMLPRHENGMRITAKEGQ-E
<i>P.a.</i> _SDA_BA	66	GGILGFEEDDDRKISFELAKQAGLNYIFTTNLTGDNYPNSVKIVFSPYNGEEBEEYVIGSSIGGGAMKIV
<i>C.g.</i> _SdaA	124	-----TVLSVGGGFIMTTEDEFKRLDDI-----
<i>M.l.</i> _SdaA	138	-----KLAETYSVGGGFVVAHGDPPPEG-----
<i>S.c.</i> _SdaA	139	-----EVLTKTYSVGGGFVDEFAVCADRIV-----
<i>E.c.</i> _LSD1	137	-----VVYSKTYYSVGGGFIVDEEHHFGQDA-----
<i>E.c.</i> _LSD2	137	-----VVYSQTYYSVGGGFIVDEEHHFGQD-----
<i>E.c.</i> _TdcG	137	-----ELLSKTYYSVGGGFIVDEEHHFGLSH-----
<i>P.a.</i> _SDA_BA	136	NINGIAIEFRGEYSTILLEYPEQRGVISYVSSLLTSENNIESLNTKKNKLTNIVTLTVEIDKPLTESLK
<i>C.g.</i> _SdaA	146	-----GSGVSTIHPEAEVPCPFKSSQLLAYGRDFAEVMDKNE-RLHGGDLGTVAHLDLRVQIMQECV
<i>M.l.</i> _SdaA	162	-----AEWTTGGVYFGSAGELLELAATRGMSTCELMAEYF-QSLRSEQ-EMRAGLLNRDVMTQSV
<i>S.c.</i> _SdaA	166	-----LDDTVLKYFFRIGDELLRARETGLSISALMLENE-RAWRDED-EIREGELLEIWRVMRACV
<i>E.c.</i> _LSD1	162	-----ANEVSVVYFFKSAATELLAYCNETGYSISGLAMQNE-LALHSKK-EIDEYFAHVQIMQACI
<i>E.c.</i> _LSD2	162	-----SAPVEVVPYVYSAADLQKHQETGLSISGLMMKNE-LALHSKE-ELEQHLANVVEVMRGGI
<i>E.c.</i> _TdcG	162	-----DVETSVPYDFHSAGELLKVCQDYNGLSISGLMMHNE-LALRSKA-EIDAGFARVQVMDHGI
<i>P.a.</i> _SDA_BA	206	SAILGVERFTTAKYVEVMLNIARELLIDCNERGIKLYDLVLEEEIKNSHTTEEEIRKKLDAIVDMHASA
<i>C.g.</i> _SdaA	209	AGCTAIFGILPGGLNVRRAPOVHALISNGDTCELGADDAVEVWNLVALAVNEENAAGGRVVTAPTNGA
<i>M.l.</i> _SdaA	221	QRCIAOQGYLPGCLKVRRAHSWHERLQED--PNRDPVFAEDWNLVALAVNEENAAGGRVVTAPTNGA
<i>S.c.</i> _SdaA	225	DRGMTREGILPGCLKVRRAANTARKLRSE---GDFOALAMEWITLYALAVNEENAAGGRVVTAPTNGA
<i>E.c.</i> _LSD1	221	DRGMNTEGVLPGPLRVPRRASALRRLVSSD-KLSNDPNNVIDWNNMVALAVNEENAAGGRVVTAPTNGA
<i>E.c.</i> _LSD2	221	ERGISTEGVLPGLRVPRRAALRRMLVSSD-KTTTDPMAVVWNNMVALAVNEENAAGGRVVTAPTNGA
<i>E.c.</i> _TdcG	221	ERGMNTEGVLPGPLNVPRRAVALRRLVSSD-NISNDPNNVIDWNNMVALAVSEENAAGGRVVTAPTNGA
<i>P.a.</i> _SDA_BA	276	TNNLTQSDVTEYKMLIDGFAKRTYEYANSKGS-----IVGDFLAKAMAMAFSTSEVNAEMCKRTVAAPTAGS
<i>C.g.</i> _SdaA	279	AGIIPAVLHAYRDFITGFG---AQARTFLYTAGAVGITKENASISGAEVGCQGEVGSASMAAAGLCA
<i>M.l.</i> _SdaA	289	AGIIPAVLHAYQHYPAGRADPDDTSVRELLTAGAIGSLYKETASISGAEVGCQGEVGSAAHMAAAGLAE
<i>S.c.</i> _SdaA	291	AGIIPAVLHYMNFVPG---ADEDVYRELLAAGAIGMLKENASISGAEVGCQGEVGSACSMAAAGLAE
<i>E.c.</i> _LSD1	290	CGIIPAVLAYYDFHIESVS---PIYTRFMFAAGAIGALYKMNASISGAEVGCQGEVGVACSMAAAGLAE
<i>E.c.</i> _LSD2	290	CGIIPAVLAYYDKFIREVN---ANSIARMLLVSAIGSLYKMNASISGAEVGCQGEVGVACSMAAAGLAE
<i>E.c.</i> _TdcG	290	CGIIPAVLAYYDKFRRPVP---ERSIARMLFLAAGAIGALYKMNASISGAEVGCQGEIIVACSMAAAGLAE
<i>P.a.</i> _SDA_BA	341	SGIMPAMLVAATEKYNFDR---TITQNGFLTSIGIGQVITKYATFAGAECCQTECGSASMAAAALVE
<i>C.g.</i> _SdaA	346	VLGGSPQOVENAAEIALEHNLGLTCDPVGGLVQIPCIERNAIAMKSIINAARLARIIGDNNRVSLDDVIV
<i>M.l.</i> _SdaA	359	ILGGTFAOVENAAEIAEHSGLTCDPIAGLVQIPCIERNAIACKAINAARMAIRGDTHRVSLDEVIA
<i>S.c.</i> _SdaA	358	VLGGSPQOVENAAEIGMEHNLGLTCDPVGGLVQIPCIERNNAIAVKAVTAARMAIRGDSHIVSLDKVIK
<i>E.c.</i> _LSD1	357	LLGGSPQOVCAAEIGMEHNLGLTCDPVAGQVQVPCIERNAIAVKAINAARMAIRRTSAPRVSLDKVIE
<i>E.c.</i> _LSD2	357	LLGASPAOVCAAEIAEHNGLTCDPVAGQVQVPCIERNAIAAVKAVNAARMAIRRTSEPRVCLDKVIE
<i>E.c.</i> _TdcG	357	LLGGSPAOVCAAEIAEHNGLTCDPVAGQVQVPCIERNAIAVKAINAARMAIRRTSAPRVSLDKVIE
<i>P.a.</i> _SDA_BA	407	MLGGTVECALHAASITINVLGLVCDPIAGLVQVPCIFERNASVIVNAFISADLALAG-VESTVPPREVI
<i>C.g.</i> _SdaA	416	TMAATGRDMLTKYKETSIGGLATTGFPVSMTEC-----
<i>M.l.</i> _SdaA	429	TMRATGRDMNFKYKETAAGGLALAVNIVEC-----
<i>S.c.</i> _SdaA	428	TMKETGADMVSKYKETAARG--GLAVNIEC-----
<i>E.c.</i> _LSD1	427	TMVETGRDMNAKYRETSRG--GLAKVQCD-----
<i>E.c.</i> _LSD2	427	TMVETGRDMNAKYRETSRG--GLAKVACD-----
<i>E.c.</i> _TdcG	427	TMVETGRDMNDKYRETSRG--GLAKVYCG-----
<i>P.a.</i> _SDA_BA	476	AMGEVENSMTIETALRETGLG--GLAGSKTGQKIRRDFLKEGD

Abb. 13: Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *sdaA*-Gens aus *C. glutamicum* (1. Zeile) mit Sequenzen von L-Serindehydratasen aus *M. leprae*, *S. coelicolor*, *E. coli* und *P. asaccharolyticus*. Aminosäuren, die in mindestens vier Sequenzen identisch sind, wurden schwarz unterlegt, konservativ ausgetauschte Aminosäuren grau. Die konservierten Cysteinreste sind fett gedruckt und mit Pfeilspitzen markiert.

3.1.1 Herstellung von *sdaA*-Überexpressions-Stämmen und einer *sdaA*-Deletionsmutante

Um zu untersuchen, ob der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* eine Bedeutung im L-Serin-Abbau zukommt und um das Protein charakterisieren zu können, wurde zunächst ein Stamm konstruiert, in dem das *sdaA*-Gen durch Deletion eines 414 bp großen internen Fragments inaktiviert worden war. Hierzu wurde der Deletionsvektor pK18*mobsacB_ΔsdaA* hergestellt. Zunächst wurde ein 526 bp großer 5'-terminaler (Primerkombination $\Delta sdaA_1/\Delta sdaA_2$; Tab. 3) und ein 531 bp 3'-terminaler (Primerkombination $\Delta sdaA_3/\Delta sdaA_4$; Tab. 3) Bereich mittels PCR amplifiziert. Das nach einer dritten PCR-Reaktion („*crossover*“-PCR) erhaltene 1036 bp große Fragment wurde in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Der resultierende Vektor pK19*mobsacB_ΔsdaA* wurde durch Sequenzierung (Primerkombination Uni_for/Uni_rev; Tab. 3) überprüft und zunächst mittels Elektroporation in *C. glutamicum* Wildtyp eingebracht. Nach zwei homologen Rekombinationsereignissen wurden 32 Saccharose-resistente und Kanamycin-sensitive Klone erhalten. 10 dieser Klone wurden durch PCR-Analyse mit der Primerkombination $\Delta sdaA_5/\Delta sdaA_6$ (Tab. 3) kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass bei zwei Klonen die gewünschte Deletion erfolgt war.

Darüber hinaus sollte das *sdaA*-Gen in *C. glutamicum*-Stämmen überexprimiert werden, um festzustellen, ob dadurch das Wachstum auf L-Serin beeinflusst wird. Für die Herstellung eines Vektors mit induzierbarer *sdaA*-Expression wurde das Gen mittels der Primerkombination *sdaA_for/sdaA_rev* durch PCR amplifiziert, in den pGEM-T-Vektor zwischenkloniert und nach *EcoRI/XbaI*-Restriktion in den ebenso behandelten Expressionsvektor pXMJ19 ligiert. Der resultierende Vektor pXMJ19_*sdaA* wurde durch Restriktionskartierung kontrolliert und durch Elektroporation in die *C. glutamicum*-Stämme 13032WT und 13032 $\Delta sdaA$ eingebracht. Des Weiteren wurde ein Vektor konstruiert, in dem die Expression des *sdaA*-Gens unter der Kontrolle des nativen Promotors stand. Hierzu wurde ein Fragment, welches das vollständige *sdaA*-Gen sowie 254 bp stromaufwärts und 142 bp stromabwärts enthielt, mittels PCR unter Verwendung der Primerkombination *sdaA_P_for/sdaA_P_rev* (Tab. 3) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Aus dem so hergestellten Plasmid pGEM-T_*sdaA-P* wurde ein 1,8 kb großes Fragment in die *XbaI/PstI*-Schnittstellen des corynebakteriellen *multi-copy*-

Vektors pJC1 kloniert. Der resultierende Vektor pJC1_ *sdaA*-P wurde nach Kontrolle durch Restriktionskartierung ebenfalls in die Stämme *C. glutamicum* 13032WT und 13032 Δ *sdaA* eingebracht.

3.1.2 Physiologische Charakterisierung der *sdaA*-Überexpressions-Stämme und der *sdaA*-Deletionsmutante

Zunächst sollte untersucht werden, wie sich die Überexpression bzw. Deletion des *sdaA*-Gens auf das Wachstum mit L-Serin als einziger C-Quelle auswirkt. Dazu wurden Wachstumsexperimente durchgeführt, bei denen die Stämme 13032WT pXMJ19_ *sdaA*, 13032WT pJC1_ *sdaA*-P, 13032 Δ *sdaA* pJC1 sowie zur Kontrolle 13032WT pXMJ19 in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM L-Serin kultiviert wurden (Abb. 14). Die Vorkultivierung der Stämme erfolgte in BHI-Medium ohne IPTG. Wie sich in diesem Experiment zeigte, ist die Δ *sdaA*-Mutante mit Leervektor nicht in der Lage mit L-Serin als einziger C-Quelle zu wachsen. Interessanterweise zeigte auch der Wildtyp mit Leervektor trotz intaktem *sdaA*-Gen kein Wachstum. Demgegenüber konnten die beiden *sdaA* überexprimierenden Stämme 13032WT pJC1_ *sdaA*-P und 13032WT pXMJ19_ *sdaA* mit L-Serin als einziger C-Quelle wachsen. Es zeigte sich weiterhin, dass die IPTG-induzierte Expression des *sdaA*-Gens zu einer höheren Wachstumsrate ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$) und höheren End-OD ($\text{OD}_{600} = 5,3$) führte, als die Expression unter dem eigenen Promotor ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und $\text{OD}_{600} = 3,2$). Diese Beobachtungen stimmen mit den gemessenen L-Serin-Konzentrationen überein (Abb. 14). Während der Stamm 13032WT pXMJ19_ *sdaA*, in dem das *sdaA*-Gen unter dem starken *tac*-Promotor exprimiert wird, im Verlauf der Kultivierung 93 % des angebotenen L-Serins verwerten konnte, konnte der Stamm 13032WT pJC1_ *sdaA*-P lediglich 48 % des L-Serins metabolisieren. Dies deutet darauf hin, dass mit dem Vektor pJC1_ *sdaA*-P, in dem das *sdaA*-Gen unter dem eigenen Promotor exprimiert wird, eine geringere Enzymmenge gebildet wird. Dagegen zeigten die Δ *sdaA*-Mutante mit Leervektor und der Wildtyp mit Leervektor, wie erwartet, keinen L-Serin-Abbau. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass *C. glutamicum* nur dann mit L-Serin als einziger C-Quelle wachsen kann, wenn *sdaA* überexprimiert wird. Weiterhin lassen die Experimente den Schluss zu, dass die Fähigkeit L-Serin als C-Quelle zu nutzen, mit dem Expressionsniveau des *sdaA*-Gens korreliert.

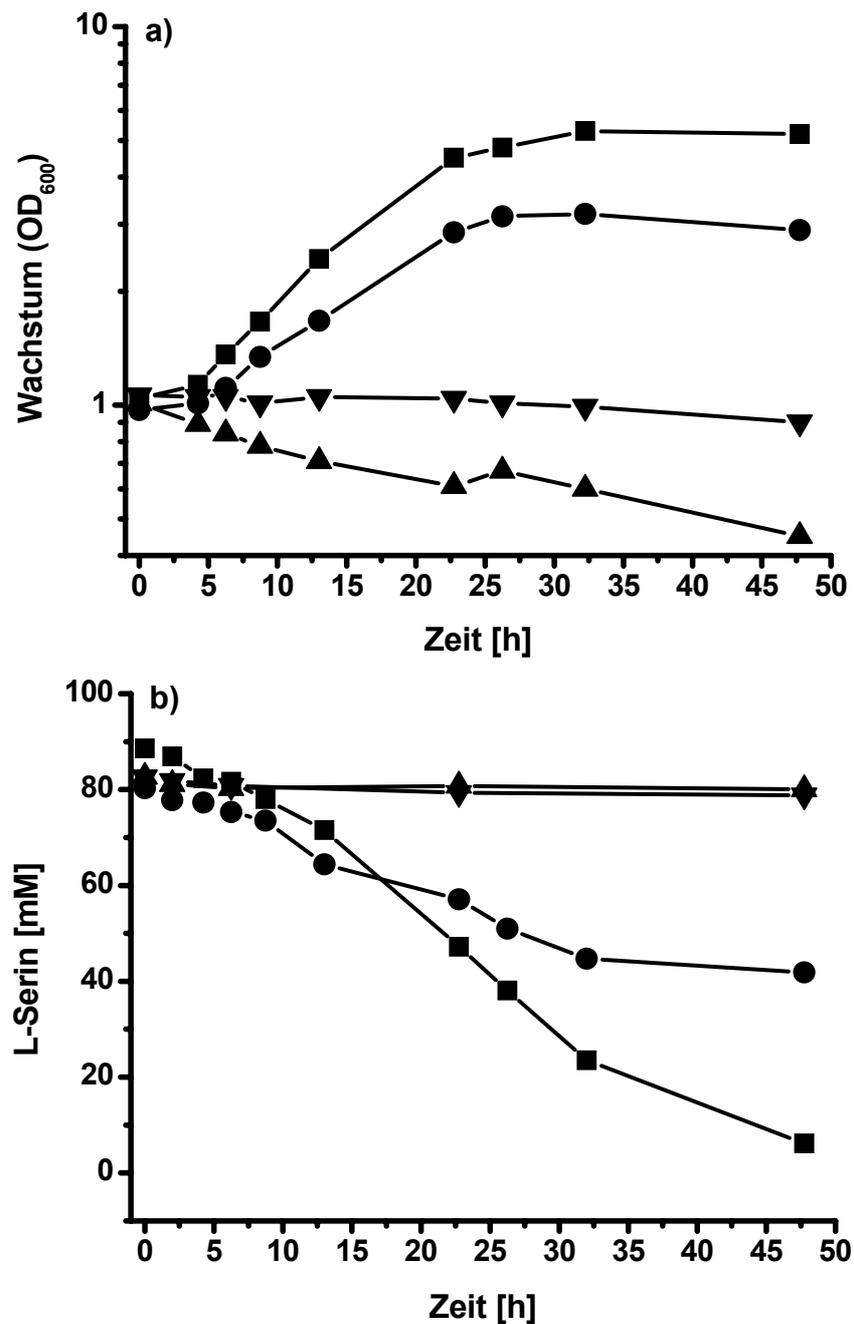


Abb. 14: Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme 13032WT pXMJ19_sdaA (■), WT pJC1_sdaA (●), WT pXMJ19 (▼) und 13032ΔsdaA pJC1 (▲) in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM L-Serin. Dargestellt ist **a)** das Wachstum und **b)** der Verlauf der L-Serin-Konzentration.

Obwohl *C. glutamicum* Wildtyp mit L-Serin als einziger C-Quelle nicht wachsen konnte, legen die in Kapitel IV2.1 gezeigten Ergebnisse nahe, dass bei Wachstum auf Glucose L-Serin verstoffwechselt werden kann. Um dies zu bestätigen und zu untersuchen, ob die L-Serindehydratase auch im Wildtyp am Abbau von L-Serin

beteiligt ist, wurden Wachstumsversuche durchgeführt, in denen die Stämme 13032WT pXMJ19, 13032 $\Delta sdaA$ pXMJ19 sowie 13032WT pXMJ19_ *sdaA* in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin kultiviert wurden (Abb. 15).

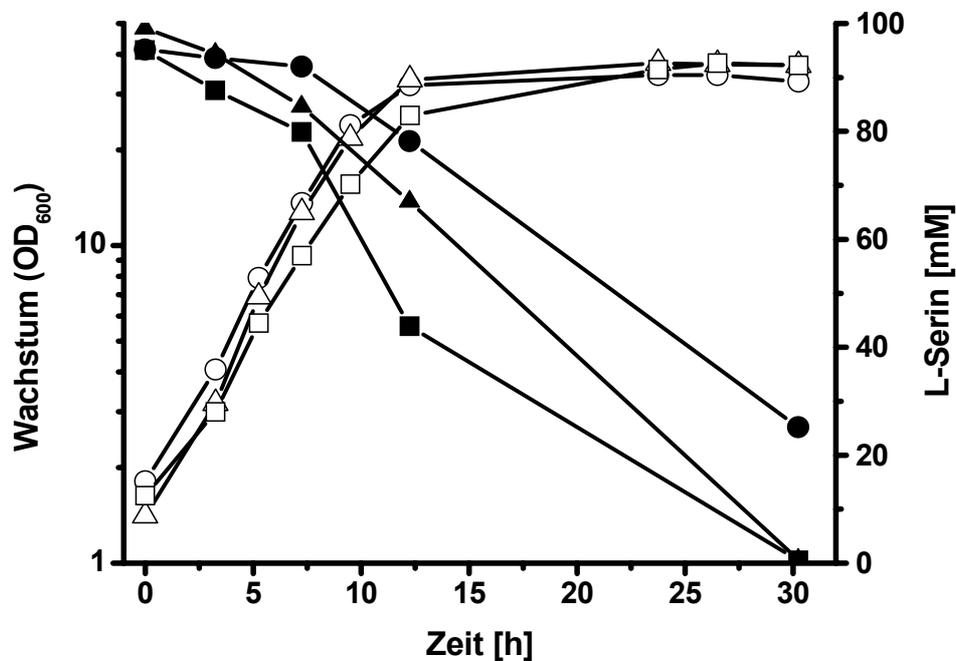


Abb. 15: Wachstum und L-Serin-Abbau bei Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme 13032 $\Delta sdaA$ (● ○), 13032WT pXMJ19_ *sdaA* (■ □) und 13032WT (▲ △) in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin. Der Verlauf des Wachstums (offene Symbole) ist logarithmisch und der Verlauf der L-Serin-Konzentration (geschlossene Symbole) ist linear über die Zeit dargestellt.

Aus dem in Abbildung 15 dargestellten Experiment wird deutlich, dass alle drei Stämme unter diesen Bedingungen ein vergleichbares Wachstum zeigten. Obwohl der Wildtyp nicht mit L-Serin als einziger C-Quelle wachsen kann, ist er in der Lage in Anwesenheit von Glucose das angebotene L-Serin zu metabolisieren. Die eingesetzte Glucose war schon nach 12,25 h vollständig verbraucht (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten konnte auch für den Stamm 13032WT pXMJ19_ *sdaA* beobachtet werden. Weiterhin war auch die $\Delta sdaA$ -Mutante unter diesen Bedingungen trotz der Inaktivierung des *sdaA*-Gens noch in der Lage, L-Serin abzubauen, wobei die angebotene Glucose erst nach 30,25 h vollständig verstoffwechselt worden war. Um die Abbauraten zu bestimmen, wurde die L-Serin-Konzentration gegen die entsprechende OD₆₀₀ aufgetragen (Abb. 16). Aus

den erhaltenen Geraden konnte die L-Serin-Abbaurrate ermittelt werden. Unter Einbeziehung der Korrelation OD_{600} : Zell-Trockengewicht ($OD_{600} = 1$ entspricht 0,3 g/l Zell-Trockengewicht) ergaben sich die in die Zeichnung eingefügten Zahlen.

