

**Identifizierung und Charakterisierung eines
Transkriptionsregulators der Aconitase von
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural - Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Andreas Krug

aus Kassel

Jülich, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des
Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

A. Krug, V. F. Wendisch and M. Bott (2004).

Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene *acn* in
Corynebacterium glutamicum.

Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, No. 1, 585-595

Referent: Prof. Dr. M. Bott

Korreferent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2004

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
II. EINLEITUNG.....	2
1. Valin-Produktion mit <i>C. glutamicum</i>.....	2
2. Funktion und Regulation der Aconitase im Stoffwechsel	5
3. Ziele der Arbeit.....	9
III. MATERIAL UND METHODEN.....	10
1. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	10
2. Organismen und Plasmide	11
3. Oligonukleotide.....	13
4. Nährmedien, Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung.....	16
5. Molekulargenetische Methoden	19
5.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....	19
5.1.1. Isolierung von genomischer DNA.....	19
5.1.2. Isolierung von RNA	19
5.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA	19
5.2. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	20
5.3. Rekombinante DNA-Techniken	20
5.4. Transformation von Bakterien.....	21
5.4.1. Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
5.4.2. Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> - Zellen	21
5.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
5.6. Konstruktion von <i>C. glutamicum</i>-Deletionsmutanten	22
5.7. Southern-Blot-Analyse.....	23
5.8. Primer-Extension-Analyse	25
5.9. DNase I-Footprint-Analysen.....	26
6. Elektrophoretische Methoden	27
6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
6.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
6.3. Gel-Elektrophoresen zur Trennung von DNA- und RNA- Fragmenten	28

6.3.1.	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	28
6.3.2.	RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	29
6.3.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese für die DNA- Sequenzierung und Primer-Extension-Analysen.....	29
7.	Biochemische Methoden	30
7.1.	Zellaufschluss und Fraktionierung	30
7.2.	Proteinreinigung	31
7.2.1.	StrepTactin-Affinitätschromatographie	31
7.2.2.	Affinitätsreinigung mittels Dynabeads® Streptavidin.....	32
7.3.	TCA-Fällung	33
7.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
7.5.	Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	34
7.5.1.	Detektion mit kolloidalem Coomassie.....	34
7.5.2.	Silberfärbung.....	34
7.6.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	35
7.6.1.	Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen	35
7.6.2.	Aufreinigung von Peptiden für MALDI-TOF.....	35
7.6.3.	Erstellen von Peptidmassen-Fingerprints.....	35
7.7.	Größenausschlusschromatographie	36
7.8.	Bestimmung der Aconitase-Aktivität	36
7.9.	Bestimmung der Eisenkonzentration	37
7.10.	Enzymatische Glukosebestimmung	37
7.11.	Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC	38
7.12.	Gelretardation	39
8.	DNA-Chip-Technologie	39
8.1.	Herstellung von <i>C. glutamicum</i> DNA-Chips	40
8.2.	Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips.....	40
8.3.	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	41
8.4.	DNA-Chip-Hybridisierung	42
8.5.	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	42
8.6.	Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten	43
8.7.	Archivierung von DNA-Chip-Daten	44
8.8.	Hierarchische Clusteranalyse.....	44

IV. ERGEBNISSE	46
1. Globale Expressionsanalysen zur Identifizierung neuer Zielgene für die Optimierung eines Valin-Produktionsstammes von <i>C. glutamicum</i>.....	46
1.1. Optimierung der Valin-Bildung durch Variation verschiedener Kulturparameter.....	46
1.2. Vergleichende Transkriptomanalysen von verschiedenen Valin-produzierenden Stämmen.....	49
1.3. Einfluss von NCgl0137 auf die Valin-Bildung.....	53
2. Identifizierung und Charakterisierung von AcnR, einem Repressor der Aconitase in <i>C. glutamicum</i>.....	54
2.1. Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Aconitase-Aktivität	54
2.2. Identifizierung eines Gens (<i>acnR</i>) für einen TetR-Typ-Regulator stromabwärts des <i>acn</i>-Gens für die Aconitase	55
2.3. Hinweise auf die Co-Transkription der Gene <i>acn</i> und <i>acnR</i>.....	57
2.4. Konstruktion und Charakterisierung einer $\Delta acnR$-Deletionsmutante.....	59
2.4.1. Einfluss der <i>acnR</i> -Deletion auf Wachstum und Aconitase-Aktivität.....	60
2.4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante	62
2.4.3. Einfluss von Eisen auf die globale Genexpression von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante.....	64
2.5. Identifizierung des Transkriptionsstarts des <i>acn</i>-Gens	66
2.6. Nachweis der Bindung von AcnR an den <i>acn</i>-Promotor	67
2.6.1. Heterologe Expression und Aufreinigung von AcnR	67
2.6.2. Bestimmung der nativen Größe von AcnR	68
2.6.3. DNaseI-Footprints zum Nachweis der Bindung von AcnR an den <i>acn</i> -Promotor.....	69
2.7. Gelretardationsexperimente	71
2.7.1. Verifizierung der AcnR-Binderegion.....	71
2.7.2. Suche nach dem AcnR-Effektor	74

2.8. Suche nach weiteren Transkriptionsregulatoren des <i>acn</i> -Gens mittels DNA-Affinitätschromatographie mit der <i>acn</i> -Promotorregion.....	75
2.9. Einfluss der Überexpression von <i>acnR</i> und <i>acnR</i> -Derivaten auf die Aconitase-Aktivität des Wildtyps und der $\Delta acnR$ -Mutante.....	77
3. Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsregulators NCgl0943	78
3.1. Konstruktion und Charakterisierung einer $\Delta NCgl0943$ -Mutante	78
3.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von Wildtyp und $\Delta NCgl0943$ -Mutante bei verschiedenen Eisenkonzentrationen.....	80
4. Einfluss von <i>acn</i> -Deletion und <i>acn</i> -Überexpression in <i>C. glutamicum</i>	81
4.1. Konstruktion und Charakterisierung einer Δacn -Mutante.....	81
4.2. Einfluss auf Wachstum und Aconitase-Aktivität	82
4.3. Vergleichende Transkriptomanalyse	83
4.3.1. Transkriptomvergleich von Δacn -Mutante und Wildtyp	84
4.3.2. Transkriptom-Vergleich von <i>acn</i> -Überexprimierer und Wildtyp	86
V. DISKUSSION	88
1. Einfluss der Valin-Bildung auf die globale Genexpression.....	88
2. Charakterisierung von AcnR und Einfluss auf die <i>acn</i> -Expression	90
3. Einfluss von Eisen auf die <i>acn</i> -Expression	93
4. Funktion und Regulation der Aconitase in <i>C. glutamicum</i>	95
VI. LITERATURVERZEICHNIS	99
VII. ANHANG	113

ABKÜRZUNGEN

Ω	Ohm (Widerstand)
λ	Lambda / Wellenlänge
ε	Extinktionskoeffizient
$\lambda_{EM\ max}$	Wellenlänge maximaler Emission
$\lambda_{EX\ max}$	Wellenlänge maximaler Extinktion
$^{\circ}C$	Grad Celsius
μ	Mikro- (10^{-6}) / Wachstumsrate (h^{-1})
A	Adenin / Ampere (Stromstärke)
ACN	Acetonitril
ad	Auffüllen auf (ein Volumen von)
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bid.	mehrfach destilliert (reinst)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
cm	Zentimeter
Cm^R	Chloramphenicol-Resistenz
d	Durchmesser
Da	Dalton
dest.	einfach destilliert
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5'-Triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Farad (elektrische Kapazität)
<i>g</i>	-fache Erdbeschleunigung ($9,81\ m/s^2$)
G	Guanin
g	Gramm
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
h	Stunde
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
IRP	iron regulatory protein
k	Kilo (10^3)
Kan^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
K_D	Dissoziations- bzw. Bindungskonstante
l	Liter

M	molar (mol/l)
m	milli- (10^{-3}) / -meter
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	nano- (10^{-9})
N	Nukleotid (A, C, G oder T)
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert / reduziert
NADP ⁺ / NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, oxidiert / reduziert
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
p	piko- (10^{-12})
Pa	Pascal (Druck)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönliche
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Parts per million (Teile pro Million)
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec ^R	Spectinomycin-Resistenz
ssp.	Subspezies
<i>Strep</i> -Tag	<i>Streptavidin</i> -Tag
T	Thymin
t	Tonne
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
TCA	Tricarbonsäure / Trichloressigsäure
t _E	Elongationszeit
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T _M	Schmelztemperatur der DNA
TMP	Tris-Maleat-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt (Spannung)
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
vgl.	vergleiche
vs.	versus (im Vergleich zu)
W	Watt (Leistung)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

I. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, durch Transkriptom-Vergleiche von Valin-produzierenden Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Wildtyp potentielle neue Zielgene für die Verbesserung der Produzenten-Stämme zu finden. Ein Gen für ein putatives Transport-Protein, das bei dieser Analyse auffiel, wurde deletiert und überexprimiert, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Valin-Produktion.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Funktion und Regulation der Aconitase in *C. glutamicum* durchgeführt. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. In *C. glutamicum* ist die Aktivität der Aconitase auf Kohlenstoffquellen wie Propionat, Citrat und Acetat 2,5- bis 4-fach höher als auf Glukose. Bei der Suche nach dem zugrunde liegenden Regulationsmechanismus wurde ein Transkriptionsregulator des TetR-Typs identifiziert und als AcnR bezeichnet. Das *acnR*-Gen liegt direkt stromabwärts des Aconitase-Gens *acn*. Die Deletion von *acnR* führte zu einer 5-fach erhöhten *acn*-mRNA-Konzentration und zu einer 5-fach erhöhten Aconitase-Aktivität. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei AcnR um einen Repressor der *acn*-Expression handelt. DNA-Chip-Analysen wiesen darauf hin, dass *acn* das einzige Zielgen von AcnR im *C. glutamicum*-Genom ist. Durch Primer-Extension-Analyse konnten zwei Transkriptionsstartpunkte des *acn*-Gens 110 und 113 bp stromaufwärts des *acn*-Startcodons identifiziert werden.
2. Heterolog in *E. coli* überproduziertes und aufgereinigtes AcnR bildete ein Homodimer, dass die *acn*-Promotorregion vor DNase I-Verdau im Bereich von -11- bis -28 bezüglich des ersten Transkriptionsstarts schützte. Die genomische Organisation von *acn* und *acnR* ist in allen Corynebakterien und Mycobakterien mit bekannter Genomsequenz konserviert. Durch Vergleich der *acn*-Promotorregionen aus diesen Spezies mit der in *C. glutamicum* ermittelten Binderegion konnte ein putatives Konsensus-Bindemotiv für AcnR hergeleitet werden: CAGNACnnncGTA₂CTG. Mutationen in diesem Motiv verhinderten die Bindung von AcnR an den *acn*-Promotor von *C. glutamicum*.
3. Durch DNA-Affinitätschromatographie mit der *acn*-Promotorregion konnte neben AcnR noch ein weiterer Transkriptionsregulator der Aconitase gefunden werden, nämlich RamA. Dieser Regulator konnte aus Acetat-gewachsenen *C. glutamicum*-Zellen angereichert werden. Aus Glukose-gewachsenen Zellen konnte RamA nicht angereichert werden. Vermutlich fungiert RamA bei Wachstum auf Acetat als Aktivator der *acn*-Expression.
4. Außer durch AcnR und RamA wird die *acn*-Expression auch durch den Eisen-Gehalt des Mediums reguliert, da die *acn*-mRNA-Konzentration bei Eisenmangel deutlich geringer war als bei Eisen-Überschuss. Es konnte ein Transkriptionsregulator der AraC/XylS-Familie identifiziert werden, der möglicherweise für die Eisen-abhängige Regulation der *acn*-Expression verantwortlich ist.
5. Ein *C. glutamicum*-Stamm mit deletiertem *acn*-Gen war bei Wachstum in Glukose-Minimalmedium Glutamat-auxotroph. Dies bestätigt, dass *C. glutamicum* nur ein einziges Aconitase-Gen besitzt.