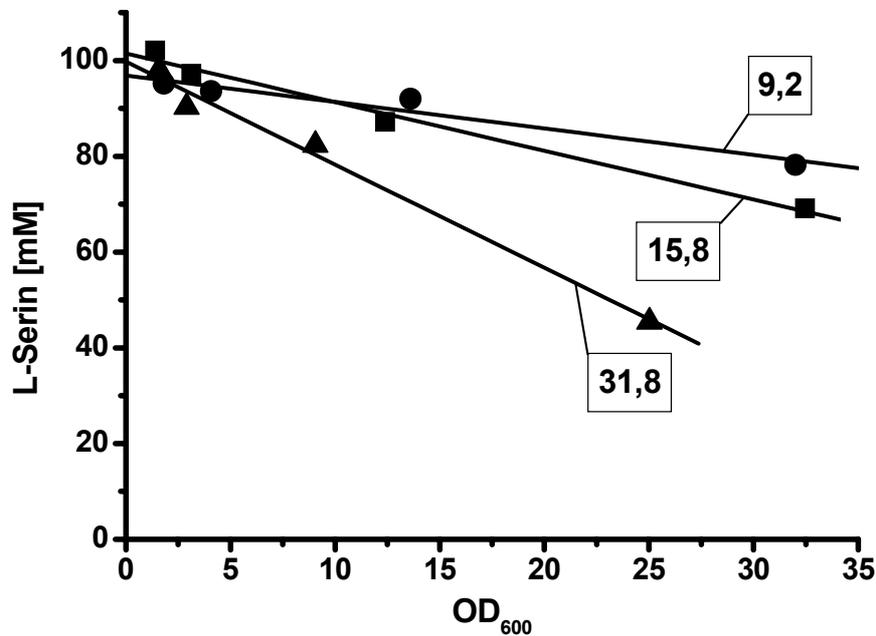


Abb. 16: Serin-Abbauraten der *C. glutamicum*-Stämme 13032ΔsdaA (●), 13032WT pXMJ19_sdaA (▲) und 13032WT (■) in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin. Die Abbauraten wurden für die ersten 12,25 h der Kultivierung bestimmt. Die im Diagramm angegebenen Zahlen geben die spezifischen L-Serin-Abbauraten unter Einbeziehung der Korrelation OD_{600} : Zell-Trockengewicht an und besitzen die Einheit [nmol × mg TG⁻¹ × min⁻¹].

Die in Abbildung 16 dargestellten Werte zeigen, dass die Überexpression des *sdaA*-Gens zu einer drastischen Steigerung der spezifischen L-Serin-Abbaurrate um 101 % im Vergleich zum Wildtyp führte. Demgegenüber war die spezifische L-Serin-Abbaurrate in der ΔsdaA-Mutante im Vergleich zum Wildtyp um 42 % reduziert. Darüber hinaus konnte mit diesem Experiment bestätigt werden, dass das Expressionsniveau des *sdaA*-Gens mit der Fähigkeit, L-Serin zu metabolisieren, korreliert. Diese Daten machen deutlich, dass das Genprodukt von *sdaA*, die L-Serindehydratase, maßgeblich am L-Serin-Abbau in *C. glutamicum* beteiligt ist. Die Tatsache, dass auch in der ΔsdaA-Mutante noch ein deutlicher L-Serin-Abbau vorhanden war, kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass in *C. glutamicum* noch weitere, bisher nicht gezeigte L-Serin abbauende Enzyme vorhanden sind und zum anderen L-Serin zur Proteinsynthese verwendet wird.

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, hatte weder die Inaktivierung noch die Überexpression des *sdaA*-Gens bei Wachstum mit Glucose und L-Serin einen deutlichen Phänotyp. Um zu testen ob sich die Mutanten bei Wachstum mit Glucose als einziger C-Quelle physiologisch unterscheiden, wurden die Stämme 13032 Δ *sdaA*, 13032WT und 13032 WT pXMJ19_*sdaA* in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose kultiviert (Abb. 17).

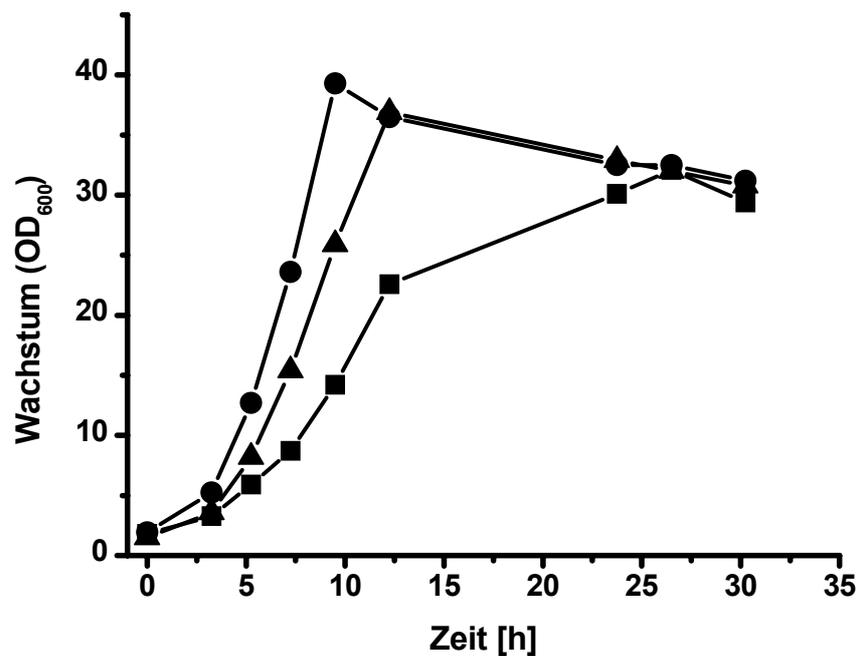


Abb. 17: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032 Δ *sdaA* (●), 13032 Δ *sdaA* pXMJ19_*sdaA* (■) und 13032WT (▲) in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose als einziger C-Quelle.

Hier zeigte sich überraschenderweise, dass die Überexpression von *sdaA* im Wildtyp zu einer Reduktion der Wachstumsrate um 36 % auf $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$ führte, wogegen sowohl der Wildtyp als auch die Δ *sdaA*-Mutante mit Glucose als einziger C-Quelle vergleichbare Wachstumsraten von $\mu = 0,36 \text{ h}^{-1}$ bzw. $\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$ erreichten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die verstärkte Expression von *sdaA* das gebildete L-Serin deutlich schneller zu Pyruvat umgesetzt wird als im Wildtyp bzw. der Δ *sdaA*-Mutante. Dies wäre für den Überexpressions-Stamm in zweierlei Hinsicht nachteilig. Durch die verstärkte Aktivität der L-Serindehydratase würde aus Glucose gebildetes L-Serin verstärkt zu Pyruvat umgesetzt, was zur Folge hätte, dass weniger L-Serin als Vorstufe für anabole Reaktionen verfügbar wäre. Darüber

hinaus könnte die erhöhte L-Serindehydratase-Aktivität dazu führen, dass Glucose vermehrt in den L-Serin-Biosyntheseweg einfließt, um den L-Serin-Pool konstant zu halten und demzufolge in verringertem Maße über die Glykolyse verstoffwechselt würde. Somit würde die ATP-bildende Pyruvatkinase-Reaktion umgangen werden. Demgegenüber würde bei der Synthese von Pyruvat aus L-Serin kein ATP gewonnen, sondern ein Molekül NADH verbraucht werden. Die Überexpression von *sdaA* könnte somit auch einen energetischen Nachteil für die Zelle bedeuten.

Um die spezifischen L-Serindehydratase-Aktivitäten in den zuvor physiologisch untersuchten *C. glutamicum*-Stämmen zu bestimmen, wurden diese in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet.

Tab. 19: Spezifische L-Serindehydratase-Aktivitäten in Rohextrakten verschiedener *C. glutamicum*-Stämme. Die Zellen wurden in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin kultiviert.

Stamm	Spezifische Aktivität [mU/mg]
$\Delta sdaA$ pXMJ19	0,71 \pm 0,9
WT pXMJ19	0,96 \pm 0,6
$\Delta sdaA$ pXMJ19_ <i>sdaA</i>	203,5 \pm 18,2
WT pXMJ19_ <i>sdaA</i>	210,7 \pm 8,7

Wie in Enzymtests mit Rohextrakten der $\Delta sdaA$ -Mutante mit Leervektor deutlich wurde (Tab. 19), konnte in Abwesenheit des *sdaA*-Gens nur eine Restaktivität von 0,71 mU/mg nachgewiesen werden. Diese könnte z. B. auf die ebenfalls im Rohextrakt vorhandene Threonindehydratase als Nebenaktivität zurückzuführen sein. In Rohextrakten des Wildtyps mit Leervektor wurde wiederholt nur eine unwesentlich höhere Enzymaktivität nachgewiesen. Dies könnte z. B. durch eine noch unbekannt Regulation bedingt sein. Diese Ergebnisse sind im Einklang damit, dass beide Stämme nicht in der Lage sind mit L-Serin als einziger C-Quelle zu wachsen. Dagegen konnten in Rohextrakten der Stämme die *sdaA* überexprimieren, $\Delta sdaA$ pXMJ19_*sdaA* und WT pXMJ19_*sdaA*, spezifische Aktivitäten von ca. 204 bzw. 211 mU/mg erhalten werden. Anhand der Wachstumsrate der *sdaA*-Überexpressions-Stämme in CGXII-Minimalmedium wurde abgeschätzt, dass eine spezifische Aktivität von ca. 50 mU/mg unter diesen Bedingungen zum Wachstum

notwendig ist. Somit ist die vorhandene spezifische Aktivität ausreichend um Wachstum auf L-Serin zu ermöglichen.

3.2 Nachweis und biochemische Charakterisierung der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum*

Da es bisher keine biochemischen Untersuchungen zur L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* gibt und ferner das verwandte Enzym aus *E. coli* bisher noch nicht aufgereinigt werden konnte, sollte das Enzym aus *C. glutamicum* gereinigt und charakterisiert werden.

3.2.1 Versuche zur Aufreinigung der L-Serindehydratase

3.2.1.1 Heterologe Expression in *E. coli*

Um die L-Serindehydratase aufzureinigen, wurde das *sdaA*-Gen mittels PCR und der Primerkombination *sdaA_for_his2/sdaA_rev_his2* aus *C. glutamicum* 13032WT amplifiziert und *in frame* hinter eine für einen His₆-tag kodierende Sequenz kloniert, so dass bei der Expression eine L-Serindehydratase mit N-terminalem His₆-tag gebildet wird. Dies sollte die Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätssäule ermöglichen. Das resultierende Plasmid pET28a_hisN_*sdaA* wurde durch Restriktionskartierung und anschließende Sequenzierung verifiziert und zur Synthese des rekombinanten Proteins in den Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET28a_hisN_*sdaA* wurde in LB-Medium kultiviert, wobei die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Wie sich durch Fraktionierung experimentell zeigen ließ, lag das Fusionsprotein vollständig in Form von Aggregaten (*inclusion bodies*) im Zentrifugations-Sediment vor. Versuche, die Bildung der Aggregate durch Variation der Kultivierungsbedingungen oder Zugabe von Arginin (Schäffner *et al.*, 2001) zu reduzieren, führten nicht zum Erfolg. Es war somit notwendig, die Aufreinigung unter stark denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 6 M Guanidiniumhydrochlorid durchzuführen (Abb. 18).

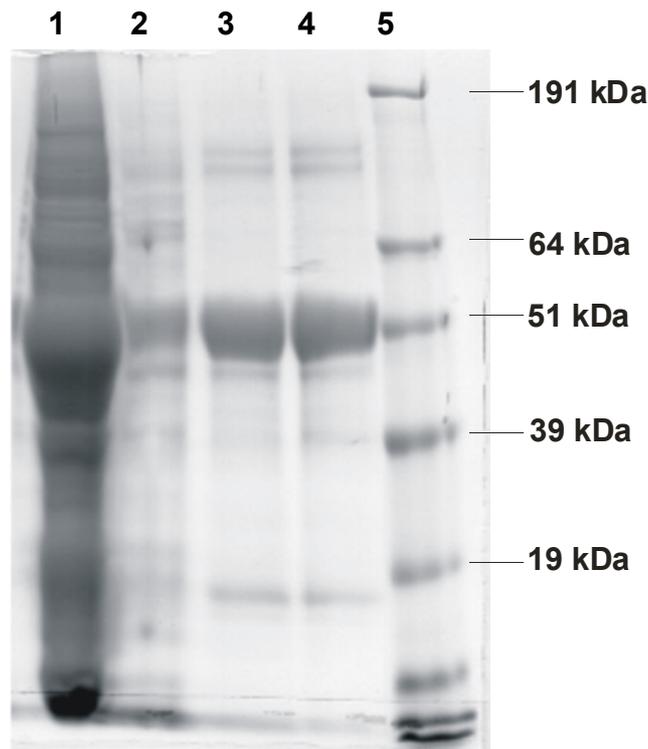


Abb. 18: SDS-PAGE-Analyse verschiedener Fraktionen bei der Aufreinigung der L-Serindehydratase mit N-terminalem His₆-tag unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid.

- Spur 1: Durchfluss
- Spur 2: Waschfraktion 1
- Spur 3: Eluat, Fraktion 1
- Spur 4: Eluat, Fraktion 2
- Spur 5: Protein-Standard

In Abbildung 18 ist in den Elutionsfraktionen (Spur 3 + 4) eine dominante Bande von ca. 51 kDa zu erkennen, was der kalkulierten Masse der L-Serindehydratase von 53 kDa entspricht. Um zu bestätigen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um die rekombinante L-Serindehydratase handelt, wurde die entsprechende Proteinbande ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide nach Elution aus dem Gel durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. 11 Peptide konnten im zugehörigen Massenspektrum eindeutig nachgewiesen werden (entspricht 36 % Abdeckung der Aminosäuresequenz), was aufgrund der hohen Massengenauigkeit für eine eindeutige Identifizierung des Proteins ausreichte. Somit war es möglich, das L-Serindehydratase Fusionsprotein unter den gewählten Bedingungen aus den *inclusion bodies* anzureichern.

Um das Guanidiniumhydrochlorid zu entfernen und das denaturierte Protein zu rekonstituieren, wurde die Proteinlösung nach der Aufreinigung gegen einen Renaturierungspuffer dialysiert. Nach der Dialyse betrug die Proteinkonzentration der Lösung 88 µg/ml. In einem anschließend durchgeführten Enzymtest konnte jedoch keine spezifische L-Serindehydratase-Aktivität nachgewiesen werden. Dieser Befund legt nahe, dass die Rekonstitution des denaturierten Proteins nicht erfolgreich war, oder dass das Fusionsprotein durch Anwesenheit des N-terminalen His₆-tag inaktiviert wird. Um dies zu überprüfen, wurde ein 1565 bp Fragment, welches das hisN_sdaA-Fusionskonstrukt enthält, aus dem Plasmid pET28a_hisN_sdaA in den corynebakteriellen Expressionsvektor pXMJ19 kloniert. Der resultierende Vektor pXMJ19_hisN_sdaA wurde nach Restriktionskartierung mittels Elektroporation in den *C. glutamicum*-Stamm 13032ΔsdaA eingebracht. Ausgehend von der Annahme, dass die Überexpression des sdaA-Fusionskonstruktes zur Produktion eines funktionellen L-Serindehydratase-Fusionsproteins führt, sollte der Stamm 13032 ΔsdaA pXMJ19_hisN_sdaA in der Lage sein, mit L-Serin als einziger C-Quelle zu wachsen. Wie jedoch Wachstumsexperimente zeigten, konnte der Stamm nicht in L-Serin-Minimalmedium wachsen (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Fusion der L-Serindehydratase mit einem N-terminalen His₆-tag zur Inaktivierung des Enzyms oder zur Bildung enzymatisch inaktiver Aggregate führte.

3.2.1.2 Homologe Expression in *C. glutamicum*

Da durch die zuvor erläuterte Expression des hisN_sdaA -Fusionskonstruktes kein aktives Protein erhalten werden konnte, wurden neue Konstrukte hergestellt, bei denen die L-Serindehydratase mit einem C-terminalen His₆-tag bzw. einem C-terminalen Strep-tagII fusioniert wurde. Durch die homologe Expression in *C. glutamicum* sollte die Bildung von *inclusion bodies* vermieden werden.

Zur Produktion des His₆-tag-Fusionsproteins wurde das Plasmid pVWEx1_sdaA_hisC konstruiert. Dazu wurde das sdaA-Gen mit der Primerkombination sdaA_tag_for/sdaA_hisC_rev (Tab. 3) durch PCR amplifiziert. Durch die Wahl des reverse-Primers wurde das Stop-Codon ersetzt und das Gen um eine für den His₆-tag kodierende Sequenz verlängert. Das so entstandene sdaA_hisC-Konstrukt wurde in den corynebakteriellen IPTG-induzierbaren Expressionsvektor pVWEx1 kloniert. Das resultierende Plasmid pVWEx1_sdaA_hisC

wurde durch Restriktionskartierung verifiziert und anschließend durch Elektroporation in die *C. glutamicum*-Stämme 13032 Δ *sdaA* und 13032WT eingebracht. Da sich die Anwesenheit eines C-terminalem His₆-tag möglicherweise negativ auf die Funktionalität des Proteins auswirken könnte, wurde alternativ dazu das Plasmid pVWEx1_*sdaA*-strepC konstruiert, mit dessen Hilfe die L-Serindehydratase über StrepTactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden sollte. Hierzu wurde das *sdaA*-Gen mit der Primerkombination *sdaA*_tag_for/*sdaA*_strepC_rev mittels PCR amplifiziert, wobei durch die Wahl des reverse-Primers das Stop-Codon durch eine Strep-tagII kodierende Sequenz ersetzt wurde. Das Konstrukt wurde in den Vektor pVWEx1 kloniert, wodurch das Plasmid pVWEx1_*sdaA*_strepC erhalten wurde. Dieses wurde durch Restriktionskartierung kontrolliert und mittels Elektroporation in *C. glutamicum* 13032 Δ *sdaA* und 13032WT eingebracht. Der Vorteil dieses homologen Expressionssystems liegt darin, dass die Funktionalität der rekombinanten Proteine nun in Komplementationsversuchen überprüft werden konnte. Dabei sollte die L-Serindehydratase-negative Δ *sdaA*-Mutante in Anwesenheit der Plasmide pVWEx1_*sdaA*_hisC und pVWEx1_*sdaA*_strepC wieder in der Lage sein, mit L-Serin als einziger C-Quelle zu wachsen, falls die exprimierten Fusionsproteine *in vivo* aktiv sind. Um dies zu prüfen, wurden die *C. glutamicum*-Stämme 13032 Δ *sdaA*, 13032 Δ *sdaA* pVWEx1_*sdaA*_hisC und 13032 Δ *sdaA* pVWEx1_*sdaA*_strepC auf CGXII-Minimalmedium Agarplatten mit 100 mM L-Serin und 1 mM IPTG ausgestrichen (Abb. 19).

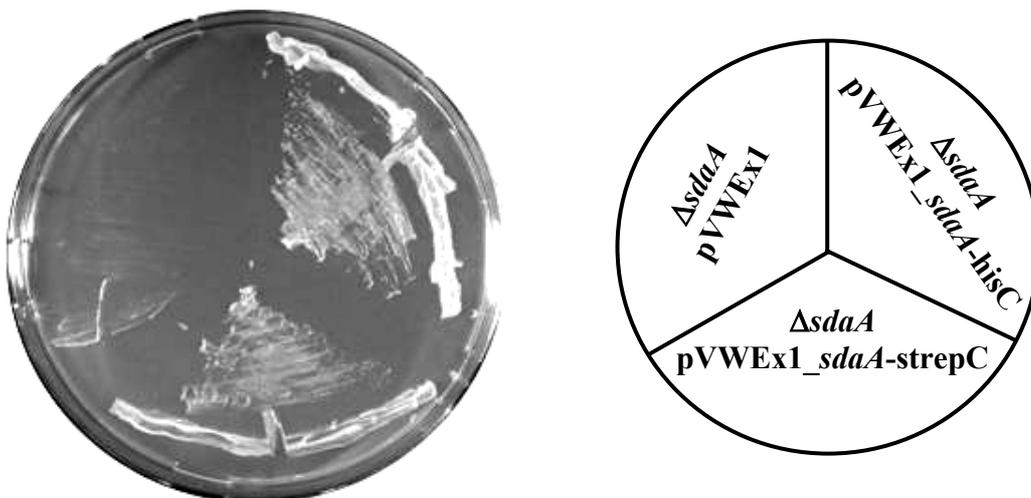


Abb. 19: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032 Δ *sdaA*, 13032 Δ *sdaA* pVWEx1_*sdaA*_hisC und 13032 Δ *sdaA* pVWEx1_*sdaA*_strepC auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten mit 100 mM L-Serin als einziger C-Quelle.

Aus Abbildung 19 wird deutlich, dass beide Plasmide, pVWEx1_ *sdaA*-hisC und pVWEx1_ *sdaA*-strepC, in der Lage sind, die Δ *sdaA*-Mutante auf L-Serin-Minimalmedium Agarplatten zu komplementieren, was zeigt, dass weder das Strep-tagII noch das His₆-tag die Aktivität der Proteinkomplexe beeinträchtigen. Weiterhin konnte in Enzymtests gezeigt werden, dass die Konstrukte auch *in vitro* Aktivität besitzen (Tab. 20). Somit stellen diese funktionellen L-Serindehydratase Fusionsproteine die Basis für eine nachfolgende Aufreinigung dar.

Tab. 20: Spezifische L-Serindehydratase-Aktivitäten in Rohextrakten der *C. glutamicum*-Stämme Δ *sdaA* pVWEx1_ *sdaA*_hisC und Δ *sdaA* pVWEx1_ *sdaA*_strepC. Die Zellen wurden in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin kultiviert.