II. EINLEITUNG

1. Valin-Produktion mit *C. glutamicum*

Corynebacterium glutamicum wurde 1957 als L-Glutamat ausscheidendes Bodenbakterium isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957). Es gehört zur Klasse der *Actinobacteria*, in welcher Gram-positive Eubakterien mit hohem G+C-Gehalt zusammengefasst werden. Innerhalb dieser Klasse werden sie der Ordnung der *Actinomycetales*, der Unterordnung *Corynebacterineae* und der Familie *Corynebacteriaceae* zugeordnet (Liebl, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1997). Diese Familie umfasst sowohl pathogene Arten (z.B. *C. diphtheriae*) wie auch saprophytische und nicht pathogene-Arten (Liebl, 1991). Zu der Unterordnung der *Corynebacterineae* gehören auch äußerst pathogene Arten wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. *C. glutamicum* ist zwar eng verwandt mit diesen pathogenen Mikroorganismen (chromosomale Organisation der orthologen Gene ist sehr ähnlich), gehört jedoch selbst zu den so genannten „GRAS“-Organismen („generally regarded as safe“) und wird zunehmend als Modellorganismus für mycolsäurehaltige Bakterien eingesetzt. *C. glutamicum* ist unbeweglich, Biotin-auxotroph, bildet keine Sporen und zeichnet sich durch eine stäbchen- bis keulenförmige Morphologie aus (coryne = griech. für Keule). Aufgrund der L-Glutamat-Ausscheidung unter Biotinmangel (Abe *et al.*, 1967) wurde *C. glutamicum* zu einem industriell interessanten Produktionsorganismus. Derzeit werden zwei Aminosäuren in großem Maßstab biotechnologisch mit *C. glutamicum* hergestellt, nämlich L-Glutamat (ca. 1.000.000 t/Jahr), welches in der Nahrungsmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt wird, und L-Lysin (500.000 t/Jahr), das im Wesentlichen in der Futtermittelindustrie als Futtermitteladditiv eingesetzt wird (Eggeling, 2001). Im Gegensatz zu L-Glutamat, das bereits vom Wildtyp-Stamm gebildet wird, erfolgt die L-Lysin-Bildung erst nach genetischen Veränderungen des Organismus (z.B. (Schrumpf *et al.*, 1992)).

Aufgrund der großen industriellen Bedeutung von *C. glutamicum* wurde in den letzten Jahrzehnten die Forschung an diesem Bakterium intensiviert. So wurden z.B. Methoden für gezielte molekulargenetische Veränderungen entwickelt (Sahm *et al.*, 1995; Kirchner & Tauch, 2003). Eine Vielzahl der Gene der zentralen Stoffwechselwege wie z.B. der Glykolyse (*fdx*, (von der Osten *et al.*, 1989), *tpi*, *gap*, *pgk*, (Eikmanns, 1992), *pyk*, (Jetten *et al.*, 1994) und *lpd*, (Schwinde *et al.*, 2001)),

des Pentose-Phosphat-Weges (*tkt*, (Ikeda *et al.*, 1999a; Ikeda *et al.*, 1999b)), der anaplerotischen Reaktionen (*pyc*, (Peters-Wendisch *et al.*, 2001), *ppc*, (Eikmanns *et al.*, 1989), *glk*, (Park *et al.*, 2000), *pck*, (Riedel *et al.*, 2001), *malE*, (Gourdon *et al.*, 2000)), des Tricarbonsäurezyklus (siehe Kapitel 2 der Einleitung) und des Glyoxylat-Zyklus (*aceA*, (Reinscheid *et al.*, 1994a), *aceB*, (Reinscheid *et al.*, 1994b) sind bekannt und zum Teil gut charakterisiert. Seit 2003 steht die komplette Genomsequenz (3,3 Mb) von *C. glutamicum* zur Verfügung (Kalinowski *et al.*, 2003; Ikeda & Nakagawa, 2003). Dadurch war es nun auch möglich, Untersuchungen zur globalen Genexpression durch vergleichende Transkriptomanalyse mit DNA-Chips durchzuführen (Wendisch, 2003). Zudem sind detaillierte Informationen zum Proteom der cytosolischen Proteine bekannt (Schaffer *et al.*, 2001).

Seit einigen Jahren sind Bestrebungen im Gange, *C. glutamicum* nicht nur zur Produktion von Glutamat und Lysin einzusetzen sondern auch für andere Aminosäuren (L-Glutamin, (Kusumoto, 2001); Tryptophan, (Ikeda & Katsumata, 1999); L-Cystein, (Wada *et al.*, 2002); L-Threonin, (Debabov, 2003); L-Isoleucin, (Sahm *et al.*, 1996); L-Serin, (Netzer, 2003)), darunter auch L-Valin (Keilhauer *et al.*, 1993; Radmacher *et al.*, 2002). Die verzweigtkettige Aminosäure L-Valin gehört neben L-Alanin und L-Leucin zu den Aminosäuren der Pyruvat-Familie. Sie wird in vier enzymatischen Schritten aus zwei Molekülen Pyruvat gebildet. Eine Besonderheit des Syntheseweges besteht darin, dass die vier Enzyme der Valin-Biosynthese auch die Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäure L-Isoleucin ausgehend von Pyruvat und α -Ketobutyrat katalysieren (Umbarger, 1996). Das α -Ketobutyrat wird dabei durch Deaminierung von L-Threonin gebildet. Die Reaktion wird durch die Threonin-Dehydratase (das *ilvA*-Genprodukt) katalysiert (Möckel *et al.*, 1992). Die weiteren Isoleucin-Biosyntheseschritte laufen dann analog zur Valin-Biosynthese ab. Die Acetohydroxysäuresynthase (das *ilvBN*-Genprodukt) katalysiert die Kondensation von zwei Molekülen Pyruvat zu α -Acetolactat, wobei CO_2 freigesetzt wird (Abbildung 1). Die Isomeroxydase (kodiert durch *ilvC*) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion und Isomerisierung von α -Acetolactat zu α,β -Dihydroxyisovalerat (Cordes *et al.*, 1992; Keilhauer *et al.*, 1993). Dieses Zwischenprodukt wird durch die Dihydroxysäure-Dehydratase (*ilvD*) zu α -Ketoisovalerat dehydratisiert. Die Transaminase B (*ilvE*) aminiert schließlich das α -Ketoisovalerat zu L-Valin. Das Zwischenprodukt α -Ketoisovalerat ist gleichzeitig

Ausgangssubstanz der Biosynthese von D-Pantothemat (Sahm & Eggeling, 1999) und der dritten verzweigt-kettigen Aminosäure L-Leucin.