Stamm	Spezifische Aktivität [mU/mg]
Δ <i>sdaA</i> pVWEx1_ <i>sdaA</i> _hisC	73,62
Δ <i>sdaA</i> pVWEx1_ <i>sdaA</i> _strepC	147,83

Mit dem Stamm 13032 Δ *sdaA* pVWEx1_ *sdaA*_hisC wurde zunächst versucht, die L-Serindehydratase mit C-terminalem His₆-tag über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufzureinigen. Die Durchführung erfolgte wie unter 7.3.2 beschrieben. Dabei zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen kein Protein von ca. 51 kDa, was der Masse des L-Serindehydratase Fusionsproteins entsprechen würde, durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Da die funktionelle Expression des Gens durch Komplementation und Enzymtests gezeigt wurde, ist zu vermuten, dass der His₆-tag des rekombinanten Proteins in nativem Zustand nicht für das Säulenmaterial zugänglich ist und sich das Protein im Durchfluss befindet. In einem parallelen Ansatz wurde eine StrepTactin-Affinitätschromatographie mit Rohextrakt des Stammes 13032 Δ *sdaA* pVWEx1_ *sdaA*_strep durchgeführt, um die mit einem C-terminalen Strep-tagII fusionierte L-Serindehydratase aufzureinigen. Dabei wurde wie in Material und Methoden (Kap. III7.2.3) beschrieben vorgegangen. Die nach Elution mit Biotin erhaltenen Fraktionen wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei für das L-Serindehydratase-Fusionsprotein eine Bande von ca. 53 kDa erwartet wurde (Abb. 20).

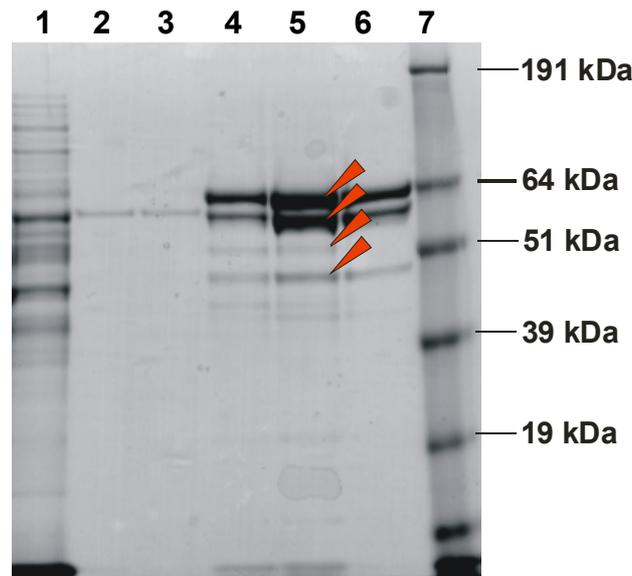


Abb. 20: SDS-PAGE-Analyse verschiedener Fraktionen bei der Aufreinigung der L-Serindehydratase mit C-terminalem Strep-tagII. Die Auftrennung erfolgte in einem 10 %igen SDS-Gel. Die mittels MALDI-TOF analysierten Banden sind mit Pfeilen markiert.

Spur 1: Waschfraktion 3
 Spur 2: Waschfraktion 8
 Spur 3: Eluat, Fraktion 2
 Spur 4: Eluat, Fraktion 3

Spur 5: Eluat, Fraktion 4
 Spur 6: Eluat, Fraktion 8
 Spur 7: Protein-Standard

Wie die beiden in Abbildung 20 erkennbaren dominanten Banden zeigen, waren zwei Proteine von ca. 63 und 58 kDa Masse aufgereinigt worden. Darüber hinaus waren noch zwei weitere Banden zu erkennen, die auf Proteine mit einer Masse von ca. 52 bzw. 49 kDa hinwiesen. Da die kalkulierte Proteingröße der L-Serindehydratase von der entsprechenden im Gel ermittelten Größe aufgrund des Laufverhaltens abweichen kann, wurde vermutet, dass es sich bei einer der beiden schwächeren Banden um die rekombinante L-Serindehydratase handelt. Um dies zu prüfen wurden sowohl diese, als auch die beiden dominanten Banden im Gel mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden jedoch alle Banden als Untereinheiten der Acyl-CoA-Carboxylase identifiziert (Tilg, 2002). Darüber hinaus zeigte diese Fraktion auch im Enzymtest keine spezifische L-Serindehydratase-Aktivität. Somit liegt auch im Falle dieses Fusionsproteins die Vermutung nahe, dass unter nativen Bedingungen der Strep-tagII ebenso wie der His₆-tag nicht für das Säulenmaterial zugänglich war und demzufolge eine Aufreinigung verhinderte.

3.2.2 Charakterisierung der L-Serindehydratase in Rohextrakten von *C. glutamicum*

3.2.2.1 Etablierung des L-Serindehydratase-Enzymtests

Da es nicht gelungen war, die L-Serindehydratase aufzureinigen, wurde im Folgenden das Enzym in Rohextrakten von *C. glutamicum* charakterisiert. Hierzu wurde ein diskontinuierlicher Test etabliert, bei dem das aus L-Serin gebildete Pyruvat nach Derivatisierung mit 2-Hydroxy-6,7-dimethoxy-3-methylquinoxalin direkt chemisch nachgewiesen werden kann. Diese Methode ist sehr empfindlich und hochselektiv für die Bestimmung von α -Ketosäuren wie z. B. Pyruvat oder α -Ketobutyrat (Ohmori *et al.*, 1991). Mit diesem Test gelang es, in Rohextrakten des Stammes 13032WT pXMJ19_ *sdaA* eine spezifische Aktivität von 6,3 mU/mg bei einer Inkubationsdauer von 30 min nachzuweisen. Daraufhin wurde der Enzymtest optimiert. Dazu wurde zunächst im *sdaA*-Überexpressions-Stamm *C. glutamicum* 13032WT pXMJ19_ *sdaA* die Abhängigkeit der L-Serindehydratase-Aktivität von der Inkubationszeit untersucht. Hierzu wurde der Stamm in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin kultiviert. Die Zellernte erfolgte in der exponentiellen Phase und der Zellaufschluss wurde anschließend mittels Ultraschallbehandlung durchgeführt. Der Rohextrakt wurde mit einer Proteinkonzentration von 2,1 mg/ml in den Test eingesetzt und die Zeitabhängigkeit der Reaktion untersucht. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, war ein linearer Reaktionsverlauf nur innerhalb der ersten 10 min gegeben. Dies ist möglicherweise auf eine geringe Stabilität des Enzyms zurückzuführen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Reaktionszeit zur Bestimmung von L-Serindehydratase-Aktivitäten auf 10 min begrenzt. Darüber hinaus sollte auch eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Proteinmenge gezeigt werden. Es zeigte sich, dass bei Proteinkonzentrationen zwischen ca. 10 und 120 μ g/ml Reaktionsansatz Linearität vorhanden war. Bei einer Verringerung der Proteinkonzentration auf ca. 6 μ g/ml konnte jedoch keine Pyruvatbildung mehr beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* durch Verdünnung inaktiviert wurde. Ein vergleichbarer Effekt ist auch für das Enzym aus *E. coli* beschrieben (Newman und Kapoor, 1980). Somit konnte gezeigt werden, dass bei Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 120 μ g/ml Reaktionsansatz keine Limitierung vorhanden ist.

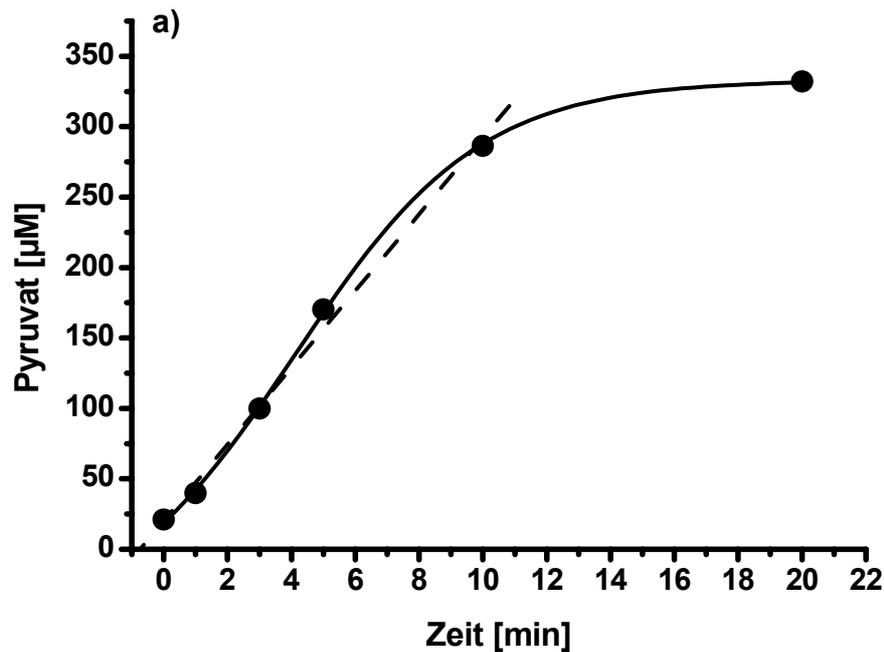


Abb. 21: Spezifische L-Serindehydratase-Aktivität in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die unterbrochene Linie stellt den linearen Bereich dar.

3.2.2.2 Charakterisierung der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum*

Zur Bestimmung der Affinität der L-Serindehydratase zum Substrat L-Serin wurde eine Kinetik mit L-Serin-Konzentrationen von 0 - 500 mM erstellt. Dabei zeigte sich, dass die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Substrat L-Serin nicht einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik entspricht, da sich bei der Darstellung der Messwerte im Eadie-Hofstee-Diagramm zwei Steigungen und somit zwei unterschiedliche apparente K_m -Werte ermitteln lassen (Abb. 22b). Für niedrige Substratkonzentrationen bis 50 mM konnte ein apparenter K_m -Wert von ca. 10 mM und für hohe Substratkonzentrationen zwischen 50 - 500 mM von ca. 90 mM bestimmt werden, was eine drastisch verminderte Affinität des Enzyms zum Substrat zeigt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass L-Serin in den außerordentlich hohen Konzentrationen den Test beeinflusst. Anhand der Michaelis-Menten-Darstellung (Abb. 22a) konnte ein K_m -Wert von $67 (\pm 17)$ mM L-Serin und ein v_{max} -Wert von $405 (\pm 34)$ nmol Pyruvat/min/mg Protein ermittelt werden.

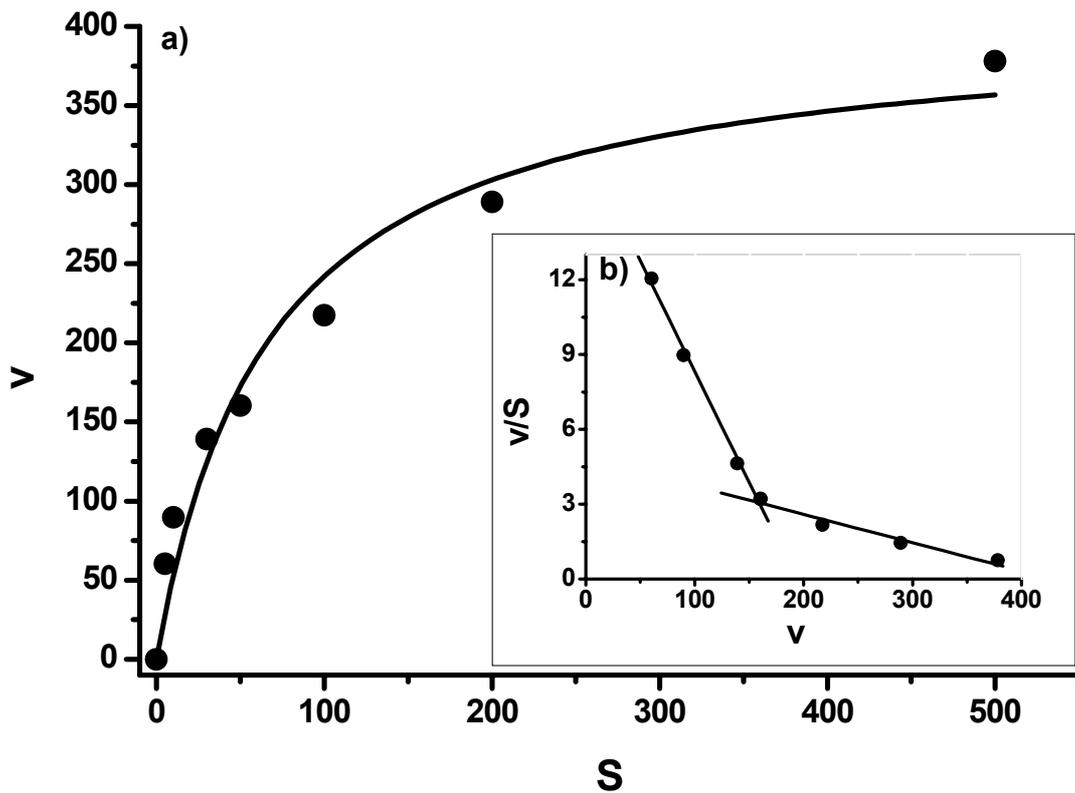


Abb. 22: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v [nmol/min/mg]) der L-Serindehydratase von der als Substrat (S [mM]) eingesetzten L-Serinkonzentration. **a)** Michaelis-Menten-Darstellung, **b)** Eadie Hofstee-Darstellung.

Während die Pyridoxalphosphat-abhängigen L-Serindehydratasen weniger spezifisch zu sein scheinen und neben L-Serin auch andere Substrate wie L-Threonin desaminieren können (Grabowski *et al.*, 1993), zeigten alle bisher beschriebenen L-Serindehydratasen der Fe-S-Cluster-Familie eine hohe Substratspezifität für L-Serin (Sawers, 1998). In Rohextrakten von *C. glycinophilum* wurde jedoch auch mit L-Threonin als Substrat Aktivität nachgewiesen, woraus gefolgert wurde, dass die L-Serindehydratase in diesem Organismus beide Aminosäuren als Substrate nutzen kann (Kubota, 1984).

Um die Substratspezifität der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden Enzymtests durchgeführt, in denen neben L-Serin und L-Threonin auch die jeweiligen Stereoisomere als Substrat eingesetzt wurden (Tab. 21). Die Desaminierung von L-Threonin führt zur Bildung von 2-Ketobutyrat, einer Ketosäure, die ebenfalls mit der für L-Serin etablierten Methode nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich, dass die L-Serindehydratase von *C. glutamicum* eine

hohe Spezifität für L-Serin als Substrat besitzt. Weder mit D-Serin noch mit L-Threonin und dessen Stereoisomeren konnte eine signifikante Aktivität nachgewiesen werden. Dies ist ein weiteres Indiz für die Zugehörigkeit des *C. glutamicum*-Enzyms zur Gruppe der Fe-S-Cluster-Proteine.

Tab. 21: Untersuchung der L-Serindehydratase-Aktivität mit verschiedenen Substraten. 100 % Aktivität entsprachen der mit 50 mM L-Serin bestimmten spezifischen Aktivität von 166,5 mU.

50 mM Substrat	Aktivität [%]
L-Serin	100
D-Serin	1,6
L-Threonin	0
D-Threonin	0,6
L-allo-Threonin	0,4
D-allo-Threonin	0,8

Für L-Serindehydratasen sind verschiedene Inhibitoren beschrieben. So wird das Enzym aus *Corynebacterium* sp. effektiv durch L-Alanin, L-Cystein und D-Serin gehemmt (Morikawa *et al.*, 1974). Das Enzym aus *C. sticklandii* wird ebenfalls durch L-Cystein und D-Serin gehemmt und darüber hinaus zu 97 % durch den Komplexbildner EDTA gehemmt (Zinecker *et al.*, 1998). Im Folgenden wurden diese Effektoren hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Aktivität der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* untersucht (Tab. 22). Überraschenderweise hatte die Anwesenheit von EDTA keinen signifikanten hemmenden Effekt auf die Enzymaktivität. Weiterhin wurde festgestellt, dass ein Enzymtest mit Rohextrakt, der in Abwesenheit von FeSO₄ hergestellt worden war, noch eine spezifische L-Serindehydratase-Aktivität von 91,6 mU/mg aufweist und somit lediglich auf 48,1 % reduziert ist. Ein starker inhibierender Effekt konnte bei Zugabe von L-Cystein beobachtet werden. Schon eine Konzentration von 1 mM L-Cystein reduzierte die spezifische Aktivität um ca. 23 %. Dieser Effekt verstärkte sich bei steigender Effektor-Konzentration. In Anwesenheit von 50 mM L-Cystein war die Aktivität um ca. 81 % reduziert. Somit ist L-Cystein ein Inhibitor der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum*. Auch hohe D-Serin-Konzentrationen hatten einen schwachen

inhibierenden Effekt. Während mit 10 mM noch 90 % Aktivität nachweisbar waren, führte die Zugabe von 50 mM zu einem Aktivitätsverlust von ca. 24 %.

Tab. 22: Einfluss verschiedener Effektoren auf die L-Serindehydratase-Aktivität. 100 % Aktivität entsprachen der mit 50 mM L-Serin als Substrat in Abwesenheit eines Effektors bestimmten spezifischen Aktivität von 191 mU.

Effektor	Konzentration [mM]	Aktivität [%]
--		100 %
ohne Fe ²⁺		48
EDTA	5	94
	1	77
L-Cystein	10	42
	50	19
	1	101
D-Serin	10	91
	50	76

In Rohextrakten von *C. glutamicum* Wildtyp konnte keine signifikante L-Serindehydratase-Aktivität nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die Enzymaktivität von der Wachstumsphase abhängig ist, wurde der Stamm 13032WT in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin kultiviert. Dabei wurde in verschiedenen Wachstumsphasen die L-Serindehydratase-Aktivität bestimmt (Abb. 23). Dabei zeigt sich, dass die spezifische Aktivität in der mittleren (nach 4 h) und späten (nach 8,75 h) exponentiellen Phase mit 0,75 bzw. 0,84 mU/mg den zuvor für den Wildtyp mit Leervektor ermittelten Werten entspricht (Tab. 19). Bis zur stationären Phase (nach 23,15 h) war die spezifische Aktivität lediglich auf 1,04 mU/mg angestiegen. Erst in der späten stationären Phase (nach 33,75 h) war eine um mehr als 2,5-fach angestiegene spezifische Aktivität von 2,04 mU/mg nachzuweisen. Dieser Verlauf der Aktivität zeigt, dass das Enzym keine wesentliche Rolle bei Wachstum unter diesen Bedingungen spielt und offensichtlich nicht zu den „housekeeping“-Enzymen gehört, die ganz wesentlich für die Funktion der Zelle sind. Trotzdem zeigten die im folgenden Kapitel dargestellten Experimente, dass die L-Serindehydratase für die Produktbildung von großer Bedeutung ist.

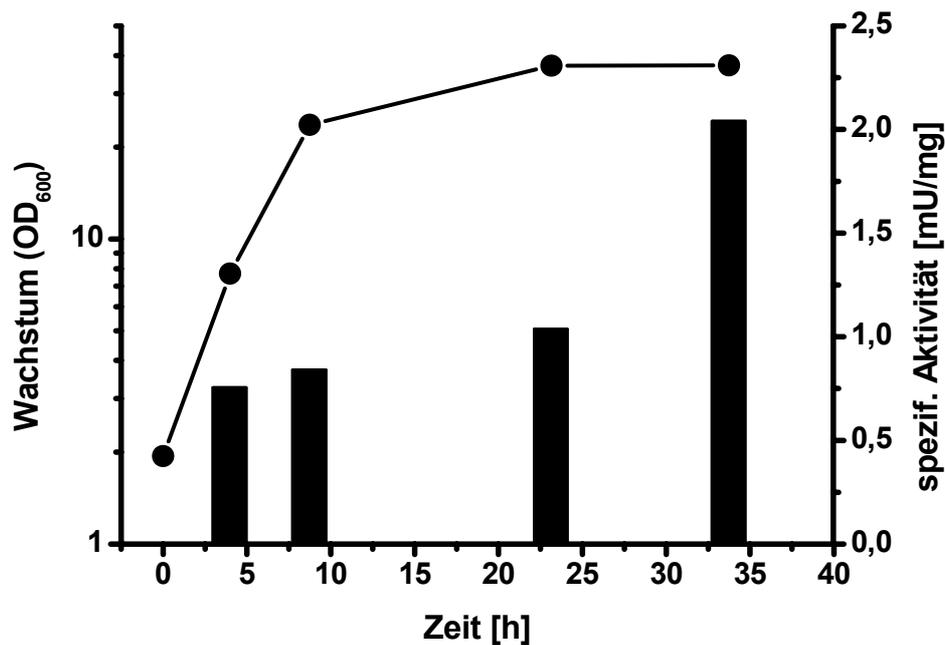


Abb. 23: Spezifische L-Serindehydratase-Aktivität (Säulen) in Rohextrakten von *C. glutamicum* 13032WT, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums (●) in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose und 100 mM L-Serin hergestellt wurden.

4. Untersuchungen zur L-Serin-Bildung mit *C. glutamicum*

4.1 L-Serin-Bildung in L-Serindehydratase-negativen Stämmen

Wie zuvor gezeigt werden konnte, ist die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* maßgeblich am Abbau von L-Serin beteiligt. Demzufolge könnte die Inaktivierung dieses Enzyms zu einer Akkumulation von L-Serin im Medium führen. Um dies zu untersuchen, wurde die L-Serin-Konzentration in Kulturüberständen der $\Delta sdaA$ -Mutante während der Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Inaktivierung der L-Serindehydratase in *C. glutamicum* in einer 3-fachen Steigerung der L-Serin-Akkumulation auf 0,01 mM resultierte (Tab. 23).

Darüber hinaus sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Überproduktion einer *feedback*-resistenten 3-Phosphoglyceratdehydrogenase (*serA^{fbr}*), einen positiven Effekt auf die L-Serin-Bildung ausübt. Um dies zu untersuchen, wurde der

Vektor pZ1_serA^{fbr} zur Verfügung gestellt (Peters-Wendisch *et al.*, 2002). In der Arbeitsgruppe wurde des Weiteren ein Vektor hergestellt, der neben dem serA^{fbr}-Gen auch die Gene serC und serB enthält (Peters-Wendisch, persönliche Mitteilung). Somit war es möglich, alle Enzyme für einen deregulierten L-Serin-Biosyntheseweg überproduzieren zu können. Beide Vektoren wurden durch Elektroporation in die $\Delta sdaA$ -Mutante eingebracht. Die so hergestellten Stämme 13032 $\Delta sdaA$ pZ1_serA^{fbr} und 13032 $\Delta sdaA$ pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB wurden in CGXII-Minimalmedium kultiviert und auf die Fähigkeit, L-Serin zu akkumulieren untersucht (Tab. 23).

Tab. 23: L-Serin-Konzentrationen bei Kultivierung der Stämme 13032 $\Delta sdaA$, 13032 $\Delta sdaA$ pZ1_serA^{fbr} und 13032 $\Delta sdaA$ pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose.

Stamm	L-Serin [mM]
13032WT	0,003
13032 $\Delta sdaA$	0,01
13032 $\Delta sdaA$ pZ1_serA ^{fbr}	0,15
13032 $\Delta sdaA$ pEC-Tmob2_serA ^{fbr} CB	2,9

Die Überproduktion einer deregulierten L-Serindehydratase in der $\Delta sdaA$ -Mutante führte zu einer weiteren drastischen Steigerung der L-Serin-Bildung um den Faktor 15. Interessanterweise konnte durch die simultane Überexpression der Gene serA*CB die L-Serin-Bildung weiter erhöht werden. So wurde mit dem Stamm 13032 $\Delta sdaA$ pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB eine 290-fache Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Vergleich zur $\Delta sdaA$ -Mutante erreicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Verringerung des L-Serin-Abbaus, die Deregulation der 3-Phosphoglyceratdehydrogenase und die Überproduktion der beiden im L-Serin-Biosyntheseweg anschließenden Enzyme sich positiv auf die L-Serin-Bildung auswirkt und die Kombination der Faktoren zu einem kumulativen Effekt führt.

4.2 Einfluss der Vorstufenbereitstellung auf die L-Serin-Bildung

Wie in den Kapiteln IV1.1.3 und IV1.2.4 gezeigt wurde, führte die Inaktivierung der Glykolysegene *pyk* und *pgm1* zu einer Akkumulation von unphosphorylierten

Glykolyseintermediaten oberhalb der Abzweigung in den L-Serin-Biosyntheseweg. Um zu untersuchen, ob die so erreichte gesteigerte Vorstufenbereitstellung für die L-Serin-Synthese zu einer verstärkten L-Serin-Bildung und Akkumulation im Kulturüberstand führt, wurden zunächst die Δpyk -Mutante und der Wildtyp in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten die L-Serin-Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. Wie in Tabelle 24 gezeigt, schied der Wildtyp unter diesen Bedingungen maximal 4 μ M L-Serin aus. Demgegenüber konnte im Kulturüberstand der Δpyk -Mutante eine Akkumulation von von 40 μ M ermittelt werden, die jedoch im weiteren Verlauf der Kultivierung wieder kontinuierlich abnahm.

Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Effekt das Ausschalten der L-Serindehydratase bei gleichzeitiger Überexpression der Gene *serA^{fbr}CB* in der Δpyk -Mutante auf die L-Serin-Bildung ausübt. Hierzu wurde zunächst das *sdaA*-Gen in der Δpyk -Mutante, wie unter Kapitel IV3.1.1 beschrieben, durch Deletion inaktiviert. Anschließend wurde der Vektor *pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB* durch Elektroporation in die $\Delta pyk \Delta sdaA$ -Mutante eingebracht. Der so hergestellte Stamm 13032 $\Delta pyk \Delta sdaA$ *pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB* wurde nun bezüglich der L-Serin-Bildung bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Stamm in der Lage war, 8 mM L-Serin im Medium zu akkumulieren (Tab. 24), was eine 200-fache Steigerung im Vergleich zur Δpyk -Mutante bedeutet. Ein Vergleich mit dem Stamm 13032 $\Delta sdaA$ *pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB* (Tab. 23) macht deutlich, dass die Inaktivierung des *pyk*-Gens zu einer weiteren 2,8-fachen Steigerung der L-Serin-Bildung führte.

Tab. 24: L-Serin-Bildung bei Kultivierung der Stämme 13032WT, 13032 Δpyk pZ1 und 13032 $\Delta pyk \Delta sdaA$ *pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB* in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose.

Stamm	L-Serin [mM]
13032WT	0,004
13032 Δpyk pZ1	0,04
13032 $\Delta pyk \Delta sdaA$ <i>pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB</i>	8,0

Um zu untersuchen, welchen Effekt die Inaktivierung der 3-Phosphoglyceratmutase auf die L-Serin-Bildung hat, wurden die Stämme 13032 WT pZ1, 13032 $\Delta pgm1$ pZ1

und 13032 Δ *pgm1* pZ1_*serA*^{fbr} in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose bzw. 50 mM Maltose plus je 100 mM Pyruvat kultiviert. Die Bestimmung der L-Serin-Konzentrationen in den Kulturüberständen zeigte, dass keiner der Stämme in der Lage war, L-Serin zu bilden, unabhängig von der verwendeten C-Quelle (Tab. 25). In diesem Stamm hatte die Überexpression von *serA*^{fbr} bei Wachstum auf Glucose keinen Effekt, was nahelegt, dass die in diesem Stammhintergrund limitierte Zuckeraufnahme nicht ausreicht, um L-Serin überzuproduzieren und ins Medium auszuscheiden. Interessanterweise konnte bei Überexpression der drei L-Serin-Biosynthesegene *serA*^{fbr}*CB* bei Wachstum in Glucose-Pyruvat-Medium ein deutlicher Anstieg der L-Serin-Bildung auf 0,16 mM beobachtet werden. Dieser Effekt konnte bei Kultivierung der Mutante in Maltose-Pyruvat-Medium um den Faktor 30 auf 4,7 mM gesteigert werden. Dies zeigt, dass sich der nicht-PTS-Zucker Maltose besser als Substrat für die L-Serin-Produktion eignet als Glucose (siehe Kap. IV1.2.5).

Um zu testen, wie sich die Inaktivierung der L-Serindehydratase in der Δ *pgm1*-Mutante auf die L-Serin-Bildung auswirkt, wurde zusätzlich das *sdaA*-Gen, wie in Kapitel IV3.1.1 beschrieben, deletiert. Es zeigte sich, dass durch Ausschalten der L-Serindehydratase wieder ein Anstieg der L-Serin-Bildung zu beobachten war. Bei Kultivierung auf Maltose plus Pyruvat konnten nun 10,2 mM L-Serin nachgewiesen werden (Tab. 25). Somit konnte unter diesen Bedingungen mit der Δ *pgm1*-Mutante bei Inaktivierung des *sdaA*-Gens und Überexpression von *serA*^{fbr}*CB* 27,5 % mehr L-Serin gebildet werden als mit der entsprechenden Δ *pyk*-Mutante bei Wachstum auf 200 mM Glucose.

Tab. 25: L-Serin-Konzentrationen bei Kultivierung verschiedener *C. glutamicum*-Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose plus 100 mM Pyruvat bzw. 50 mM Maltose plus 100 mM Pyruvat.

Stamm	L-Serin [mM] bei Kultivierung auf	
	100 mM Glucose + 100 mM Pyruvat	50 mM Maltose + 100 mM Pyruvat
13032 WT pZ1	0,006	0,004
13032 Δ <i>pgm1</i> pZ1	0,003	0,004
13032 Δ <i>pgm1</i> pZ1_ <i>serA</i> ^{fbr}	0,004	n. b.
13032 Δ <i>pgm1</i> pEC- <i>Tmob2_serA</i> ^{fbr} CB	0,16	4,7
13032 Δ <i>pgm1</i> Δ <i>sdaA</i> pEC- <i>Tmob2_serA</i> ^{fbr} CB	0,95	10,2

n. b.: nicht bestimmt

4.3 Einfluss der Serinhydroxymethyltransferase auf die L-Serin-Bildung

Neben der L-Serindehydratase ist für *C. glutamicum* noch ein zweites L-Serin umsetzendes Enzym beschrieben (Simic *et al.*, 2002). Die Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) katalysiert die Pyridoxalphosphat-abhängige Umsetzung von L-Serin zu Glycin unter Übertragung einer C₁-Einheit auf Tetrahydrofolat. In *E. coli* werden bei Wachstum mit Glucose als einziger C-Quelle ca. 15 % des glykolytischen Flusses über dieses Enzym abgeleitet, um den Bedarf an C₁-Bausteinen abzudecken (Pizer und Potochny, 1964), was nahelegt, dass dieses Enzym auch in *C. glutamicum* einen erheblichen Anteil am L-Serin-Abbau besitzt. Mit Hilfe des Integrationsvektors pK19*mobsacB_glyA*' kann die Expression des für die Serinhydroxymethyltransferase kodierenden *glyA*-Gens in *C. glutamicum* reguliert werden (Simic *et al.*, 2002). Um einen Stamm herzustellen, in dem der L-Serin-Umsatz weitestmöglich reduziert ist, wurde das Plasmid durch Elektroporation in die Δ *sdaA*-Mutante eingebracht. Durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz wurde ein Klon erhalten, bei dem das Plasmid über homologe Rekombination in das chromosomale *glyA*-Gen integriert ist. Der so hergestellte Stamm Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' besitzt nur eine funktionelle Kopie des *glyA*-Gens, welches nun unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *Ptac*-Promotors steht, während der

native Promotor nur noch eine unvollständige Kopie von *glyA* kontrolliert. Somit wurde ein Stamm konstruiert bei dem die Expression des *glyA*-Gens durch IPTG regulierbar ist (Tab. 26).

Sowohl in den Stamm 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' als auch in den Stamm 13032WT::pK18*mob_glyA*' (Simic *et al.*, 2002) wurde zusätzlich das Plasmid pEC-T*mob2_serA*^{fbr}CB eingebracht, um eine verstärkte L-Serin-Biosynthese zu gewährleisten. Zunächst sollte untersucht werden, wie stark die Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität in dem resultierenden Stamm 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-T*mob2_serA*^{fbr}CB in Abwesenheit des Induktors IPTG reduziert war. Hierzu wurden die spezifischen Enzym-Aktivitäten in Rohextrakten aus Kultivierungen des Stammes 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-T*mob2_serA*^{fbr}CB in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose unter induzierenden (100 μ M IPTG) bzw. nicht induzierenden (0 μ M IPTG) Bedingungen bestimmt. Als Kontrolle diente der unter nicht induzierenden Bedingungen kultivierte Wildtyp mit Leervektor (Tab. 26).

Tab. 26: Spezifische Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität in Rohextrakten des Stammes 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-T*mob2_serA*^{fbr}CB unter induzierten bzw. nicht induzierten Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose. Zur Induktion enthielt der entsprechende Ansatz zusätzlich 100 μ M IPTG. Als Kontrolle diente der Wildtyp mit Leervektor.

Stamm	IPTG	spezif. Aktivität [mU/mg]
13032WT pZ1	-	35,0
13032 Δ <i>sdaA</i> ::pK18 <i>mob_glyA</i> ' pEC-T <i>mob2_serA</i> ^{fbr} CB	+	30,0
13032 Δ <i>sdaA</i> ::pK18 <i>mob_glyA</i> ' pEC-T <i>mob2_serA</i> ^{fbr} CB	-	1,3

Bei Kultivierung mit 100 μ M IPTG wies der Stamm 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-T*mob2_serA*^{fbr}CB eine spezifische Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität von 30 mU auf, dies entsprach etwa der im Wildtyp bestimmten spezifischen Aktivität von 35 mU. In Abwesenheit von IPTG konnte dagegen lediglich eine spezifische Aktivität von 1,3 mU ermittelt werden. Somit konnte die Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität in der Mutante unter nicht-induzierten Bedingungen um den Faktor 23 und im Vergleich zum Wildtyp um Faktor 27 reduziert werden.

Es war nun von erheblichem Interesse zu untersuchen, wie sich die Inaktivierung der L-Serindehydratase und die drastische Reduzierung der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität bei gleichzeitiger Überexpression der Gene für eine deregulierte L-Serin-Biosynthese auf die L-Serin-Bildung auswirken. Hierzu wurden die Stämme 13032 WT::pK18*mob_glyA*' , 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* sowie 13032WT::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose unter nicht induzierenden und induzierenden Bedingungen kultiviert und die L-Serin-Konzentration in Kulturüberständen bestimmt (Tab. 27)

Tab. 27: L-Serin-Konzentrationen in Kulturüberständen der Stämme 13032WT::pK18*mob_glyA*' , 13032WT::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* und 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* unter induzierenden bzw. nicht induzierenden Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose. Zur Induktion enthielt der entsprechende Ansatz zusätzlich 100 μ M IPTG.

Stamm	IPTG	L-Serin [mM]
13032 WT::pK18 <i>mob_glyA</i> '	+	15,0
13032 WT::pK18 <i>mob_glyA</i> ' pEC- <i>Tmob2_serA</i> ^{fbr} <i>CB</i>	+	0,01
	-	20,0
13032 Δ <i>sdaA</i> ::pK18 <i>mob_glyA</i> ' pEC- <i>Tmob2_serA</i> ^{fbr} <i>CB</i>	+	3,4
	-	100,0

Dabei zeigte sich, dass der Stamm 13032 WT::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* unter induzierenden Bedingungen lediglich 10 μ M L-Serin ins Medium ausschied. Dem gegenüber führte die Reduktion der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität im Stamm 13032 WT::pK18*mob_glyA*' zu einer Ausscheidung von 15 mM L-Serin ins Medium. Die zusätzliche Überexpression der Gene *serA*^{fbr}*CB* im Stamm 13032 WT::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* führte zu einer weiteren Steigerung der L-Serin-Bildung um 33 % auf 20 mM. Dies verdeutlicht, dass die durch die verringerte Expression des *glyA*-Gens verursachte reduzierte Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität zu einem Anstau von L-Serin führte, der durch Steigerung der L-Serin-Biosynthese erhöht werden konnte.

Der Stamm 13032 Δ *sdaA*::pK18*mob_glyA*' pEC-*Tmob2_serA*^{fbr}*CB* war in der Lage unter induzierenden Bedingungen 3,4 mM L-Serin auszuscheiden, wovon bis zum

Ende der Kultivierung nach 125 h wieder 50 % abgebaut wurden. Wie aus Tabelle 26 zu ersehen ist, ist die Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität unter diesen Bedingungen nicht reduziert, wodurch das gebildete L-Serin fast vollständig über dieses Enzym weiterverstoffwechselt werden kann. Somit ist diese Mutante mit dem Stamm 13032 Δ sdaA pEC-Tmob2_serA^{fbr}CB vergleichbar, was sich auch in den gebildeten L-Serin-Konzentrationen beider Stämme zeigt. Wurde jedoch durch Abwesenheit von IPTG die Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität stark reduziert (Tab. 26), so konnte der Stamm 100 mM L-Serin ins Medium ausscheiden.

Überraschend war der Befund, dass die höchste L-Serin-Akkumulation erst in der stationären Phase stattfand. Dies deutet darauf hin, dass in der wachsenden Kultur ein Teil des gebildeten L-Serins noch über die Restaktivität der Serinhydroxymethyltransferase abgebaut wird, um C₁-Einheiten und Glycin für die Bildung von Biomasse zu erhalten. Mit dem Ende der exponentiellen Phase nimmt die Bedeutung dieser Reaktionen ab, die Biomassebildung kommt zum Erliegen, und die noch im Medium vorhandene Glucose kann nun überwiegend zu L-Serin verstoffwechselt werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass neben der Inaktivierung der L-Serindehydratase auch die Reduktion der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität von essentieller Bedeutung für die mikrobielle L-Serin-Produktion ist.

V DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bereitstellung des Vorstufenmetaboliten 3-Phosphoglycerat für die L-Serin-Bildung aus Glucose verbessert. Dies wurde durch Inaktivierung der Glykolyse-Enzyme Pyruvatkinase und 3-Phosphoglyceratmutase erreicht (Abb. 24). Weiterhin konnte die Rolle der L-Serindehydratase im L-Serin-Abbau aufgeklärt und das Enzym charakterisiert werden. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnissen war es möglich, einen *C. glutamicum*-Stamm herzustellen, der signifikante Mengen L-Serin im Medium akkumuliert.

1. Die Pyruvatkinase

Es konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp von *C. glutamicum* nach Deletion des *pyk*-Gens auf Glucose wie der Ausgangsstamm wächst und die unphosphorylierten Glykolyseintermediate Dihydroxyaceton, Glycerinaldehyd und Glycerat in geringen Mengen ins Medium ausscheidet. Dies bestätigt Untersuchungen von Gubler *et al.* (1994) bei denen eine *pyk*-Mutante von *C. glutamicum ssp. lactofermentum* bis zu 40 mM Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd akkumulierte. Diese vergleichsweise hohen Konzentrationen könnten darauf zurückzuführen sein, dass dieser zur Lysin-Produktion geeignete Stamm durch ungerichtete Mutagenese erhalten wurde. Die Akkumulation der unphosphorylierten Glykolyseintermediate könnte dadurch zu erklären sein, dass es bei Inaktivierung der Pyruvatkinase zu einem Anstau von Glykolyseintermediaten kommt. Obwohl *C. glutamicum* über eine PEP-Carboxylase verfügt, die PEP zu Oxalacetat umsetzen kann (Eikmanns *et al.*, 1989), konnten Petersen *et al.* (2000) durch Stoffflussanalysen zeigen, dass dieses Enzym *in vivo* kaum aktiv ist. Dies wird daran deutlich, dass in *C. glutamicum* ca. 90 % des anaplerotisch gebildeten Oxalacetats durch die Pyruvat-Carboxylase und nur ca. 10 % durch die PEP-Carboxylase entsteht. Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass mit der Δpyk -Mutante der Stofffluss ausgehend von Glucose in den L-Serin-Stoffwechsel umgeleitet werden kann, so dass die Mutante als guter Ausgangsstamm für die Konstruktion von L-Serin-Produktionsstämmen geeignet ist.

Darüber hinaus wurde aber auch die Rolle der Pyruvatkinase für das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Das Ausschalten der Pyruvatkinase in *C. glutamicum* hatte keinen Effekt auf das Wachstum mit Glucose

als einziger C-Quelle, was Untersuchungen zu einer Pyruvatkinase-negativen Mutante von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* bestätigt (Gubler *et al.*, 1994). Dies kann dadurch erklärt werden, dass in vielen heterotrophen Bakterien Pyruvat auch in einer mit der Aufnahme von Glucose gekoppelten Reaktion über das Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) gebildet wird (Postma *et al.*, 1993). So zeigten Stoffflussanalysen in *E. coli*, dass bei Wachstum auf Glucose Pyruvat hauptsächlich über das PTS gebildet wird (Holms, 1986). Im Gegensatz zu *C. glutamicum* führte das Ausschalten der Pyruvatkinase-Aktivität in *E. coli* bei Wachstum auf Glucose jedoch zu einer um 28 % verringerten Wachstumsrate im Vergleich zum Ausgangsstamm (Ponce *et al.*, 1998), was dadurch erklärt wurde, dass sowohl beide Pyruvatkinase-Isoenzyme als auch das PTS-System notwendig sind, um die PEP-Konzentration auf einem niedrigen Niveau zu halten, da PEP ein allosterischer Inhibitor der 6-Phosphofruktokinase ist (Blangy *et al.*, 1968; Ponce *et al.*, 1995). Dies deutet darauf hin, dass die Glykolyse in *E. coli* stärker reguliert ist als in *C. glutamicum*.

Interessanterweise konnte die Δpyk -Mutante nicht mehr auf Acetat oder Citrat wachsen, was zeigt, dass die Pyruvatkinase unter diesen Bedingungen das einzige Enzym ist, das die Umsetzung von PEP zu Pyruvat katalysieren kann und somit für das Wachstum auf glukoneogenetischen C-Quellen essentiell ist, die nicht, wie z. B. Lactat, unmittelbar zu Pyruvat führen. Da Acetat und Citrat in den Tricarbonsäure-Zyklus einfließen und so Energiegewinnung sowie die Synthese der für die Glukoneogenese notwendigen Metabolite möglich ist, war die Supplementation mit geringen Mengen an Pyruvat (6 mM) zur Biomasse-Produktion ausreichend, um das Wachstum auf Acetat wieder vollständig herzustellen.