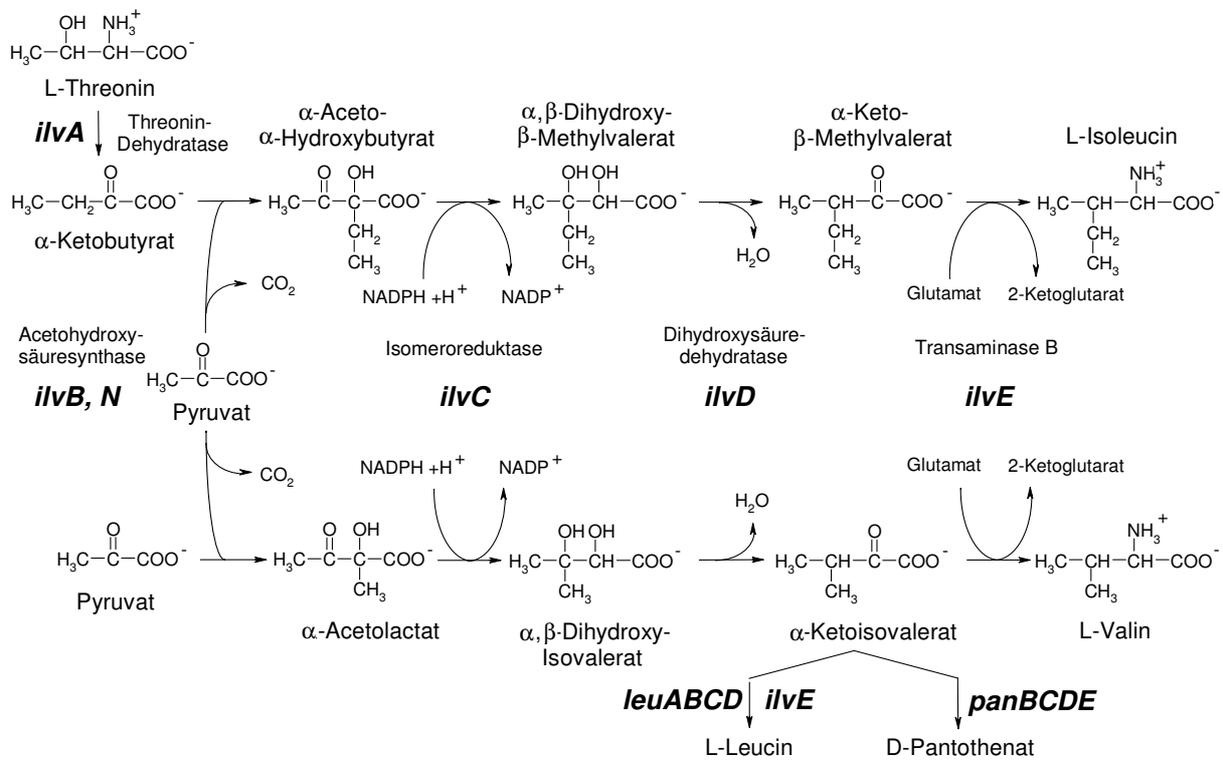


Abbildung 1: Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin.

C. glutamicum-Stämme, die bis zu 90 mM L-Valin im Medium akkumulieren können (Radmacher *et al.*, 2002), wurden durch gezielte genetische Veränderungen erzeugt. Zunächst wurden die Valin-Biosynthese-Gene *ilvB*, *ilvN*, *ilvC* und *ilvD* plasmidkodiert überexprimiert. Die Transaminasereaktion (*ilvE*) stellt, wie für die Isoleucin-Synthese gezeigt, keinen limitierenden Schritt dar (Wilhelm *et al.*, 1989). Weiterhin wurde das *ilvA*-Gen deletiert, um die Bereitstellung des Isoleucin-Vorläufermetabolits Ketobutyrat und damit die konkurrierende Bildung von L-Isoleucin zu unterbinden. Zusätzlich ermöglicht eine Kultivierung unter Isoleucin-Limitation eine gesteigerte *ilvBN*-Expression über einen Attenuationsmechanismus (Morbach *et al.*, 2000). Außerdem wurden die Gene *panBC* für zwei Schritte der Pantothemat-Biosynthese deletiert, wodurch der L-Valin-Biosynthese weniger Ketoisovalerat entzogen wird. Pantothemat ist ein Bestandteil von Coenzym A (Jackowski & Rock, 1981) und wird daher zur oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex benötigt. Kultivierung unter Pantothemat-Limitation sollte diese Reaktion verlangsamen, wodurch mehr Pyruvat als Substrat der Valin-

Biosynthese zur Verfügung stehen sollte. Neben den bereits zitierten Arbeiten zur Valin-Biosynthese in *C. glutamicum* wurden auch Untersuchungen zum Export (*brnFE*, (Kennerknecht *et al.*, 2002); (Eggeling & Sahm, 2003)) und Import (*brnQ*, (Tauch *et al.*, 1998)) von L-Valin durchgeführt. Zudem wurden Untersuchungen zum Einfluss von Valin, das dem Medium zugesetzt wurde, auf die globale Gen-Expression gemacht (Lange *et al.*, 2003).