Nach Langzeit-Kultivierung der Δpyk -Mutante auf Acetat wurde die PSA-Suppressormutante isoliert, die wieder in der Lage war, mit Acetat als einziger C-Quelle zu wachsen. Da die PSA-Mutante keine Pyruvatkinase-Aktivität besaß, war es naheliegend, dass die Suppressormutation eine alternative Pyruvat-Bildung bei Wachstum auf Acetat ermöglicht. Wie globale Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips ergaben, wurde das *mez*-Gen, welches für das Malat-Enzym kodiert, in der PSA-Mutante verstärkt exprimiert. Das Malat-Enzym aus *C. glutamicum* wurde von Gourdon *et al.* (2000) charakterisiert. Die Aktivität des Enzyms war dabei abhängig von der im Medium vorliegenden C-Quelle. Im Gegensatz zum Wachstum auf Glucose und Lactat konnte nach Wachstum auf Acetat nur eine geringe

Malat-Enzym-Aktivität nachgewiesen werden. Somit ist das Malat-Enzym unter diesen Bedingungen im Wildtyp offensichtlich nicht an der Pyruvat-Bildung beteiligt. Dies wird auch durch Untersuchungen von Peters-Wendisch *et al.* (1996) bestätigt, wo in Rohextrakten aus exponentiell auf Acetat wachsenden Kulturen keine Malat-Enzym-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Auch das Pyruvat-bildende Enzym, die Oxalacetat (OAA)-Decarboxylase, ist für *C. glutamicum* beschrieben und konnte in Rohextrakten einer Pyruvatkinase-negativen Mutante nachgewiesen werden (Jetten und Sinskey, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Δpyk -Mutante die Aktivitäten des Malat-Enzyms und der OAA-Decarboxylase bei Wachstum auf Acetat nicht ausreichen, um genügend Pyruvat zur Biomasse-Bildung zu generieren. Durch NMR-Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass es in *C. glutamicum* einen *in vivo*-Rückfluss aus dem Tricarbonsäure-Zyklus zu Pyruvat gibt (Marx *et al.*, 1996; Sonntag *et al.*, 1995). Darüberhinaus ist bekannt, dass die durch Überexpression des *mez*-Gens verursachte hohe Enzymaktivität zu einer Akkumulation von Pyruvat bei Wachstum auf Lactat führt (Gourdon *et al.*, 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in Flussanalysen mit *E. coli* gemacht. Hier wurde gezeigt, dass eine Pyruvatkinase-defekte Mutante eine verstärkte PEP-Carboxylase- und Malat-Enzym-Aktivität aufwies, um so Pyruvat-Bildung bei Wachstum auf Glucose zu gewährleisten (Al Zaid Siddiquee, 2003). In dieser Arbeit konnte durch Genexpressionsanalysen der PSA-Suppressormutante eine verstärkte Expression des *mez*-Gens nachgewiesen werden. Da das Malat-Enzym die Synthese von Pyruvat katalysieren kann, war es wahrscheinlich, dass eine erhöhte Aktivität des Malat-Enzyms für die Fähigkeit der PSA-Mutante, auf Acetat zu wachsen, verantwortlich war. Dies konnte durch Überexpression des *mez*-Gens in der Δpyk -Mutante bestätigt werden. In diesen Arbeiten wurden erstmals die Genominformationen von *C. glutamicum* in globalen Genexpressionsanalysen eingesetzt, um einen Stoffwechselphänotyp (PSA) auf genetischer Ebene zu identifizieren (*mez*-Gen).

Die Überexpression des *mez*-Gens reichte jedoch nicht aus, um das Wachstum der Δpyk -Mutante auf Ribose wiederherzustellen. Anders als mit Acetat, wo supplementierende Mengen Pyruvat zum Wachstum ausreichten, konnte die Mutante erst in Anwesenheit von 130 mM Pyruvat wieder wachsen wie der Wildtyp. *C. glutamicum* nimmt Ribose sehr wahrscheinlich über einen ABC (ATP-binding cassette)-Transporter auf (Bell *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu einem PTS-

vermittelten Zuckertransport, durch den die Pyruvatkinase-Defizienz umgangen werden kann, erlaubt der Transport von Ribose keine Synthese von Pyruvat aus PEP. Ribose kann in der Δpyk -Mutante nur zur Synthese von Metaboliten des Pentosephosphatweges und der Glykolyse bis zur Stufe von PEP führen. Unter diesen Bedingungen existiert in der Δpyk -Mutante offensichtlich keine alternative Verbindung zum Tricarbonsäure-Zyklus zur Energiegewinnung und für Biosynthesen ausgehend von Intermediaten des Tricarbonsäure-Zyklus. Da die nach Langzeit-Kultivierung auf Ribose isolierte Suppressormutante PSR wieder mit Ribose als einziger C-Quelle wachsen konnte, wurde vermutet, dass neben einer Erhöhung der Expression des *mez*-Gens eine weitere Mutation eine alternative Ribose-Aufnahme über ein PTS-System ermöglicht. In *C. glutamicum* ssp. *flavum* wird das Glucose-PTS konstitutiv exprimiert, wohingegen das Fructose-PTS durch Fructose induzierbar ist (Mori und Shiio, 1987). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *ptsG*-Gen, welches für das Glucose-spezifische Transportprotein des Glucose-PTS kodiert, zu einem Transport von Ribose über dieses System führte (Oh *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zeigten, dass die Gene des Fructose-PTS-Systems (*fruRKA*-Operon) in der PSR-Mutante verstärkt exprimiert wurden. Dies deutete darauf hin, dass eine oder mehrere Suppressormutationen in diesem PTS-System in einer verstärkten Expression und/oder in einer verringerten Substratspezifität resultierten und so einen Transport von Ribose über dieses System bei gleichzeitiger Umsetzung von PEP zu Pyruvat ermöglichten. Allerdings konnte durch die Überexpression der Gene dieses PTS-Systems in der Δpyk -Mutante das Wachstum auf Ribose nicht wiederhergestellt werden. Ob dies darauf zurückzuführen ist, dass das Operon nicht funktionell exprimiert wurde, oder es in der PSR-Mutante noch weitere Mutationen außerhalb des *fruRKA*-Operons gibt, die für das Wachstum auf Ribose verantwortlich sind, konnte bisher nicht geklärt werden.

2. Die 3-Phosphoglyceratmutase

Es wurden zwei Gene, die für mögliche Phosphoglyceratmutasen kodieren, im Genom von *C. glutamicum* identifiziert. Wie die Studien mit definierten Mutanten zeigten, kodiert jedoch nur das *pgm1*-Gen für eine aktive Phosphoglyceratmutase. Diese gehört zur Gruppe der Co-Faktor-abhängigen Phosphoglyceratmutasen. In

weiteren Untersuchungen wurde das Gen *pgm1*, das für die funktionelle Phosphoglyceratmutase kodiert, deletiert. Wie sich zeigte, konnte die $\Delta pgm1$ -Mutante nicht mehr auf Glucose als einziger C-Quelle wachsen. Darüber hinaus konnte die Mutante auch nicht mehr auf glukoneogenetischen Substraten wie Acetat, Lactat oder Pyruvat wachsen, sie verfügt offensichtlich über keine Möglichkeit zur Synthese von Glykolyseintermediaten oberhalb von 3-Phosphoglycerat. Das Enzym ist also essentiell für Wachstum auf glykolytischen und glukoneogenetischen Substraten. Das Wachstum auf Glucose konnte jedoch durch Zugabe eines glukoneogenetischen Substrates in begrenztem Maße wieder hergestellt werden. Dies entspricht auch den für *B. subtilis* gemachten Beobachtungen, wo das Wachstum einer *pgm*-Deletionsmutante durch Zugabe von Glucose und Malat verbessert werden konnte (Leyva-Vazquez und Setlow, 1994).

Die $\Delta pgm1$ -Mutante kann nur einen Teil der Glykolysemetabolite von Glucose bis 3-Phosphoglycerat aus Glucose bilden, wogegen die Metabolite unterhalb von 3-Phosphoglycerat, 2-Phosphoglycerat bis Acetyl-CoA sowie die Intermediate des Tricarbonsäure-Zyklus, durch ein glukoneogenetisches Co-Substrat wie Pyruvat oder Acetat generiert werden müssen (Abb. 24). Die stöchiometrische Analyse ergab, dass auf den Kohlenstoff bezogen etwa 20 % für die Metaboliten-Synthese oberhalb und etwa 80 % für die Synthese unterhalb des enzymatischen Blocks benötigt werden (Sonntag *et al.*, 1995; Wendisch *et al.*, 2000). Werden Glucose und ein glukoneogenetisches Substrat im Verhältnis 1:1 (mol/mol) angeboten, werden dementsprechend 80 % der Glucose nicht verwertet, wohingegen bei einem Verhältnis von 1:5 (mol/mol) die Glucose vollständig verstoffwechselt werden kann. Die Betrachtung der Kohlenstoffbilanz ist jedoch verknüpft mit der Glucose-Aufnahme, da das glukoneogenetische Co-Substrat neben der Vorstufenbereitstellung gleichzeitig auch der Bereitstellung von PEP für die Glucose-Aufnahme dient. Diese erfolgt in *C. glutamicum* hauptsächlich über ein Glucose-PTS (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Parche *et al.*, 2001), das von PEP abhängig ist. Es wird vermutet, dass die Aktivität des Glucose-PTS invers mit der Pyruvat-Konzentration korreliert ist (Ruklisha und Ionina, 2000). Da die $\Delta pgm1$ -Mutante mit Acetat als Co-Substrat ein vergleichbares Wachstumsverhalten zeigt wie mit Pyruvat, wird der Glucosetransport in der $\Delta pgm1$ -Mutante nicht durch das glukoneogenetische Co-Substrat gehemmt. Es scheint vielmehr so, dass zusätzlich zu den rein stöchiometrischen Effekten auch regulatorische Effekte das Verhalten der Mutante

erklären. So kann die Mutante mit dem nicht-PTS-Zucker Maltose, bei dessen Aufnahme kein PEP benötigt wird, zwar deutlich besser wachsen, aber auch unter diesen Bedingungen werden nur ca. 60 % der angebotenen Maltose verstoffwechselt.

Neben dem PTS-System sind in anderen Organismen noch weitere Glucose-Transportsysteme bekannt, die nicht auf PEP als Phosphatgruppendonor angewiesen sind. Dazu zählen ABC-Transporter (Baldwin und Henderson, 1989) (Postma *et al.*, 1993), Permeasen der *major facilitator superfamily* (Pao *et al.*, 1998) sowie das für *Zymomonas mobilis* beschriebene Glucose-Facilitator-Protein (Romano, 1986). In zukünftigen Arbeiten könnte durch Einbringen eines solchen alternativen Aufnahmesystems in die $\Delta pgm1$ -Mutante möglicherweise die Glucose-Aufnahme und damit die Vorstufen-Bereitstellung deutlich verbessert werden.

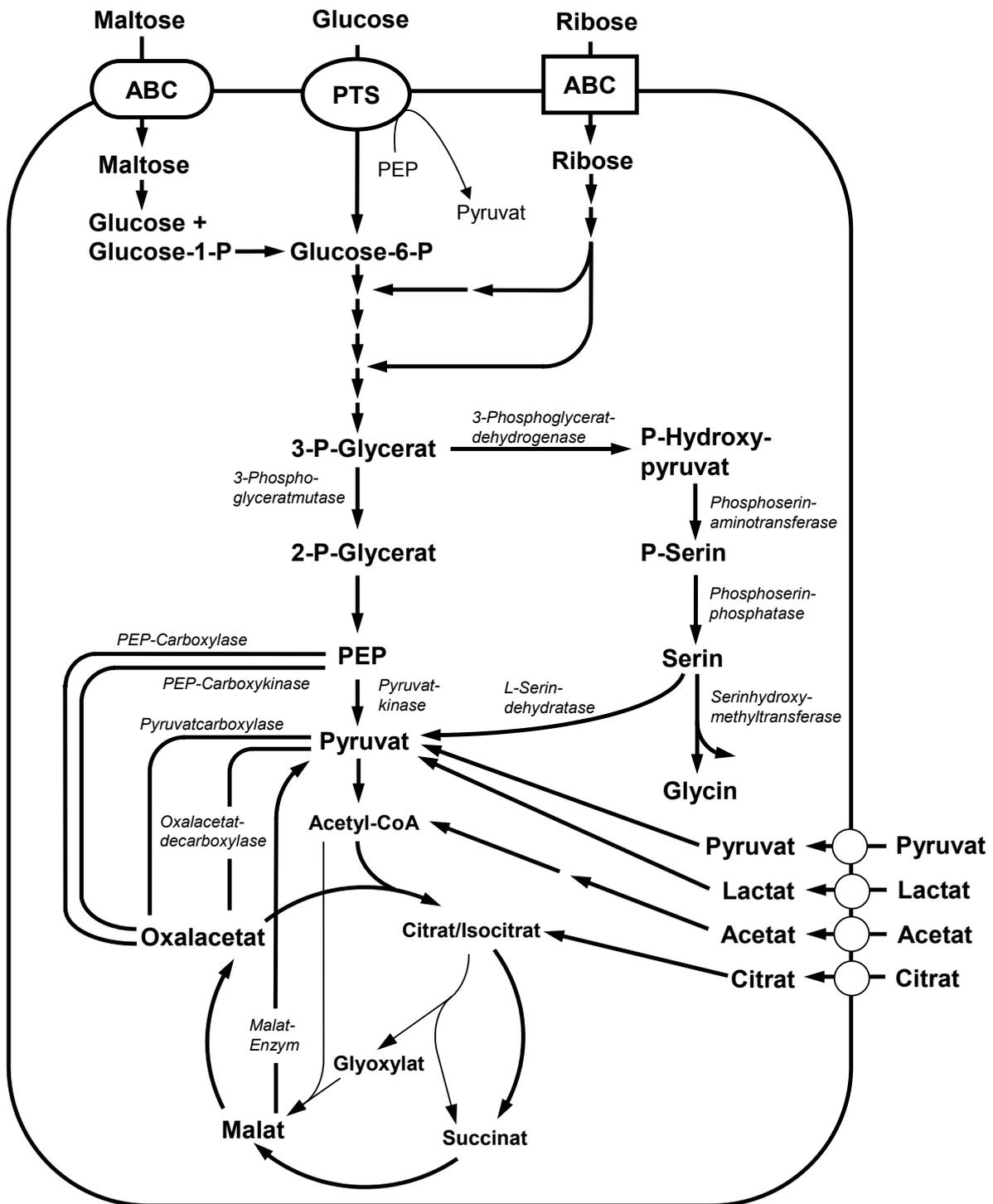


Abb. 24: Schematische Darstellung der Verstoffwechslung von Glucose, Ribose und Maltose über die Glykolyse und den Tricarbonsäure-Zyklus sowie der L-Serin-Biosyntheseweg und die anaplerotischen und glukoneogenetischen Reaktionen um die Verzweigungspunkte PEP, Pyruvat, Oxalacetat und Malat in *C. glutamicum*.

3. Die L-Serindehydratase

Für *C. glutamicum* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass selbst hohe L-Serin-Konzentrationen in Minimalmedium keinen negativen Effekt auf das Wachstum ausübten. Demgegenüber ist für *E. coli* mehrfach gezeigt worden, dass die Anwesenheit von L-Serin das Wachstum in Minimalmedium inhibiert (Cosloy und McFall, 1970; Hama *et al.*, 1990; Uzan und Danchin, 1978). Somit ist die für *E. coli* vermutete Hemmung der Homoserindehydrogenase I, die zur Unterbrechung der L-Threonin- und L-Isoleucin-Biosynthese führt (Hama *et al.*, 1990), in *C. glutamicum* unwahrscheinlich. Da auch die durch Fütterung von Seryl-Tripeptid induzierte hohe interne L-Serin-Konzentration keinen negativen Effekt auf das Wachstum von *C. glutamicum* hatte, ist dieses Bakterium offensichtlich tolerant gegenüber hohen L-Serin-Konzentrationen und somit ein geeigneter Organismus zur Herstellung eines L-Serin produzierenden Stammes.

In *E. coli* wurden drei Gene identifiziert, die für L-Serindehydratasen kodieren. Zwei dieser Enzyme, die bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gebildet werden, sind untersucht. So wird das Protein LSD2 nur in LB-Medium produziert (Shao und Newman, 1993), wohingegen LSD1 sowohl bei Wachstum in LB- als auch in Minimalmedium gebildet wird (Su *et al.*, 1989). Von dem Produkt des dritten Gens, *tdcG*, wird aufgrund von Sequenzähnlichkeiten angenommen, dass es ebenfalls L-Serindehydratase-Aktivität besitzt (Hesslinger *et al.*, 1998). Demgegenüber ist im *C. glutamicum*-Genom nur eine Sequenz vorhanden, die für eine L-Serindehydratase kodiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose L-Serin als Co-Substrat verwerten kann, jedoch nicht auf L-Serin als einziger C-Quelle wächst. Dies bedeutet, dass in *C. glutamicum* L-Serin abbauende Enzyme vorhanden sind, jedoch die Aktivität der L-Serindehydratase nicht ausreicht, um genügend Pyruvat zur Biomasse-Bildung und Energiegewinnung zur Verfügung zu stellen. Dies wurde dadurch bestätigt, dass durch Überexpression des *sdaA*-Gens sowohl Wachstum mit L-Serin als einziger C-Quelle möglich war, als auch die L-Serin-Abbaurrate deutlich erhöht war. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das Enzym aus *E. coli* gemacht. Sie zeigten, dass die Fähigkeit L-Serin als C-Quelle zu nutzen von der L-Serindehydratase-Aktivität abhängig ist (Su *et al.*, 1989). So konnte nachgewiesen werden, dass durch Zugabe der Induktoren Glycin und Leucin eine Steigerung der L-Serindehydratase-Aktivität erreicht werden konnte, die den Wildtyp befähigte, auf L-Serin zu wachsen (Newman und Walker, 1982). Nur wenige

Bakterien wie z. B. *Klebsiella aerogenes* oder *Pseudomonas cepacia* sind in der Lage mit L-Serin als einzigem Substrat zu wachsen (Vining und Magasanik, 1981; Wong und Lessie, 1979). Im Gegensatz dazu ist L-Serin die erste Aminosäure, die von *E. coli* in LB-Medium verstoffwechselt wird (Pruss *et al.*, 1994).

Die Transkription des *sdaA*-Gens wird in *E. coli* durch Glycin und Leucin induziert, (Isenberg und Newman, 1974; Pardee und Prestidge, 1955) und durch das globale Regulatorprotein Lrp reprimiert (Lin *et al.*, 1990). Demgegenüber ist beschrieben, dass die Aktivität der L-Serindehydratasen aus *P. cepacia* und *C. glycinophilum* in Anwesenheit von L-Serin erhöht ist (Kubota, 1984; Wong und Lessie, 1979). Dabei konnte für *P. cepacia* beobachtet werden, dass die L-Serindehydratase-Aktivität bei Wachstum auf L-Serin im Vergleich zum Wachstum auf Glucose ca. 100-fach erhöht war. Durch DNA-Chip-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression des *sdaA*-Gens in *C. glutamicum* nicht durch die Anwesenheit hoher interner L-Serin-Konzentrationen gesteigert ist. Wie in weiteren Genexpressionsanalysen gezeigt wurde, hatte auch L-Leucin keine signifikante Auswirkung auf die *sdaA*-Expression in *C. glutamicum* (C. Lange, persönliche Mitteilung). Dagegen war der mRNA-Spiegel des Gens *metC*, welches für die Cystathionin- β -Lyase kodiert (Kim *et al.*, 2001), signifikant erhöht (Abb. 25). In *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym auch L-Serin zu Pyruvat desaminieren kann (Flavin und Slaughter, 1964). Darüber hinaus wurde mit einer L-Serindehydratase-negativen *E. coli*-Mutante nachgewiesen, dass die Überproduktion der Cystathionin- β -Lyase zu Wachstum auf L-Serin führt, was darauf hindeutet, dass das Enzym in *E. coli* auch L-Serindehydratase-Aktivität besitzt (Brown *et al.*, 1990). Die verstärkte Expression von *metC* bei hohen internen L-Serin-Konzentrationen weist darauf hin, dass auch in *C. glutamicum* L-Serin durch die Cystathionin- β -Lyase zu Pyruvat abgebaut werden kann. Diese Vermutung könnte auch erklären, warum in Rohextrakten der $\Delta sdaA$ -Mutante noch eine unspezifische L-Serindehydratase-Aktivität nachweisbar ist, die jedoch offensichtlich nicht ausreicht, um L-Serin abzubauen. Durch Abbau der hohen internen L-Serin-Konzentrationen über die L-Serindehydratase könnte der Pyruvat-Pool erhöht sein, wodurch die erhöhten mRNA-Spiegel der Gene *ilvB*, *ilvM* und *glnA* erklärt werden könnten (Abb. 25). Weiterhin ist die verstärkte Expression des *purU*-Gens möglicherweise die Folge eines verstärkten Umsatzes von L-Serin zu Glycin und C₁-Einheiten. Das Gen *cycQ*, das ebenfalls verstärkt exprimiert wurde, kodiert für einen Ammoniumtransporter, der an der Cystein-Biosynthese beteiligt ist. Da

L-Serin auch eine Vorstufe für diese Aminosäure darstellt, könnte die erhöhte mRNA-Menge von *cysQ* ebenfalls eine Reaktion auf eine hohe interne L-Serin-Konzentration sein. Die verstärkte Expression des *oppD*-Gens, das für einen Oligopeptid-Transporter kodiert, ist vermutlich auf die Zugabe des Seryl-Tripeptids zurückzuführen.

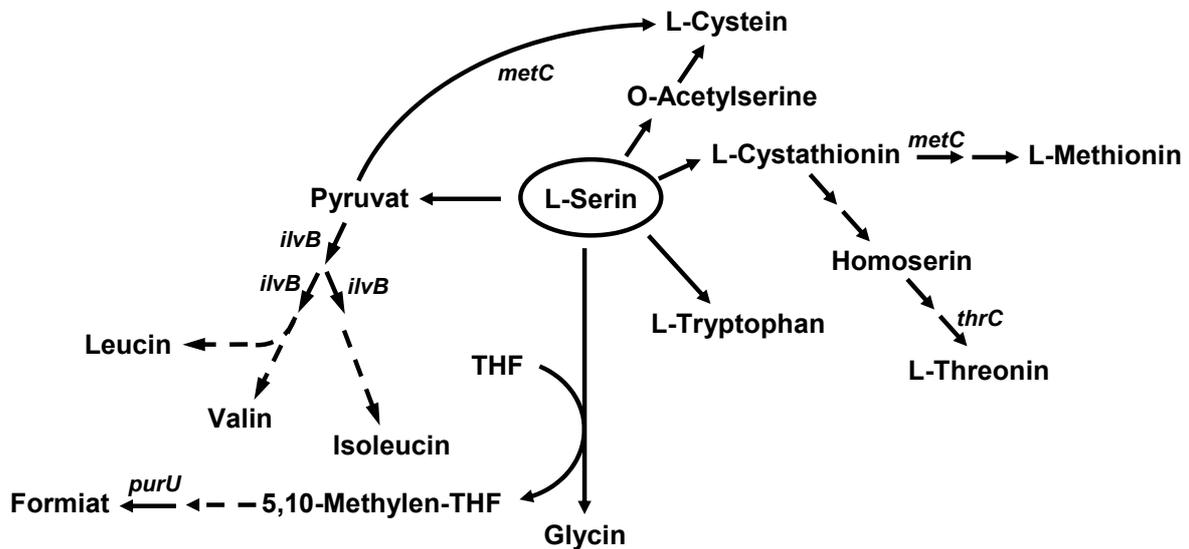


Abb. 25: Schematische Darstellung der Lokalisation von Genen in Aminosäure-Stoffwechselwegen, die ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau in Anwesenheit hoher interner L-Serin-Konzentrationen zeigten.

Die maßgebliche Beteiligung der L-Serindehydratase am L-Serin-Abbau in *C. glutamicum* wurde durch Bestimmung der L-Serin-Abbauraten im Wildtyp, der $\Delta sdaA$ -Mutante und des *sdaA*-Überexpressions-Stammes nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass im *C. glutamicum* Wildtyp bei exponentiellem Wachstum auf Glucose plus L-Serin ca. 40 % des L-Serin-Abbaus durch die L-Serindehydratase verursacht wird. Bei Überexpression des *sdaA*-Gens steigt dieser Anteil auf ca. 80 % an. Dies könnte auch das schlechtere Wachstum des Überexprimierers erklären. In diesem Stamm ist durch die verstärkte Umsetzung von L-Serin zu Pyruvat der interne L-Serin-Pool vermutlich so stark reduziert, dass die restlichen L-Serin-abhängigen Reaktionen nur limitiert ablaufen können. Ein vergleichbarer Anteil der L-Serindehydratase am L-Serin-Abbau wurde auch bei Untersuchungen mit *E. coli* ermittelt. Hier konnte anhand der Zusammensetzung von *E. coli*-Zellen (Ingraham *et al.*, 1983) abgeschätzt werden, dass bei Wachstum in Glucosemedium, das mit geringen Konzentrationen L-Serin supplementiert worden war, ca. 50 bis 60 % des zugegebenen L-Serins über die L-Serindehydratase zu Pyruvat umgesetzt werden

(Ramotar und Newman, 1986). Auf der Basis von Wachstumsexperimenten in Glucosemedium mit verschiedenen L-Serin-Konzentrationen (Pizer und Potochny, 1964) postulierten Ramotar und Newman (1986), dass mit zunehmender L-Serin-Konzentration auch ein steigender Anteil zu Pyruvat desaminiert wird.

Obwohl die enzymatische, nicht-oxidative Desaminierung von L-Serin zu Pyruvat und Ammonium durch Mikroorganismen seit 1938 bekannt ist (Gale und Stephenson, 1938), ist die physiologische Bedeutung dieser durch die L-Serindehydratase katalysierten Reaktion nicht eindeutig (Ramotar und Newman, 1986). Für *C. glutamicum* konnte bei Wachstum auf Glucose beobachtet werden, dass die L-Serindehydratase-Aktivität in der stationären Phase um Faktor 2 anstieg. Möglicherweise steht unter diesen Bedingungen verstärkt L-Serin aus proteolytischen Prozessen zur Verfügung, was über die L-Serindehydratase-Aktivität zu Pyruvat umgesetzt wird, um der Zelle einen Erhaltungsstoffwechsel zu ermöglichen. Diese Hypothese wird durch NMR-Analysen unterstützt, die zeigten, dass *E. coli* beim Übergang in die stationäre Phase zugegebenes Glycin über L-Serin und Pyruvat zu Acetat umsetzt und dieses ins Medium ausscheidet (Han *et al.*, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass in *E. coli* die L-Serindehydratase in der späten exponentiellen und stationären Phase induziert wird (Su *et al.*, 1989). Das Enzym wird darüber hinaus auch durch verschiedene DNA-schädigende Agentien wie Nalidixinsäure, Mitomycin und UV-Licht sowie durch Hitzeschock, Anaerobiosis und Alkohol-Schock induziert (Newman *et al.*, 1982a; Newman *et al.*, 1985b; Su *et al.*, 1989), durch Stress-Faktoren also, die der Zelle suboptimale Bedingungen signalisieren. Somit könnte auch in *C. glutamicum* eine verstärkte Aktivität der L-Serindehydratase in der stationären Phase als Antwort auf sich verschlechternde Wachstumsbedingungen induziert werden.

Für die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* konnte in Enzymtests, die in An- bzw. Abwesenheit von Fe^{2+} -Ionen und DTT durchgeführt wurden, ein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und der Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen und DTT festgestellt werden. Während die L-Serindehydratase in *E. coli*-Rohextrakten in Abwesenheit von Eisen und DTT nur noch 15 % Aktivität zeigte (Newman *et al.*, 1985a), konnte im Rohextrakt von *C. glutamicum* unter diesen Bedingungen jedoch noch 48 % Aktivität nachgewiesen werden. Untersuchungen zur L-Serindehydratase aus *Clostridium acidurici* (Carter und Sagers, 1972) zeigten, dass das Enzym nach Aufreinigung inaktiv war, jedoch durch Fe^{2+} und DTT wieder reaktiviert werden

konnte. Eine vergleichbare Reaktivierung durch Fe^{2+} -Ionen und DTT wurde auch für die L-Serindehydratasen aus *E. coli* (Newman und Kapoor, 1980), *Paracoccus seriniphilus* (Laroche *et al.*, 2003), *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Grabowski und Buckel, 1991), *Clostridium propionicum* (Hofmeister *et al.*, 1993), *Clostridium acidurici* (Carter und Sagers, 1972), *Clostridium sticklandii* (Zinecker *et al.*, 1998) und *Lactobacillus fermentum* (Farias *et al.*, 1991) beschrieben. Da das corynebakterielle Enzym auch in Abwesenheit von Fe^{2+} -Ionen und DTT noch aktiv ist, besitzt es wahrscheinlich eine erhöhte Sauerstoff-Toleranz im Vergleich zu den bisher untersuchten Enzymen, was möglicherweise auf den aeroben Stoffwechsel von *C. glutamicum* zurückgeführt werden kann. Durch Untersuchungen zur L-Serindehydratase aus *P. asaccharolyticus* konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym einen sauerstoffempfindlichen [4Fe-4S]-Cluster enthält, der essentiell für die katalytische Aktivität ist (Grabowski und Buckel, 1991; Hofmeister *et al.*, 1997). Aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten dieses Proteins mit den drei L-Serindehydratasen aus *E. coli* ist es naheliegend, dass die *E. coli*-Enzyme ebenfalls zur Gruppe der Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Enzyme zählen (Sawers, 1998). Die Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters erfolgt über die Schwefel-Atome dreier konservierter Cysteinreste an das Protein, während das vierte Eisen-Atom mit einer Hydroxylgruppe ligiert ist, an der die Substratbindung erfolgt (Flint und Allen, 1996). Anhand vergleichender Sequenzanalysen auf Aminosäureebene konnte gezeigt werden, dass die L-Serindehydratase aus *C. glutamicum* ebenfalls über die für die Ausbildung eines [4Fe-4S]-Clusters notwendigen konservierten Cysteinreste verfügt und demnach sehr wahrscheinlich zur Gruppe der Eisen-Schwefel-Proteine gehört.

Die aus der Literatur bekannten L-Serindehydratasen verschiedener Bakterien zeigen bezüglich ihrer spezifischen Aktivitäten und Affinitäten zum Substrat L-Serin teilweise erhebliche Unterschiede auf (Tab. 28). Hinsichtlich der Substrataffinität ist das Enzym aus *C. glutamicum* mit den für *Corynebacterium sp.*, *C. glycinophilum*, *E. coli* und *L. lactofermentum* beschriebenen L-Serindehydratasen (Tab. 28) vergleichbar. Da das Enzym jedoch erst in Anwesenheit hoher Serinkonzentrationen aktiv ist, könnte ihm eine entgiftende Wirkung zukommen, wie sie auch für *E. coli* vermutet wird (Su und Newman, 1991). Alle bisher untersuchten L-Serindehydratasen besitzen eine hohe Substratspezifität. Nur das Enzym aus *P. asaccharolyticus* kann neben L-Serin auch L-Threonin desaminieren (Grabowski

und Buckel, 1991), wohingegen keines der übrigen, einschließlich des corynebakteriellen Enzyms, L-Threonin als Substrat akzeptiert.

Tab. 28: Spezifische L-Serindehydratase-Aktivitäten und K_m -Werte verschiedener Bakterien. Mit Ausnahme von *E. coli* wurden die Aktivitäten in Zell-Rohextrakten ermittelt.

Organismus	Aktivität [mU/mg]	K_m -Wert [mM L-Serin]	Referenz
<i>C. glutamicum</i>	< 1	10/90 ^{a)}	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	19 ^{b)}	42	Newman und Kapoor, 1980; Newman <i>et al.</i> , 1985a
<i>P. asaccharolyticus</i>	900	1	Grabowski und Buckel, 1991
<i>Corynebacterium</i> sp.	1100	ca. 15-40	Morikawa <i>et al.</i> , 1974
<i>C. glycinophilum</i>	40	35	Kubota, 1984; Kubota <i>et al.</i> , 1989
<i>L. fermentum</i>	6	65	Farias <i>et al.</i> , 1991
<i>A. globiformis</i>	680	6,5-20	Gannon <i>et al.</i> , 1977
<i>P. cepacia</i>	229	20	Wong und Lessie, 1979
<i>C. acidi-urici</i>	5800	7,7	Carter und Sagers, 1972
<i>C. sticklandii</i>	813	1	Zinecker <i>et al.</i> , 1998
<i>C. propionicum</i>	750	5	Hofmeister <i>et al.</i> , 1993

n. b.: nicht bekannt

^{b)} gemessen im Stamm *C. glutamicum* 13032WT pXMJ19_sdaA.

^{a)} 1 U = 1 nmol Pyruvat pro 10 μ l einer 100-Klett-Einheiten-Suspension permeabilisierter Zellen nach 35 min Reaktionsdauer.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sind L-Cystein und D-Serin Inhibitoren der L-Serindehydratase aus *C. glutamicum*, wobei D-Serin einen deutlich schwächeren Hemm-Effekt auf das Enzym hatte. Diese Inhibitoren hemmen auch die Enzyme aus *C. propionicum* (Hofmeister *et al.*, 1993), *E. coli* (Alfoldi *et al.*, 1968), *C. sticklandii* (Zinecker *et al.*, 1998) und *Corynebacterium* sp. (Morikawa *et al.*, 1974). Dagegen wird das Enzym aus *C. glycinophilum* zwar effektiv durch L-Cystein, nicht jedoch durch D-Serin gehemmt (Kubota *et al.*, 1989). Der Chelatbildner EDTA ist als ein effektiver Inhibitor der L-Serindehydratase aus *C. sticklandii* beschrieben (Zinecker *et al.*, 1998). Ebenso wie für das *P. asaccharolyticus*-Enzym gezeigt (Grabowski und Buckel, 1991), konnte für das corynebakterielle Enzym kein inhibierender Effekt in Anwesenheit von EDTA festgestellt werden.

4. L-Serin-Bildung mit *C. glutamicum*

Die meisten Ansätze zur mikrobiellen Aminosäurebildung haben zunächst das Ziel, die Biosynthesekapazität von Mikroorganismen für das entsprechende Produkt zu steigern, nicht aber den Abbau zu verhindern (Kubota, 1984). Wegen der zentralen Rolle von L-Serin im Stoffwechsel verhält es sich bei dieser Aminosäure aber anders. So konnte durch ungerichtete Mutagenese ein Stamm von *C. glycinophilum* hergestellt werden, der keine L-Serindehydratase-Aktivität mehr besitzt (Kubota, 1984). Mit diesem Stamm konnte aus 30 g/l Glycin 14 g/l L-Serin gebildet werden, was einer Ausbeute von 47 % entspricht. Da bei diesem Prozess die Zugabe von Glycin und von aus Glycin gebildete C₁-Einheiten notwendig sind, können theoretisch nur 50 % des eingesetzten Glycins zu L-Serin umgesetzt werden (Izumi *et al.*, 1993). Dagegen können methylorophe Bakterien C₁-Einheiten auch aus Methanol gewinnen und so theoretisch sämtliches angebotenes Glycin zu L-Serin umsetzen (Izumi *et al.*, 1993). Mit *Hyphomicrobium methylovorum* konnten so innerhalb von drei Tagen aus 100 g/l Glycin und 88 g/l Methanol 45 g/l L-Serin gebildet werden (Yoshida *et al.*, 1993). Auch hier wurde durch eine Verringerung des L-Serin-Abbaus eine zusätzliche Steigerung auf 53 g/l L-Serin erreicht.

Über die Produktion von L-Serin ausgehend von Glucose als Substrat gibt es bisher nur wenige Informationen. In einem japanischen Patent (Suga *et al.*, 2001) wurde gezeigt, dass durch eine nicht weiter definierte Aufhebung des L-Serin-Abbaus und durch Überexpression der L-Serin-Biosynthese-Gene eine Herstellung mit *C. glutamicum* möglich ist. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch definierte gentechnische Veränderungen einen Stamm herzustellen, der in der Lage ist L-Serin zu bilden. Im Zusammenhang mit der definierten Konstruktion L-Tryptophan-produzierender Stämme von *C. glutamicum* ist der Einfluss des Schlüsselenzyms der L-Serin-Biosynthese untersucht worden, da L-Serin eine Vorstufe der L-Tryptophan-Synthese ist. Hier zeigte sich, dass die Überexpression des 3-Phosphoglyceratdehydrogenase kodierenden Gens zu einer Steigerung der L-Tryptophan-Produktion von 43 g/l auf 50 g/l führte (Ikeda *et al.*, 1994). Im *C. glutamicum* Wildtyp dagegen führte weder die Überproduktion der nativen noch einer deregulierten 3-Phosphoglyceratdehydrogenase alleine zur Akkumulation von L-Serin. Wie Ikeda *et al.*, 1999 zeigten, konnte zusätzlich auch durch eine verstärkte Bereitstellung des Vorstufenmetaboliten Erythrose-4-Phosphat die L-Tryptophan-Bildung auf 58 g/l gesteigert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bereitstellung von Vorstufenmetaboliten für die L-Serin-Biosynthese auch durch die Inaktivierung von Glykolyseenzymen erreicht werden kann. Allerdings ist dies allein nicht ausreichend um eine Ausscheidung von L-Serin ins Medium zu erreichen. Dies zeigt, dass den L-Serin abbauenden Reaktionen eine Schlüsselfunktion bei der Akkumulation dieser Aminosäure zukommt. Neben der L-Serindehydratase ist auch die Serinhydroxymethyltransferase an der Umsetzung beteiligt, die ca. zwei Drittel des gebildeten L-Serins zu Glycin abbaut (Marx *et al.*, 1999). Wie sich zeigte, führt dementsprechend schon die Reduktion der spezifischen Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität um ca. 95 % zu einer deutlichen Akkumulation von 1,5 g/l L-Serin im Medium. Unter diesen Bedingungen war das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich gehemmt, was darauf hindeutet, dass in der Mutante unter diesen Bedingungen zwar L-Serin angehäuft wird, durch die reduzierte Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität jedoch nicht ausreichend Glycin und C₁-Einheiten für die Biomasse-Bildung zur Verfügung stehen.

Die Kombination dieses stark reduzierten L-Serin-Abbaus über die verringerte Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität mit der Inaktivierung des L-Serin-Abbaus über die L-Serindehydratase bei gleichzeitiger Steigerung der L-Serin-Biosynthese führte zur Bildung von 100 mM L-Serin (10,5 g/l), was einer Steigerung der L-Serin-Akkumulation um Faktor 10000 entspricht. Dennoch reicht die Produktivität nicht aus, um wirtschaftlich L-Serin herzustellen. In einer Wirtschaftlichkeitsanalyse, durchgeführt an der Universität Hannover, wurde errechnet, dass eine kostendeckende Produktion erst ab einer Ausbeute von ca. 30 g/l erfolgt (H. Serger, Abteilung Ordnungs- und Prozesspolitik, Universität Hannover; persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine Kombination aller beschriebenen Veränderungen bezüglich L-Serin-Abbau, L-Serin-Biosynthese und Vorstufenbereitstellung in Zukunft zu einer weiteren deutlichen Steigerung der L-Serin-Bildung führen wird.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K., und Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**: 279-301.
- Al Zaid Siddiquee, K. (2003) Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl Microbiol Biotechnology*.
- Alfoldi, L., Rasko, I., und Kerekes, E. (1968) L-serine deaminase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **96**: 1512-1518.
- Alfoldi, L., und Rasko, I.I. (1970) L-serine deaminating enzymes in *Escherichia coli* crude extracts. *FEBS Lett* **6**: 73-76.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J. (1997) Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amann, E., Brosius, J., und Ptashne, M. (1983) Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promotor useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25**: 167-178.
- Baldwin, S.A., und Henderson, P.J. (1989) Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol* **51**: 459-471.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2216-2220.
- Bell, A.W., Buckel, S.D., Groarke, J.M., Hope, J.N., Kingsley, D.H., und Hermodson, M.A. (1986) The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA*, and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **261**: 7652-7658.
- Beremand, P.D., und Sojka, G.A. (1977) Mutational analysis of serine-glycine biosynthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol* **130**: 532-534.
- Bergmeyer, H.U. (1983) Pyruvate kinase from rabbit muscle. In: Methods of enzymatic analysis. II. Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. und Graßl M. (ed.). Verlag Chemie Weinheim: 303-304.
- Birkmayer, W., Linauer, W., Mentasti, M., und Riederer, P. (1974) 2-year experiences with a combination treatment of Parkinsonism with L-dopa and a decarboxylase inhibitor (Benserazid, Ro 4-4602). *Wien Med Wochenschr* **1**: 340-344.
- Birnboim, H.C., und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

- Blangy, D., Buc, H., und Monod, J. (1968) Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **31**: 13-35.
- Boll, M., und Holzer, H. (1965) Studies on serine dehydratase reaction in yeast. *Biochem* **343**: 504-518.
- Boos, W., und Shuman, H.A. (1998) The maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 204-229.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bramucci, M.G., und Nagarajan, V. (1996) Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3948-3953.
- Brown, E.A., D'Ari, R., und Newman, E.B. (1990) A relationship between L-serine degradation and methionine biosynthesis in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **136**: 1017-1023.
- Carter, J.E., und Sagers, R.D. (1972) Ferrous ion-dependent L-serine dehydratase from *Clostridium acidurici*. *J Bacteriol* **109**: 757-763.
- Chander, M., Setlow, B., und Setlow, P. (1998) The enzymatic activity of phosphoglycerate mutase from gram-positive endospore-forming bacteria requires Mn^{2+} and is pH sensitive. *Can J Microbiol* **44**: 759-767.
- Cheung, G.P., Cotropia, J.P., und Sallach, H.J. (1969) The effects of dietary protein on the hepatic enzymes of serine metabolism in the rabbit. *Arch Biochem Biophys* **129**: 672-682.
- Clauser, K.R., Baker, P., und 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.
- Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A., und Lindley, N.D. (1996) Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 429-436.
- Cosloy, S.D., und McFall, E. (1970) L-Serine-sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **103**: 840-841.
- Cramer, E. (1865) Über die Bestandteile der Seide. *J Prakt Chem* **96**: 76-98.
- Cremer, J., Eggeling, L., und Sahm, H. (1990) Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **220**: 478-480.
- de Boer, H.A., Comstock, L.J., und Vasser, M. (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 21-35.

- de Koning, T.J., Snell, K., Duran, M., Berger, R., Poll-The, B.T., und Surtees, R. (2003) L-serine in disease and development. *Biochem J* **371**: 653-661.
- Eggeling, L., und Sahm, H. (1999) L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 146-153.
- Eggeling, L., Krumbach, K., und Sahm, H. (2001) L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or Tween addition doing the same? *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 67-68.
- Eikmanns, B.J., Follettie, M.T., Griot, M.U., und Sinskey, A.J. (1989) The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol Gen Genet* **218**: 330-339.
- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtko, K., und Sahm, H. (1994) Nucleotid sequence, expression and transcriptional analysis of *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-1828.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., und Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14863-14868.
- Farias, M.E., Strasser de Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., und G., O. (1991) Purification and properties of L-serine dehydratase from *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931. *Curr Microbiol* **22**: 205-211.
- Flavin, M., und Slaughter, C. (1964) Cystathionine Cleavage Enzymes of *Neurospora*. *J Biol Chem* **239**: 2212-2219.
- Flint, D.H., und Allen, R.M. (1996) Ironminus signSulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem Rev* **96**: 2315-2334.
- Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., und Kaneshiro, E.S. (1995) Uptake and metabolism of L-serine by *Pneumocystis carinii carinii*. *J Eukaryot Microbiol* **42**: 669-675.
- Fothergill-Gilmore, L.A., und Watson, H.C. (1989) The phosphoglycerate mutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **62**: 227-313.
- Fountoulakis, M., und 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.
- Fraser, H.I., Kvaratskhelia, M., und White, M.F. (1999) The two analogous phosphoglycerate mutases of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **455**: 344-348.
- Gale, E.F., und Stephenson, M. (1938) Factors influencing the activity of DL-serine deaminase in *Bacterium coli*. *J Biol Chem* **32**: 392-404.

- Gannon, F., Bridgeland, E.S., und Jones, K.M. (1977) L-serine dehydratase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochem J* **161**: 345-355.
- Gourdon, P., Baucher, M.F., Lindley, N.D., und Guyonvarch, A. (2000) Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2981-2987.
- Grabowski, R., und Buckel, W. (1991) Purification and properties of an iron-sulfur-containing and pyridoxal- phosphate-independent L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *Eur J Biochem* **199**: 89-94.
- Grabowski, R., Hofmeister, A.E., und Buckel, W. (1993) Bacterial L-serine dehydratases: a new family of enzymes containing iron-sulfur clusters. *Trends Biochem Sci* **18**: 297-300.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., und 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.
- Gubler, M., Jetten, M., Lee, S.H., und Sinskey, A.J. (1994) Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2494-2500.
- Guide to Aminex HPLC-Columns*, Bio-Rad, München.
- Gutmann, M. (1993) Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports. *Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Hama, H., Sumita, Y., Kakutani, Y., Tsuda, M., und Tsuchiya, T. (1990) Target of serine inhibition in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 1211-1216.
- Han, L., Doverskog, M., Enfors, S.O., und Haggstrom, L. (2002) Effect of glycine on the cell yield and growth rate of *Escherichia coli*: evidence for cell-density-dependent glycine degradation as determined by ¹³C NMR spectroscopy. *J Biotechnol* **92**: 237-249.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: Glover, D.M. (ed.); DNA cloning, Vol. 1, IRL Press, Oxford **109-136**.
- Hesslinger, C., Fairhurst, S.A., und Sawers, G. (1998) Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L- threonine to propionate. *Mol Microbiol* **27**: 477-492.
- Hofmeister, A.E., Grabowski, R., Linder, D., und Buckel, W. (1993) L-serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups. *Eur J Biochem* **215**: 341-349.