Die verzweigt-kettigen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin sind für Vertebraten essentiell und sind als Futtermittelzusatz, bei der Nahrungsmittel-ergänzung, in Infusionslösungen, in Diätprodukten und als Vorstufe bei der chemischen Synthese von Herbiziden von kommerziellem Interesse (Eggeling, 2001; Leuchtenberger, 1996; Sahm *et al.*, 1995). Zurzeit erfolgt die Herstellung von 500 t L-Valin, 400 t L-Leucin und L-Isoleucin durch Fermentation oder durch Extraktion saurer Proteinhydrolysate (Eggeling, 2001; Leyval *et al.*, 2003). Mit zunehmendem Bedarf gewinnt die kostengünstigere und umweltfreundlichere fermentative Produktion aus Glukose an Bedeutung.

2. Funktion und Regulation der Aconitase im Stoffwechsel

Der Tricarbonsäurezyklus (TCA) nimmt eine zentrale Rolle im Metabolismus von *C. glutamicum* und anderen Bakterien ein, weil er zum einen Energie und zum anderen biosynthetische Vorstufen bereitstellt. Daher ist der Fluss durch den TCA-Zyklus von großer Bedeutung für die Produktion von Aminosäuren der Aspartat- und Glutamat-Familie aber auch anderer Aminosäuren, da z.B. ein veränderter Fluss durch den TCA-Zyklus Einfluss auf die Verfügbarkeit von Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat haben kann. Aus diesem Grund wurden bereits eine Reihe von Enzymen des TCA-Zyklus aus *C. glutamicum* biochemisch und/oder genetisch charakterisiert z.B. Citrat-Synthase (*gltA*; (Eikmanns *et al.*, 1994)), Isocitrat-Dehydrogenase (*icd*; (Eikmanns *et al.*, 1995)), α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Usuda *et al.*, 1996), Malat:Chinon-Oxidoreduktase (*mqo*; (Molenaar *et al.*, 1998)) und Malat-Dehydrogenase (*mdh*; (Molenaar *et al.*, 2000)). Allerdings gibt es bisher keine Informationen über die genetische Regulation des TCA-Zyklus in *C. glutamicum*, obwohl schon 1959 die meisten Enzyme dieses Zyklus in zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* ssp. *flavum* nachgewiesen wurden (Shiio & *et al.*, 1959). Es gibt allerdings Hinweise, dass sich die Regulation von der in

Modelorganismen wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* unterscheidet, da z.B. Glukose und Acetat parallel und nicht nacheinander verstoffwechselt werden (Wendisch *et al.*, 2000).

Die Aconitase (EC 4.2.1.3) und die Regulation dieses Enzyms ist in einigen Bakterien z.B. *B. subtilis* (Cox & Hanson, 1968; Jourlin-Castelli *et al.*, 2000) oder *E. coli* (Gruer & Guest, 1994; Cunningham *et al.*, 1997) sehr gut untersucht. Dagegen gibt es bisher keine Untersuchungen zu diesem Thema in Bakterien der Unterordnung der *Corynebacterineae*. Aconitase katalysiert im Tricarbonsäure-Zyklus und im Glyoxylat-Zyklus die stereospezifische und reversible Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat über *cis*-Aconitat. Im Methylcitrat-Zyklus katalysiert Aconitase die Hydratisierung von Methyloaconitat zu Methylisocitrat (Beach *et al.*, 1977; Brock *et al.*, 2002; Horswill & Escalante-Semerena, 2001).

Aconitasen gehören zur weit verbreiteten Gruppe von monomeren, Eisenbenötigenden Enzymen, die ein einzelnes [4Fe-4S]-Cluster als Co-Faktor enthalten. Während [4Fe-4S]-Cluster in den weitaus meisten Fällen als Elektronüberträger fungieren, dient das Cluster der Aconitase zur Bindung des Substrats (Beinert *et al.*, 1996). Entscheidend dafür ist, dass nicht wie üblich alle vier sondern nur drei Eisenionen über Cystein-SH-Reste des Proteins komplexiert werden. Das vierte Eisenion steht damit für die Bindung des Substrats und dessen Umwandlung zur Verfügung (Beinert *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1985).

Neben ihrer katalytischen Funktion besitzen einige Aconitasen auch regulatorische Funktion, indem sie in einer katalytisch inaktiven Form an untranslatierte Bereiche bestimmter mRNAs binden und dadurch entweder die Stabilität der mRNA erhöhen oder die Translation blockieren (Alen & Sonenshein, 1999; Beinert & Kiley, 1999; Tang *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004). Diese katalytische inaktive Form kann durch Eisenmangel und oxidativen Stress ausgelöst werden, wobei aus dem [4Fe-4S]-Cluster ein [3Fe-4S]-Cluster entsteht. Der Wechsel zwischen beiden Zuständen scheint reversibel zu sein (Beinert & Kennedy, 1989; Haile *et al.*, 1992). Auch die Apo-Form der Aconitase (ohne Fe-S-Cluster) kann die regulatorische Funktion als RNA-bindendes Protein übernehmen (Beinert *et al.*, 1996). In *in vitro*-Versuchen und in Anwesenheit des Substrates der Aconitase (Citrat) konnte jedoch nur die Apo-Form der Aconitase an RNA binden nicht aber das Protein mit einem [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster. In Abwesenheit des Substrates war auch die Aconitase mit einem

[3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster in der Lage, an RNA zu binden (Haile *et al.*, 1992; Beinert *et al.*, 1996).

Generell lassen sich Aconitasen in fünf phylogenetische Gruppen einteilen: Gruppe 1 umfasst mitochondriale Aconitasen (mAcn), Gruppe 2 cytoplasmatische Aconitasen aus Eukaryonten (cAcn), Eisen-regulierende Proteine (IRP) höherer Organismen und bakterielle Aconitasen (AcnA), Gruppe 3 Homoaconitasen, Gruppe 4 Isopropylmalat-Isomerasen (IPMI) aus Pilzen und Bakterien und Gruppe 5 bakterielle Aconitasen (AcnB) (Gruer *et al.*, 1997). Da sowohl die cAcn/IRP-Proteine aus höheren Organismen (mAcn-Proteine auch, ist aber nicht deren vornehmliche Aufgabe) als auch die bakteriellen AcnB- und AcnA-Apoproteine an mRNAs binden können, gibt es keine obligatorische Beziehung zwischen phylogenetischer Gruppe und Bifunktionalität (Williams *et al.*, 2002).