- Hofmeister, A.E., Textor, S., und Buckel, W. (1997) Cloning and expression of the two genes coding for L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: relationship of the iron- sulfur protein to both L-serine dehydratases from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 4937-4941.
- Hoischen, C., und Krämer, R. (1990) Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **172**: 3409-3416.
- Holms, W.H. (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul* **28**: 69-105.
- Ikeda, M., Nakanishi, K., Kino, K., und Katsumata, R. (1994) Fermentative production of tryptophan by a stable recombinantstrain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 674-678.
- Ikeda, M., und Katsumata, R. (1999) Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2497-2502.
- Ikeda, M., Okamoto, K., und Katsumata, R. (1999) Cloning of the transketolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 201-206.
- Ikeda, M., und Nakagawa, S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **13**: (published online: DOI 10.1007/s00253-003-1328-1).
- Ingraham, J.L., Maaloe, O., und Neidhardt, F.C. (1983) Growth of the bacterial cell. Sinaeur Associates Inc., Sunderland, MA.: 124-125.
- Isenberg, S., und Newman, E.B. (1974) Studies on L-serine deaminase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **118**: 53-58.
- Izumi, Y., Yoshida, T., Miyazaki, S.S., Mitsunaga, T., Ohshiro, T., Shimao, M., Miyata, A., und Tanabe, T. (1993) L-Serine production by a methylotroph and its related enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**: 427-432.
- Jakoby, M., Ngouoto-Nkili, C.E., und Burkovski, A. (1999) Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques* **13**: 437-441.
- Jetten, M.S., und Sinskey, A.J. (1995) Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**: 221-227.
- Jones, B.M., und Gilligan, J.P. (1983) o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatography* **266**: 471-482.

- Keen, R.E., Nissenson, C.H., und Barrio, J.R. (1993) Analysis of femtomole concentrations of α -ketoisocaproic acid in brain tissue by precolumn fluorescence derivatization with 4,5-dimethoxy-1,2-diaminobenzene. *Analytical Biochemistry* **213**: 23-28.
- Keilhauer, C., Eggeling, L., und Sahm, H. (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**: 5595-5603.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O., und Yanofsky, C. (2000) DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12170-12175.
- Kim, J.W., Kim, H.J., Kim, Y., Lee, M.S., und Lee, H.S. (2001) Properties of the *Corynebacterium glutamicum metC* gene encoding cystathionine beta-lyase. *Mol Cells* **11**: 220-225.
- Kimura, E. (2003) Metabolic engineering of glutamate production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**: 37-57.
- Kinoshita, S., Udaka, S., und 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., und Pfaff, E. (1977) Means of terminating reactions. *Methods Enzymol.* **10**: 680-684.
- Kubota, K. (1984) Improved production of L-Serine by mutants of *Corynebacterium glycinophilum* with less serine dehydratase activity. *Agric Biol Chem* **49**: 7-12.
- Kubota, K., Yokozeki, K., und Ozaki, H. (1989) Effects of L-Serin dehydratase activity on L-Serine production by *Corynebacterium glycinophilum* and an Examination of the properties of the enzyme. *J Ferment Bioeng* **67**: 391-394.
- Kuhn, N.J., Setlow, B., und Setlow, P. (1993) Manganese(II) activation of 3-phosphoglycerate mutase of *B. megaterium*: pH-sensitive interconversion of active and inactive forms. *Arch Biochem Biophys* **306**: 342-349.
- Landi, L., Pasquali, P., und Marchetti, M. (1966) Folic acid and biotin on the metabolism of 1 carbon unit: utilization of beta-carbon of serine for the synthesis of methionine. *Experientia* **22**: 362-363.
- Laroche, M., Pukall, R., und Ulber, R. (2003) Gewinnung und Charakterisierung einer L-Serindehydratase aus dem marinen Bakterium *Paracoccus seriniphilus* zum Aufbau bioanalytischer Systeme. *Chemie Ingenieur Technik* **75**: 146-149.
- Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V.F., und Udden, G. (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 521-532.

- Lengeler, J.W., Drews, G. und Schlegel, H.G. (1999) Biology of the procaryotes. *Thieme Stuttgart*.
- Leyva-Vazquez, M.A., und Setlow, P. (1994) Cloning and nucleotide sequences of the genes encoding triose phosphate isomerase, phosphoglycerate mutase, and enolase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 3903-3910.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., und Schleifer, K.H. (1989) High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett.* **65**: 299-304.
- Lin, R.T., D'Ari, R., und Newman, E.B. (1990) The leucine regulon of *E. coli* K12: a mutation in *rbIA* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons. *J Bacteriol* **172**: 4529-4535.
- Lindroth, P., und Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal Chem* **51**: 1167-1174.
- Link, A.J., Phillips, D., und Church, G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-6237.
- Madan, V.K., und Nath, M. (1983) Threonine (serine) dehydratase from *Cuscuta campestris* Yunck. *Biochem Physiol Pflanzen* **178**: 43-51.
- Martin, W.J. (1966) Antibacterial management of infections due to gram-negative bacilli. Use of the tetracyclines, chloramphenicol, polymyxin B, cycloserine paromomycin. *Surg Gynecol Obstet* **122**: 997-1002.
- Marx, A., Graaf, A.A.d., Wiechert, W., Eggeling, L., und Sahm., H. (1996) Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol Bioeng* **49**: 111-129.
- Marx, A., Eikmanns, B.J., Sahm, H., de Graaf, A.A., und Eggeling, L. (1999) Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metab Eng* **1**: 35-48.
- McFall, E., und Newman, E.B. (1996) Amino acids as carbon sources. In: Neidhardt FC et al. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd edn. ASM Press, Washington DC: 358-379.
- McKittrick, J.C., und Pizer, L.I. (1980) Regulation of phosphoglycerate dehydrogenase levels and effect on serine synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **141**: 235-245.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L., und Sahm, H. (1989) nfluence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *App Environ Microbiol* **55**: 684-688.

- Miller, E.M., und Nickoloff, J.A. (1995) *Escherichia coli* Electrotransformation. In Electroporation Protocols for Microorganism. *Humana Press Inc., Totowa, New Jersey* **47**: 105-113.
- Mori, M., und Shiio, I. (1987) Phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agr Biol Chem* **51**: 2671-2678.
- Morikawa, Y., Nakamura, N., und Kimura, K. (1974) Purification and some properties of L-Serine dehydratase. *Agr Biol Chem* **38**: 531-537.
- Mullis, K.B., und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nakagawa, S. (2002) The complete genome sequencing of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. In: Proceedings of the 9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Gyeongju, Korea, 1-5 July 2002: 21.
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., und Schaechter, M. (1990) Physiology of the Bacterial Cell: a Molecular Approach. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Newman, E.B., Miller, B., und Kapoor, V. (1974) Biosynthesis of single-carbon units in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* **338**: 529-539.
- Newman, E.B., und Kapoor, V. (1980) *In vitro* studies on L-serine deaminase activity of *Escherichia coli* K12. *Can J Biochem* **58**: 1292-1297.
- Newman, E.B., Ahmad, D., und Walker, C. (1982a) L-Serine deaminase activity is induced by exposure of *Escherichia coli* K-12 to DNA-damaging agents. *J Bacteriol* **152**: 702-705.
- Newman, E.B., Malik, N., und Walker, C. (1982b) L-serine degradation in *Escherichia coli* K-12: directly isolated *ssd* mutants and their intragenic revertants. *J Bacteriol* **150**: 710-715.
- Newman, E.B., und Walker, C. (1982) L-serine degradation in *Escherichia coli* K-12: a combination of L- serine, glycine, and leucine used as a source of carbon. *J Bacteriol* **151**: 777-782.
- Newman, E.B., Dumont, D., und Walker, C. (1985a) *In vitro* and *in vivo* activation of L-serine deaminase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **162**: 1270-1275.
- Newman, E.B., Miller, B., Colebrook, L.D., und Walker, C. (1985b) A mutation in *Escherichia coli* K-12 results in a requirement for thiamine and a decrease in L-serine deaminase activity. *J Bacteriol* **161**: 272-276.
- Norrander, J.M., Kempe, T., und Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-106.

- Ogawa, H., Konishi, K., und Fujioka, M. (1989) The peptide sequences near the bound pyridoxal phosphate are conserved in serine dehydratase from rat liver, and threonine dehydratases from yeast and *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **996**: 139-141.
- Oh, H., Park, Y., und Park, C. (1999) A mutated PtsG, the glucose transporter, allows uptake of D-ribose. *J Biol Chem* **274**: 14006-14011.
- Ohmori, S., Nose, Y., Ogawa, H., Tsuyama, K., und Hirota, T. (1991) Fluorimetric and high-performance liquid chromatographic determination of D-lactate in biological samples. *Journal of Chromatography* **566**: 1-8.
- Ohnishi, J., Mitsunashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K., und Ikeda, M. (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 217-223.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., und Saier, M.H., Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1-34.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G.A., Weil, B., Krämer, R., und Titgemeyer, F. (2001) *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 423-428.
- Pardee, A.B., und Prestidge, L.S. (1955) Induced formation of serine and threonine deaminases by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **70**: 667-674.
- Petersen, S., de Graaf, A.A., Eggeling, L., Mollney, M., Wiechert, W., und Sahm, H. (2000) *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **275**: 35932-35941.
- Peters-Wendisch, P. (1992) Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. *Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Peters-Wendisch, P., Netzer, R., Eggeling, L., und Sahm, H. (2002) 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 437-441.
- Peters-Wendisch, P.G., Wendisch, V.F., de Graaf, A.A., Eikmanns, B.J., und Sahm, H. (1996) C3-carboxylation as an anaplerotic reaction in phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **165**: 387-396.
- Pfefferle, W., Möckel, B., Bathe, B., und Marx, A. (2003) Biotechnological manufacture of lysine. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**: 59-112.
- Pizer, L.I., und Potochny, M.L. (1964) Nutritional and regulatory aspects of serine metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **88**: 611-619.

- Plamann, M.D., und Stauffer, G.V. (1989) Regulation of the *Escherichia coli glyA* gene by the *metR* gene product and homocysteine. *J Bacteriol* **171**: 4958–4962.
- Polen, T. (2002) Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. *Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F., und Bolivar, F. (1995) Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J Bacteriol* **177**: 5719-5722.
- Ponce, E., Martinez, A., Bolivar, F., und Valle, F. (1998) Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **58**: 292-295.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., und Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., und Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Pruss, B.M., Nelms, J.M., Park, C., und Wolfe, A.J. (1994) Mutations in NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids. *J Bacteriol* **176**: 2143-2150.
- Pukall, R., Laroche, M., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Stackebrandt, E., und Ulber, R. (2003) *Paracoccus seriniphilus* sp. nov., an L-serine-dehydratase-producing coccus isolated from the marine bryozoan *Bugula plumosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 443-447.
- Radmacher, E., Vaitsikova, A., Burger, U., Krumbach, K., Sahm, H., und Eggeling, L. (2002) Linking Central Metabolism with Increased Pathway Flux: L-Valine Accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2246-2250.
- Ramotar, D., und Newman, E.B. (1986) An estimate of the extent of deamination of L-serine in auxotrophs of *Escherichia coli* K-12. *Can J Microbiol* **32**: 842-846.
- Ramseier, T.M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., und Saier, M.H., Jr. (1995) The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**: 1157-1169.
- Ravnikar, P.D., und Somerville, R.L. (1987) Genetic characterization of a highly efficient alternate pathway of serine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 2611-2617.
- Rigden, D.J., Bagyan, I., Lamani, E., Setlow, P., und Jedrzejewski, M.J. (2001) A cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homolog from *Bacillus stearothermophilus* is actually a broad specificity phosphatase. *Protein Sci* **10**: 1835-1846.

- Romano, A.H. (1986) Microbiol sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends Biotechnol* **4**: 207-213.
- Ruklisha, M., und Ionina, R. (2000) Effect of changes in the cellular energy state on glucose transport activity in *Brevibacterium flavum*. *Process Biochem* **35**: 841-848.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sawers, G. (1998) The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals. *Arch Microbiol* **171**: 1-5.
- Schafer, A., Kalinowski, J., und Puhler, A. (1994) Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl Environ Microbiol* **60**: 756-759.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., und Pühler, A. (1994) Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl Environ Microbiol* **60**: 756-759.
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V.D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., und Bott, M. (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 4404-4422.
- Schäffner, J., Winter, J., Rudolph, R., und Schwarz, E. (2001) Cosecretion and low-molecular-size medium additives increases the yield of rekombinant disulfid-bridged proteins. *App Environ Microbiol* **67**: 3994-4000.
- Shalon, D., Smith, S.J., und 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., und 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., und Eggeling, L. (2001) L-Threonine export: Use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **183**: 5317-5324.
- Simic, P., Willuhn, J., Sahm, H., und Eggeling, L. (2002) Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3321-3327.

- Simon, R., Prierer, U., und Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **11**: 784-791.
- Skerra, A., und Schmidt, T.G.M. (2000) Use of the Strep-Tag and Streptavidin for Detection and Purification of Recombinant Proteins. In *Methods in Enzymology*. Vol. 326. Thorner, J., Emr, S.D. und Abelson, J.N. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 271-304.
- Sojka, G.A., und Garner, H.R. (1967) The serine biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* **148**: 42-47.
- Somerville, R.L. (1983) Tryptophan: biosynthesis, regulation, and large-scale production. In: K.M.Herrmann und R.L. Somerville (ed.), Amino acids: biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley, Reading, Mass: 351-378.
- Sonntag, K., Schwinde, J., Graaf, A.A.d., Marx, A., Eikmanns, B.J., Wiechert, W., und Sahn, H. (1995) ¹³C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: 489-495.
- Stauffer, G.V. (1987) Biosynthesis of serine and glycine. In: Neidhardt FC, Ingraham J, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE, (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol1. American Society for Microbiology, Washington DC. **412-418**.
- Steiert, J.G., Rolfes, R.J., Zalkin, H., und Stauffer, G.V. (1990) Regulation of the *Escherichia coli glyA* gene by the *purR* gene product. *J Bacteriol* **172**: 3799-3803.
- Studier, F.W., und Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Su, H., und Newman, E.B. (1991) A novel L-serine deaminase activity in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **173**: 2473-2480.
- Su, H.S., Lang, B.F., und Newman, E.B. (1989) L-serine degradation in *Escherichia coli* K-12: cloning and sequencing of the *sdaA* gene. *J Bacteriol* **171**: 5095-5102.
- Suga, M., Sugimoto, M., Osumi, T., Nakamatsu, T., Hibino, W., und Ito, M. (2001) Method of producing L-serine by fermentation. *Ajinomoto Co., Inc. (Tokyo, JP), United States Patent* **6258573**.
- Tilg, Y. (2002) Lipidsynthese in *Corynebacterium glutamicum*: Genetische und biochemische Untersuchungen zu Acyl-CoA Carboxylasen. *Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf*.
- Tindall, K.R., und Kunkel, T.A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.

- Tsuchiya, M., und Morinaga, Y. (1988) Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *Bio/Technology* **6**: 428-430.
- Ulane, R., und Ogur, M. (1972) Genetic and physiological control of serine and glycine biosynthesis in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* **109**: 34-43.
- Ullmann, F. (2003) Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry online. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA* <http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/index.html>.
- Umbarger, H.E., und Umbarger, M.A. (1962) The biosynthetic pathway of serine in *Salmonella typhimurium*. *Biochim Biophys Acta* **62**: 193-195.
- Umbarger, H.E., M.A., U., und Siu, P.M.L. (1963) Biosynthesis of serine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **85**: 1431-1439.
- Uzan, M., und Danchin, A. (1978) Correlation between the serine sensitivity and the derepressibility of the *ilv* genes in *Escherichia coli* *relA*- mutants. *Mol Gen Genet* **165**: 21-30.
- van der Rest, M.E., Lange, C., und 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.
- Vining, L.C., und Magasanik, B. (1981) Serine utilization by *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **146**: 647-655.
- Walsh, D.A., und Sallach, H.J. (1966) Comparative studies on the pathways for serine biosynthesis in animal tissues. *J Biol Chem* **241**: 4068-4076.
- Wen, Z.T., Browngardt, C., und Burne, R.A. (2001) Characterization of two operons that encode components of fructose-specific enzyme II of the sugar:phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 337-342.
- Wendisch, V.F. (1997) Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur *in vivo*-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*. *Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Wendisch, V.F., de Graaf, A.A., Sahm, H., und Eikmanns, B.J. (2000) Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**: 3088-3096.
- Wendisch, V.F., Zimmer, D.P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N., und 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.

- Wong, H.C., und Lessie, T.G. (1979) Hydroxy amino acid metabolism in *Pseudomonas cepacia*: role of L-serine deaminase in dissimilation of serine, glycine, and threonine. *J Bacteriol* **140**: 240-245.
- Yoshida, T., Mitsunaga, T., und Izumi, Y. (1993) L-Serine production using a resting cell system of *Hyphomicrobium* strains. *J Ferment Technol* **75**: 405-408.
- Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A., und Kustu, S. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14674-14679.
- Zinecker, H., Andreesen, J.R., und Pich, A. (1998) Partial purification of an iron-dependent L-serine dehydratase from *Clostridium sticklandii*. *J Basic Microbiol* **38**: 147-155.
- Zittrich, S., und Krämer, R. (1994) Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion. *J Bacteriol* **176**: 6892-6899.

VII ANHANG

1. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

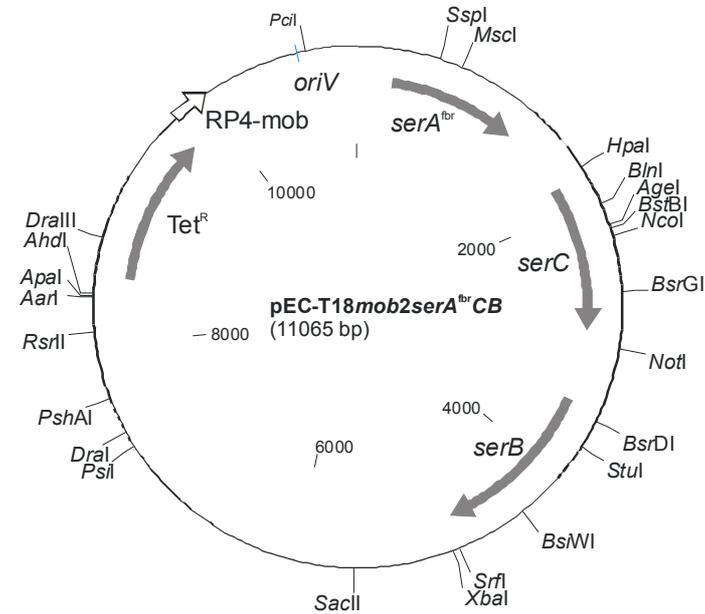


Abb. 26: Plasmid **pEC-T18mob2_serA^{fbr}CB** (pEC-T18mob2 mit einem 4,5 kb-Fragment, welches die Gene *serA*CB* enthält).

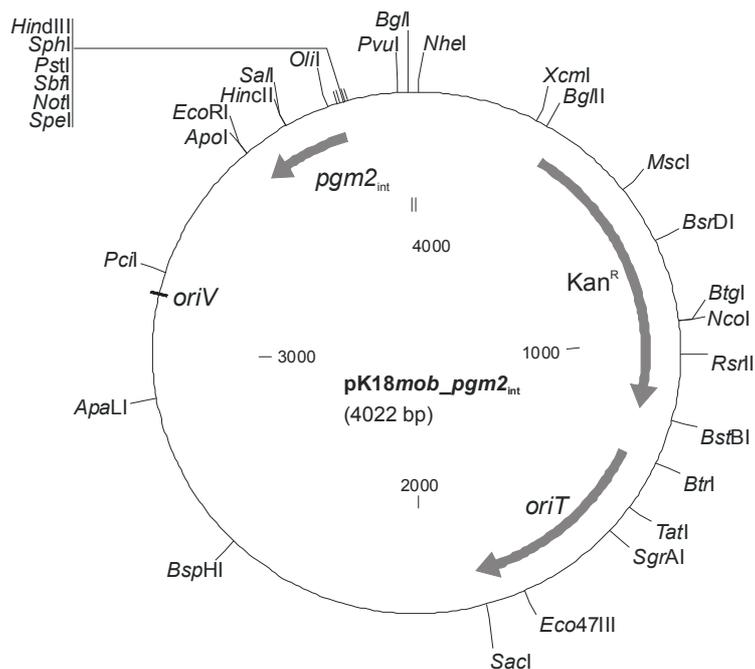


Abb. 27: Plasmid **pK18mob_pgm2_{int}** (pK18mob mit einem 252 bp *pgm2*-Fragment aus pGEM-T_pgm2_{int}, kloniert in die *EcoRI*- und *PstI*-Schnittstellen).