In *E. coli* gibt es zwei Aconitasen, AcnB und AcnA (Blank *et al.*, 2002; Bradbury *et al.*, 1996; Gruer & Guest, 1994). Die Aconitase B (*acnB*-Genprodukt, Gruppe 5) ist das primäre TCA-Zyklus-Enzym. Aconitase A (*acnA*-Genprodukt, Gruppe 3) kann die Funktion der Aconitase B zum Teil übernehmen, wenn das *acnB*-Gen deletiert ist (Gruer & Guest, 1994). Sie scheint jedoch vornehmlich als regulatorisches Protein unter Stressbedingungen und in der stationären Phase zu dienen (Cunningham *et al.*, 1997). Darüber hinaus besitzen die Aconitasen in *E. coli* noch weitere regulatorische Funktionen (Tang & Guest, 1999; Tang *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004). Auch für andere Bakterien wurde gezeigt oder postuliert, dass die Aconitase als bifunktionales Protein fungieren kann z.B. in *B. subtilis* (Alen & Sonenshein, 1999), in *Xanthomonas campestris* (Wilson *et al.*, 1998), in *Streptomyces coelicolor* (Viollier *et al.*, 2001) und im hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (Uhrigshardt *et al.*, 2002).

Hinsichtlich der genetischen Regulation wurden insbesondere die Aconitasen von *B. subtilis* und *E. coli* untersucht. Für das Aconitase-Gen aus *B. subtilis* (*citB*) wurde folgender Regulationsmechanismus beschrieben: CcpC, ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie, unterdrückt die Expression von *citB* während des Wachstums auf Minimalmedium mit Glukose und Glutamin (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000). Auf schlecht zu verstoffwechselnden Kohlenstoffquellen wie Citrat oder Succinat wird die Repression von *citB* wieder aufgehoben (Rosenkrantz *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 2002). Demnach unterliegt die Expression von *citB* einer Art Katabolitrepression. CcpC kann an zwei Regionen (an eine Wiederholung bei -59 bis -64 und -68 bis -73 und einfach

an -27 bis -32 relativ zum Transkriptionsstart) an den *citB*-Promotor binden. Wenn CcpC an beide Stellen bindet, wird die DNA zwischen beiden Regionen gebogen und die Bindung der RNA-Polymerase verhindert. In Anwesenheit des Effektors (Citrat) wird die Bindung von CcpC an die -27-Region inhibiert, wodurch die Biegung teilweise aufgehoben wird und die RNA-Polymerase an den *citB*-Promotor binden kann (Kim *et al.*, 2003b). Das Regulatorprotein CcpA kann die *citB*-Expression indirekt beeinflussen, indem es die Expression des Citrat-Synthase-Gens *citZ* und als Folge davon die intrazelluläre Konzentration von Citrat, dem Induktor von CcpC, reguliert (Kim *et al.*, 2002). Darüber hinaus scheint es noch weitere Regulationsmechanismen zu geben, die die Expression von *citB* beeinflussen (Kim *et al.*, 2003a).

In *E. coli* ist die transkriptionelle Regulation der beiden Aconitase-Gene *acnA* und *acnB* von mehreren globalen Regulatoren abhängig (Cunningham *et al.*, 1997). Der *acnA*-Promotor wird direkt oder indirekt durch CRP (cAMP receptor protein), FruR (fructose repressor), Fur (ferric uptake repressor) und SoxRS (superoxide stress-regulator/sensor) aktiviert und durch ArcA (aerobic respiratory control) und FNR (fumarate nitrate reduction) reprimiert. Der *acnB*-Promotor wird durch CRP aktiviert und durch ArcA, Fis (factor for inversion stimulation) und FruR reprimiert. AcnA wird dabei in der stationären Phase und durch Eisen und oxidativen Stress induziert. Dabei stabilisiert AcnA während oxidativem Stress das *sodA*-Transkript, während AcnB dessen Stabilität verringert (Tang *et al.*, 2002). Das *sodA*-Gen kodiert für die Superoxid-Dismutase, die Superoxid (O_2^-) mit Protonen zu O_2 und H_2O_2 umsetzt. In *E. coli* aktiviert Superoxid neben vielen anderen Proteinen auch das SoxRS-Regulon (Tsaneva & Weiss, 1990), das auch das *acnA*-Gen umfasst (Cunningham *et al.*, 1997). AcnA selbst ist relativ insensitive gegenüber Superoxid und Eisenmangel, während AcnB inaktiviert wird. Die höhere Instabilität des Fe-S-Clusters der Aconitase B gegenüber der Aconitase A steht möglicherweise im Zusammenhang mit dem Eisen-Stoffwechsel. Inaktives AcnB führt zur Akkumulation und Ausscheidung von Citrat, das ein hervorragender Eisenchelator ist. Der Eisen-Citrat-Komplex wiederum kann durch spezifische Transportsysteme in die Zelle aufgenommen werden (Clarke *et al.*, 2001). Die Labilität des Fe-S-Clusters von AcnB könnte es also *E. coli* erlauben, Eisenmangel zu detektieren und darauf zu reagieren (Varghese *et al.*, 2003).