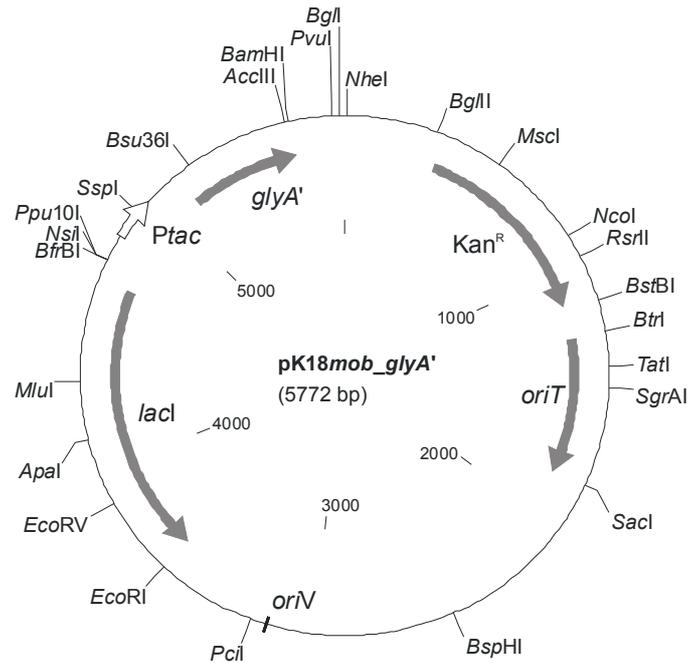


Abb. 28: Plasmid *pK18mob_glyA'*; (*pK18mob* mit einem 2,0 kb-Fragment, welches ein 5'-terminales 437 bp Fragment von *glyA*, *lacI*^q und *Ptac* enthält).

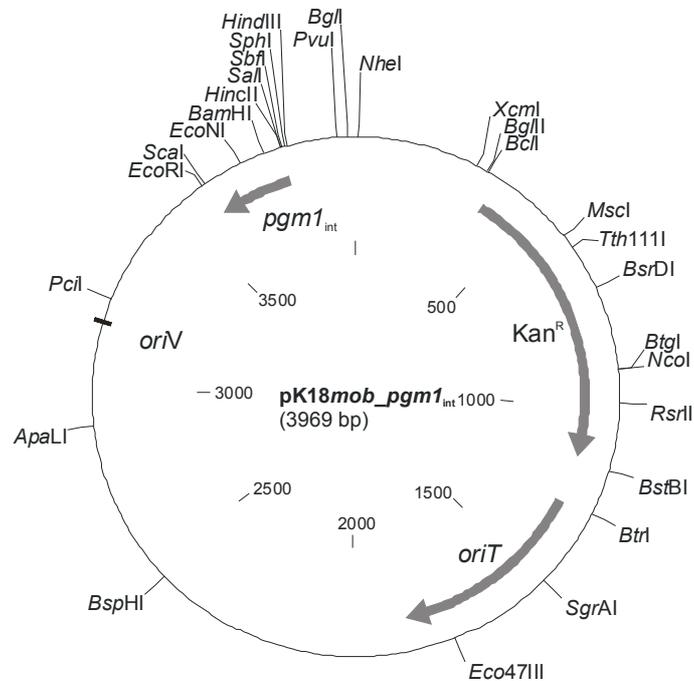


Abb. 29: *pK18mob_pgm1_int* (*pK18mob* mit einem 209 bp *pgm1*-Fragment aus *pGEM-T_pgm1_int*, kloniert in die *EcoRI*- und *Sall*-Schnittstellen).

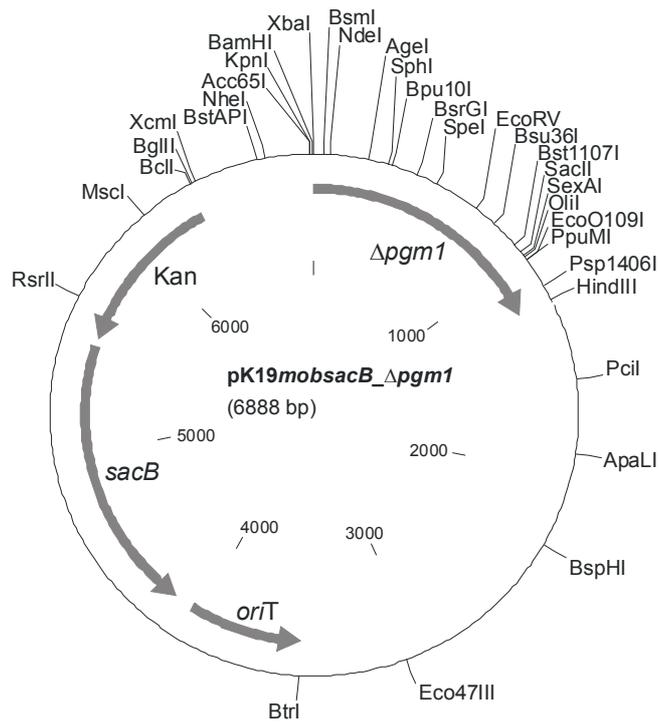


Abb. 30: pK19mobsacB_Δpgm1 (pK19mobsacB mit einem 1,22 kb „crossover“-PCR-Fragment, kloniert in die XbaI/HindIII-Schnittstellen).

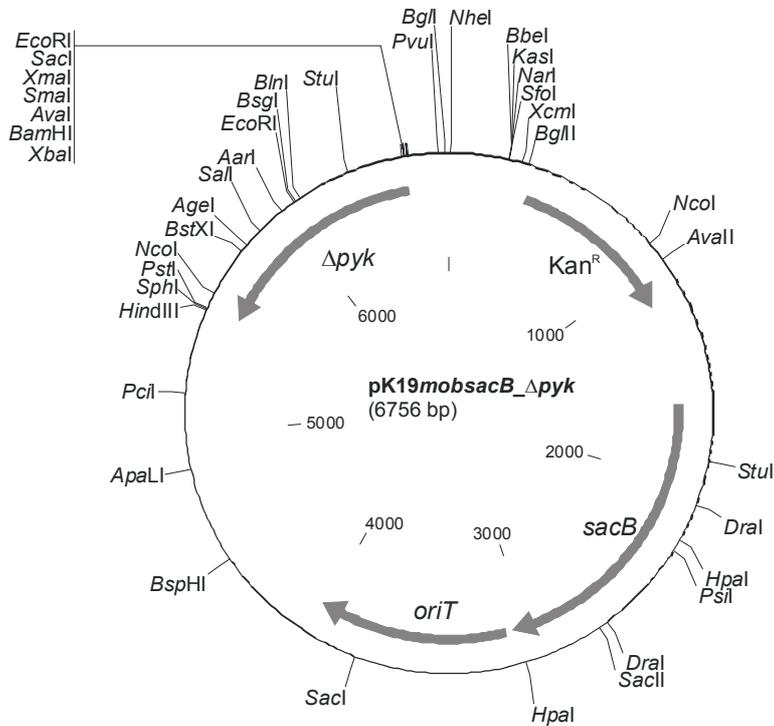


Abb. 31: pK19mobsacB_Δpyk; (pK19mobsacB mit einem 1,04 kb „crossover“-PCR-Fragment, kloniert in die XbaI/PstI-Schnittstellen).

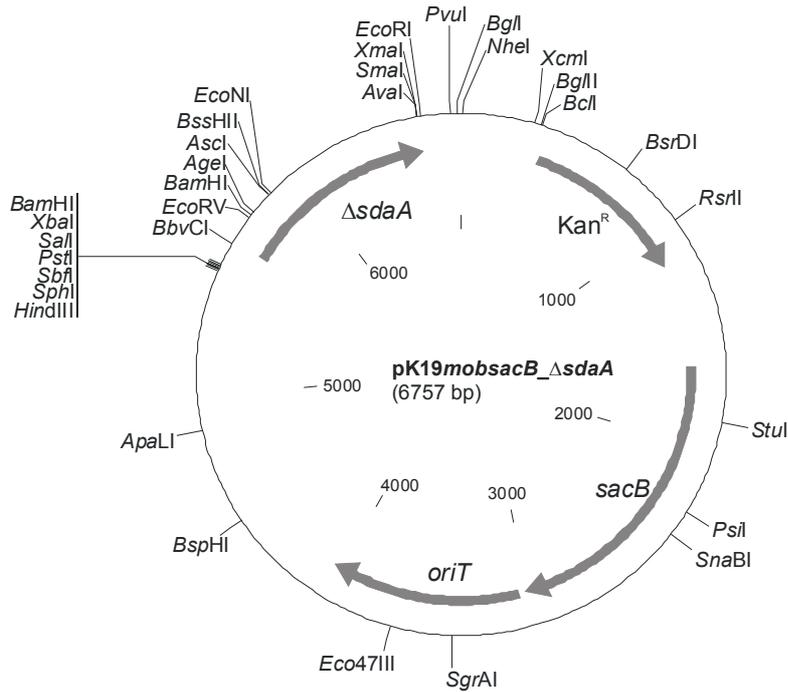


Abb. 32: pK19mobsacB_ΔsdaA; (pK19mobsacB mit einem 1,04 kb „crossover“-PCR-Fragment, kloniert in die *SmaI*-Schnittstelle).

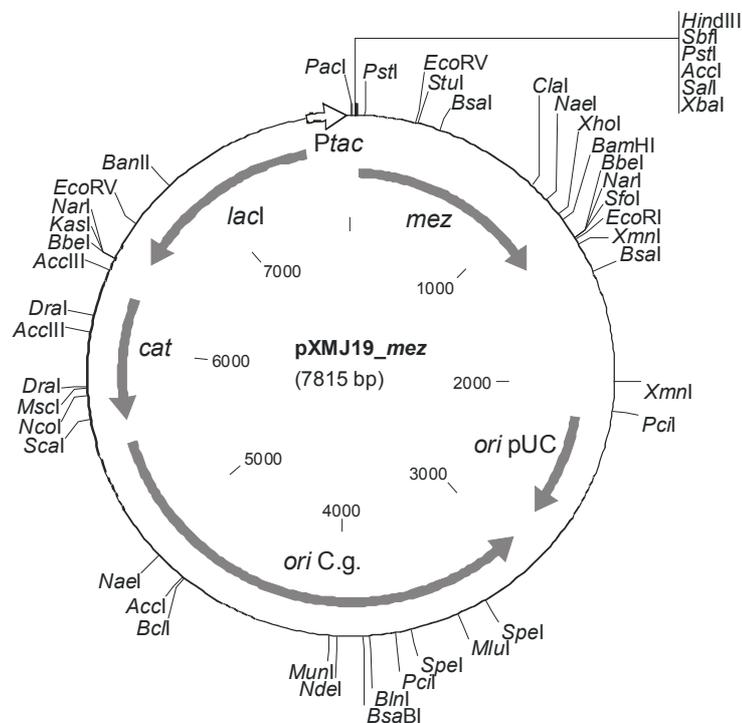


Abb. 33: Plasmid pXMJ19_mez (pXMJ19 mit einem 1,24 kb-Fragment aus pUC18_mez, welches das *mez*-Gen enthält, kloniert in die *EcoRI/XbaI*-Schnittstellen).

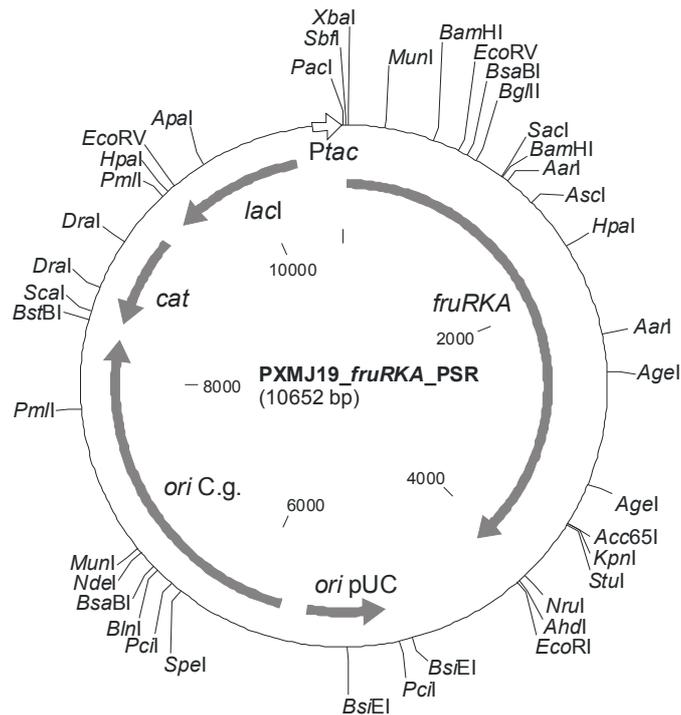


Abb. 34: pXMJ19_fruRKA_PSR (pXMJ19 mit einem 4,08 kb PCR-Fragment, welches die Gene des putativen Fructose-Operons *fruRKA* aus der PSR-Mutante enthält, kloniert in die *EcoRI/XbaI* Schnittstellen).

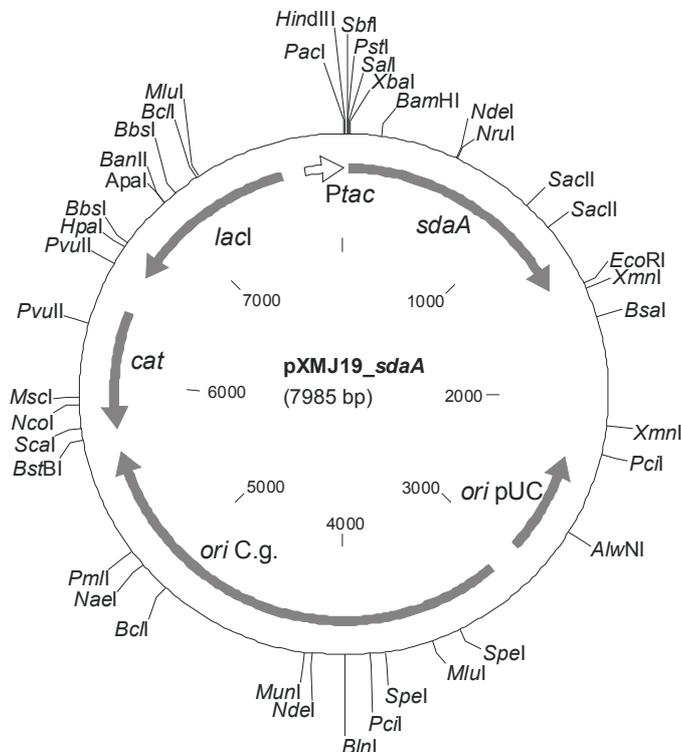


Abb. 35: Plasmid pXMJ19_sdaA (pXMJ19 mit 1,41 kb PCR-Fragment, welches das *sdaA*-Gen enthält, kloniert in die *EcoRI/XbaI* Schnittstellen).

2. Vollständige Liste des in Kapitel IV 2.2 dargestellten Experiments. Gene, die bei im Serin-Puls-Experiment im Stamm *C. glutamicum* 13032WT in Anwesenheit hoher interner L-Serin-Konzentrationen ein mehr als 2-fach erhöhtes oder reduziertes mRNA-Niveau zeigten.

Tab. 29: Differentielle Genexpression in *C. glutamicum* 13032WT bei Wachstum in Anwesenheit von 1 mM Seryl-Tripeptid (+) im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Seryl-Tripeptid (-). Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in CGXII-Minimalmedium mit 100 mM Glucose kultiviert wurden.

Orf-Nr.	NCgl-Nr.	Funktion	Gen	mRNA-Spiegel +/-
2793	1222	Acetolactat-Synthase	<i>ilvB</i>	4,6
1168	0635	Vibriobactin verwertendes Protein	<i>viuB</i>	4,0
1171	0638	Eisen-Transportprotein	<i>irp1B</i>	3,3
2282	2069	Hypothetisches Protein		3,3
1372	0791	rRNA Methyltransferase		3,3
3258	1595	Hypothetisches Protein		3,3
3316	1960	50s ribosomales Protein		3,1
1700	1073	Glucose-1-Phosphat-Adenylyltransferase	<i>glgC</i>	3,1
2281	--	Hypothetisches Protein		3,0
557	0156	Hypothetisches Protein		2,9
461	--	Hypothetisches Protein		2,9
3250	1705	Stress-sensitives Restriktionssystem-Protein 2	<i>clgIIR</i>	2,8
3002	2376	Hypothetisches Protein		2,8
444	0065	Polyprenyltransferase		2,8
2467	1511	Häm-Synthetase		2,8
178	2704	Nukleosidase		2,7
1205	0665	PEP Phosphonmutase		2,7
1608	0988	GTP-Bindeprotein		2,6
3776	0486	Ribosomales Protein		2,6
1985	1833	Hypothetisches Protein		2,5
1698	1072	Glycosyltransferase		2,5
3224	2145	Hypothetisches Protein		2,5
3700	2297	Malat-Dehydrogenase	<i>mdh</i>	2,5
3135	2215	Hypothetisches Protein		2,4
852	0376	Hypothetisches Protein		2,4
2086	1912	Transkriptioneller Terminator		2,4
3236	2133	Glutamin-Synthetase I	<i>glnA</i>	2,4
1600	0980	Exonuklease VII-Untereinheit	<i>xseB</i>	2,4
2289	2075	Zellteilungsprotein	<i>ftsZ</i>	2,4
3118	2227	Cystathionin- β -Lyase	<i>metC</i>	2,4

Tab. 29(ff): Differentielle Genexpression in *C. glutamicum* 13032WT bei Wachstum in Anwesenheit von 1 mM Seryl-Tripeptid (+) im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Seryl-Tripeptid (-).

Orf-Nr.	NCgl-Nr.	Funktion	Gen	mRNA-Spiegel +/-
1082	0567	Hypothetisches Protein		2,4
844	0371	Formyltetrahydrofolat-Hydrolase	<i>purU</i>	2,3
1080	0565	Hypothetisches Protein		2,3
65591	1409	NADH-Dehydrogenase		2,3
3698	2295	Chaperon	<i>hscA</i>	2,3
3189	2173	Hypothetisches Protein		2,3
2000	1844	RNA-Polymerase-Untereinheit	<i>sigB</i>	2,3
2534	1565	ABC-Transporter, periplasmatische Komponente		2,3
830	0359	Succinat-Dehydrogenase	<i>sdhCD</i>	2,3
2495	1534	Riboflavin-Synthase-Untereinheit		2,3
2299	2084	Zellteilungsprotein	<i>ftsI</i>	2,3
1482	0881	Hypothetisches Protein		2,3
2857	2497	Acyl-CoA Hydrolase		2,3
2979	2361	ABC-Transporter, ATPase-Komponente		2,3
2011	1852	ATP-abhängige Helikase	<i>hrpA</i>	2,3
1588	--	Hypothetisches Protein		2,3
2469	--	Hypothetisches Protein		2,2
2307	2089	Hypothetisches Protein		2,2
3788	1763	Hypothetisches Protein		2,2
3511	2409	3-Oxoacyl-Synthase		2,2
1786	1142	Nitrat Reduktase-Untereinheit	<i>narG</i>	2,2
63827	2116	Asparagin-Synthase		2,2
2716	--	Hypothetisches Protein		2,2
2415	1475	Membran-Protease-Untereinheit		2,2
1500	0895	Leucin-Transportprotein	<i>livM</i>	2,2
1380	--	Hypothetisches Protein		2,1
2333	2110	Rieske Eisen-Schwefel-Protein	<i>rpt</i>	2,1
3153	--	Hypothetisches Protein		2,1
3196	2166	Hypothetisches Protein		2,1
2002	1845	Mn ²⁺ -abhängiger transkriptioneller Regulator		2,1
3097	--	Hypothetisches Protein		2,0
1396	0811	Ammonium-Transportprotein	<i>cysQ</i>	2,0
237	2749	Hypothetisches Protein		0,4
2353	1423	Glykosyltransferase		0,4
1476	0877	Hypothetisches Protein		0,4
3472	2439	Non-Häm Ferritin	<i>ftn</i>	0,4
388	2869	Kupfer-Chaperon		0,3

Tab. 29(ff): Differentielle Genexpression in *C. glutamicum* 13032WT bei Wachstum in Anwesenheit von 1 mM Seryl-Tripeptid (+) im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Seryl-Tripeptid (-).

Orf-Nr.	NCgl-Nr.	Funktion	Gen	mRNA-Spiegel +/-
2346	1417	Sulfat-Permease		0,3
2010	1851	Hypothetisches Protein		0,3
1194	0655	Transkriptioneller Regulator		0,2

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Sahn für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegen gebracht hat.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Hummel danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Eggeling und Frau Dr. Petra Peters-Wendisch, die durch ihre hervorragende Betreuung, ihre ständige motivierende Diskussionsbereitschaft und ihren unerschöpflichen Optimismus am Gelingen dieser Arbeit sehr großen Anteil tragen.

Herrn Dr. V. Wendisch danke ich ganz besonders für die hervorragende Unterstützung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein großes Interesse an meiner Arbeit.

Bei der AG Wendisch bedanke ich mich für die Nutzung und sorgfältige Einarbeitung in die DNA-Chip-Technologie sowie die große Geduld, die Christian und Tino mit mir hatten. Malgosia Krause danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Suppressormutanten.

Meiner Arbeitsgruppe, Eva K., Eva R., Corinna, Helga, Karin, Lothar, Michael, Nicole, Petra, Petra S., Roland und Yvonne möchte ich für die herzliche Aufnahme, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und für die angenehme, hilfsbereite und lustige Atmosphäre während der letzten drei Jahre danken.

Mirja, Michael, Axel, Christina, Georg, Maren, Nicole, Olli, Thomas, Tino und Ulli danke ich für die stetige moralische Unterstützung und die netten Abende nach Arbeitsschluss. Ich hoffe diese Freundschaften bleiben immer erhalten.

Michael Stolz danke ich ganz herzlich für seine überaus engagierte Arbeit im Rahmen seines Praktikums und seiner Diplomarbeit sowie die lustige Laboratmosphäre, an der auch Helga und Eva K. großen Anteil hatten.

Axel Niebisch danke ich besonders für die Durchführung der MALDI-TOF-Analysen seine ständige freundliche Diskussionsbereitschaft.

Allen ungenannten Mitarbeitern des IBT-1 danke ich für eine ausgezeichnete Atmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft.

Ralf und Gerd danke ich für eine Freundschaft, die unersetzlich ist.

Mirja Wessel danke ich für ihre selbstlose Unterstützung in jeder Hinsicht und dass sie immer für mich da ist.

Ein besonders lieber Dank gilt meiner Familie, die mich mit Fürsorge, Verständnis, Aufmunterungen und uneingeschränkter Unterstützung durch Studium und Doktorarbeit begleitet hat.

Ich bin dankbar durch meine Zeit in Jülich wunderbare Menschen gefunden zu haben, und die einzige Rose mit vier Dornen