3. Ziele der Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, mittels globaler Expressionsanalysen *C. glutamicum*-Stämme zu charakterisieren, welche die Aminosäure L-Valin bilden. Hierbei stand die Identifizierung von Genen, die aufgrund der Valin-Bildung in ihrer Expression signifikant verändert waren, im Vordergrund. Die Gene, die nicht unmittelbar an der Valin-Biosynthese beteiligt sind, waren dabei von besonderem Interesse und sollten ggf. neue Ansatzpunkte zu einer weiteren Optimierung der Produktionsstämme liefern. Dabei wurde ein potentiell Zielgen identifiziert und seine Rolle bei der Valin-Bildung durch Deletion und Überexpression analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Funktion und Regulation der Aconitase in *C. glutamicum* durchgeführt. Ausgangspunkt dieser Arbeiten war der Befund, dass der mRNA-Level des Aconitase-Gens *acn* unter bestimmten Bedingungen in Valin-Produktionsstämmen deutlich niedriger war als im Wildtyp-Stamm. Bei den Untersuchungen zur Aconitase wurden drei mögliche Regulatoren in *C. glutamicum* identifiziert, wovon einer auch näher charakterisiert wurde.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

In der Regel wurden Chemikalien der Firmen Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Seelze) mit den Reinheitsgraden „p.a.“ und „reinst“ verwendet. Alle eingesetzten Biochemikalien und Enzyme wurden von den Firma Roche Diagnostics (Mannheim) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Weiterhin wurden folgende Chemikalien folgender Firmen verwendet:

Amersham Biosciences (Freiburg): 1,4-Dithiothreitol (DTT), Harnstoff (für Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

AppliChem GmbH (Darmstadt): Low Melt Agarose (für Agarose-Gele), 3-Morpholinopropan-sulfonsäure (MOPS)

BIOMOL (Hamburg): N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)

Biozym (Hess. Oldendorf): Chilloutwax

Carl Roth GmbH (Karlsruhe): Ammoniumpersulfat (APS), Ethidiumbromid, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Zink(II)-sulfat-heptahydrat

Difco (Detroit, USA): Bacto™ Agar, BHI (Brain Heart Infusion), Hefeextrakt, Pepton, Trypton

Eurobio (Les Ulis Cedex B, Frankreich): Lachssperma-DNA

Fluka (Neu-Ulm): Acetonitril, Coomassie Brilliant Blau G-250, Natriumpropionat

GibcoBRL / Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA): Ultra Pure Agarose (Electrophoresis Grade)

2. Organismen und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Plasmidkarten neu konstruierter Plasmide sind im Anhang dargestellt. Die zur Konstruktion von Plasmiden nötigen Arbeiten wurden mit *E. coli* DH5 α durchgeführt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit eingesetzte Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum* mit den relevanten Charakteristika sowie ihrer Herkunft.

Bakterienstämme	relevanter Genotyp ^{a)}	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> (<i>r⁻</i> , <i>m⁻</i>) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> F ⁻ <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983), GibcoBRL
BL21(DE3)	<i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	(Studier & Moffatt, 1986), Novagen
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Biotin-auxotropher Wildtyp	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
13032 Δ <i>acnR</i>	<i>In-frame</i> Deletion des <i>acnR</i> -Gens	Diese Arbeit
13032 Δ <i>acn</i>	<i>In-frame</i> Deletion des <i>acn</i> -Gens	Diese Arbeit
13032 Δ NCgl0943	<i>In-frame</i> Deletion des NCgl0943-Gens	Diese Arbeit
13032 Δ <i>ramB</i>	<i>In-frame</i> Deletion des <i>ramB</i> -Gens	(Gerstmeier <i>et al.</i> , 2004)
13032 Δ NCgl0137	<i>In-frame</i> Deletion des NCgl0137-Gens	Diese Arbeit
13032 Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panBC</i>	Deletion des <i>ilvA</i> -Gens und der <i>panBC</i> -Gene	(Radmacher <i>et al.</i> , 2002)
VAL1	13032 Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panBC</i> /pJC1 <i>ilvBNCD</i>	(Radmacher <i>et al.</i> , 2002)
13032 Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panBC</i> Δ NCgl0137	Deletion des NCgl0137- und des <i>ilvA</i> -Gens und der <i>panBC</i> -Gene	Diese Arbeit
13032 Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panBC</i> Δ <i>acn</i>	Deletion des NCgl1482- und des <i>ilvA</i> -Gens und der <i>panBC</i> -Gene	Diese Arbeit
DM1730	Mutante mit vier Basenaustauschen: <i>pyc</i> ^{P458S} ; <i>hom</i> ^{V59A} ; <i>lysC</i> ^{T311I} ; <i>zwf</i> ^{A243T})	Degussa

^{a)} Genotypenbezeichnungen: siehe (Bachmann, 1990)

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Angabe der spezifischen Merkmale der Herkunft bzw. Referenzen.

Plasmid	Relevante Eigenschaften und Verwendungszweck ^{a)}	Größe [kbp]	Referenz
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R ; mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i> ; (pK18 <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>sacB</i> , <i>lacZα</i>)	5,72	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>acnR</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 0,94-kb-„Crossover“-PCR-Fragment in den <i>EcoRI</i> - und <i>HindIII</i> -Schnittstellen, das die <i>acnR</i> -flankierenden Bereiche umfasst	6,61	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>acn</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 2,08-kb-„Crossover“-PCR-Fragment in den <i>EcoRI</i> - und <i>BamHI</i> -Schnittstellen, das die <i>acn</i> -flankierenden Bereiche umfasst	7,78	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>NCgl0943</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 0,98-kb-„Crossover“-PCR-Fragment in den <i>EcoRI</i> - und <i>HindIII</i> -Schnittstellen, das die <i>NCgl0943</i> -flankierenden Bereiche umfasst	6,65	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>NCgl0137</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 0,89-kb-„Crossover“-PCR-Fragment in den <i>BamHI</i> - und <i>EcoRI</i> -Schnittstellen, das die <i>NCgl0137</i> -flankierenden Bereiche umfasst	6,59	Diese Arbeit
pET24b	Kan ^R ; Überproduktion von Proteinen mit C-terminalem Hexahistidin-Tag in <i>E. coli</i> (pBR322 <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>P_{T7}</i> , <i>lacI</i>)	5,31	Novagen
pET24b-Streptag	Kan ^R ; pET24b-Derivat zur Überproduktion von Proteinen mit C-terminalem StrepTag-II	5,34	Meyer und Bott, unveröffentlicht
pET24b- <i>acnR</i> -C	Kan ^R ; pET24b-Streptag-Derivat mit einem 0,57-kb- <i>NdeI</i> - <i>XhoI</i> -Fragment mit dem <i>acnR</i> -Gen	5,83	Diese Arbeit
pET28a	Kan ^R ; Überproduktion von Proteinen mit N-terminalem Hexahistidin-Tag in <i>E. coli</i> (pBR322 <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>P_{T7}</i> , <i>lacI</i>)	5,37	Novagen
pET28a-Streptag	Kan ^R ; pET24b-Derivat zur Überproduktion von Proteinen mit N-terminalem StrepTag-II	5,35	(Engels <i>et al.</i> , 2004)
pET28a- <i>acnR</i> -N	Kan ^R ; pET24b-Streptag-Derivat mit einem 0,57-kb- <i>NdeI</i> - <i>XhoI</i> -Fragment mit dem <i>acnR</i> -Gen	5,84	Diese Arbeit
pEKEx2	Kan ^R ; <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> Shuttle-Vektor für regulierte Genexpression (<i>P_{tac}</i> , <i>lac^Q</i> , pBL1 <i>oriV_{C.g.}</i> , pUC18 <i>oriV_{E.c.}</i>)	8,16	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)

pEKEx2- <i>acnR</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat mit einem 0,7-kb- <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI-Fragment mit dem <i>acnR</i> -Gen	8,84	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>acnR60</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat mit einem 0,2-kb- <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI-Fragment mit dem verkürztem <i>acnR</i> -Gen (180 bp)	8,34	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>acnR89</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat mit einem 0,29-kb- <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI-Fragment mit dem verkürztem <i>acnR</i> -Gen (267 bp)	8,43	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>acnR-C-Strep</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat mit einem 0,62-kb- <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI-Fragment mit dem <i>acnR</i> -Gen und C-terminalem StrepTag II unter der Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors	8,76	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>acn</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat mit einem 2,97-kb- <i>Bam</i> HI-Fragment mit dem <i>acn</i> -Gen	11,14	Diese Arbeit
pEKEx3	Spec ^R ; pEKEx2-Derivat mit Spectinomycin-Resistenz-Gen anstatt Kanamycin	8,32	Radmacher, unveröffentlicht
pEKEx3- <i>acnR</i>	Spec ^R ; pEKEx3-Derivat mit einem 0,7-kb- <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI-Fragment mit dem <i>acnR</i> -Gen	9,00	Diese Arbeit
pJC1	Kan ^R ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor; <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i>	6,11	(Cremer <i>et al.</i> , 1990)
pJC1 <i>ilvBNCD</i>	Kan ^R ; pJC1-Derivat mit <i>ilvBNC</i> - und <i>ilvD</i> -Restriktionsfragmenten unter natürlichen Promotoren	14,86	(Sahm & Eggeling, 1999)
pEC7	Cm ^R ; (keine weiteren Angaben vorhanden)	7,23	Eikmanns, unveröffentlicht
pEC7- <i>NCgl0137</i>	Cm ^R ; pEC7-Derivat mit einem 1,5-kb- <i>Bam</i> HI-Fragment mit dem <i>NCgl0137</i> -Gen	8,73	Diese Arbeit

3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (MWG Biotech, Essenberg), die bei Polymerasekettenreaktionen (PCR), Primer-Extension-Analysen, DNase I-Footprintanalysen, reverse Transkriptase-Reaktionen und DNA-Sequenzierungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen, die mit den Oligonukleotiden eingeführt wurden, sind unterstrichen und das entsprechende Enzym ist in Klammern am Ende der Sequenz aufgeführt. Komplementäre Sequenzen zur Konstruktion von „Cross Over“-PCR-Produkten sind fett hervorgehoben. Der mit Hilfe der Oligonukleotide eingefügte StrepTag II ist doppelt unterstrichen. IRD800-markierte Oligonukleotide sind am 5'-Ende mit einem * markiert. Biotin-markierte Oligonukleotide mit einem #.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Primer zur Deletion und Überexpression von NCgl0137	
533-for-2	TATATAGGATCCAGGAGTCAGGCGTGATCAGCACTGG (<i>Bam</i> HI)
533-rev-2	TATATAGGATCCGTCGGGGTAACTAAGCGGATCATCCG (<i>Bam</i> HI)
533-A-for	TATATAGGATCCTCTTGAGCCTGGGTGATTTCAAGT (<i>Bam</i> HI)
533-B-rev	CCCATCCACTAAACTTAAACA TGCTAATTCCAACCCCATGTGGT
533-C-for	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG GTCTACCTCACCTGGCAACAAATC
533-D-rev-2	TATATAGAATTCGTCGAGATAGGTGTCATCGTCG (<i>Eco</i> RI)
533-amp-for	AACCACAAGCCTATTGACAGTGATG
533-amp-rev	TTCCAGGGCAAGGATTCACCACAC
Primer zur Deletion und Überexpression von acn	
acn-for	TATATAGGATCCAAGGAGATATAGATTTGGAGCTCACTGTGACTGAAAG (<i>Bam</i> HI)
acn-rev	TATATAGGATCCCGTATTAGAAAGGACCCACCAC (<i>Bam</i> HI)
acn-A-for-2	TATATAGAATTCGCATGTTCTGGCCTGCATGAATG (<i>Eco</i> RI)
acn-B-rev	CCCATCCACTAAACTTAAACA AGTCACAGTGAGCTCCAATTCTAAC
acn-C-for	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG TACGTGCTGCGTCAGATGGCTG
acn-D-rev-3	TATATAGGATCCGTTGGTGGCATTTCAGTGGGCTTC (<i>Bam</i> HI)
Primer zur Deletion und Überexpression von acnR und acnR-Derivaten	
acnR-for	TATATAGGATCCAAGGAGATATAGATGTGTCCGTAGCGGCAGGCGAC (<i>Bam</i> HI)
acnR-rev	TATATAGAATTCGTCACGTCGCTCAGCTGCGGC (<i>Eco</i> RI)
tetR-A-for	TATATAGAATTCCTGCAGTTCCTGCAGGCGAATC (<i>Eco</i> RI)
tetR-B-rev	CCCATCCACTAAACTTAAACA GCCTGCCGCTACGGACACAATG
tetR-C-for	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG GATCTGGTCGAGGGAAGTGTCCG
tetR-D-rev	TATATAAAGCTTGTGTTAGCAACACTGTGGTGGCGCC (<i>Hind</i> III)
tetR-amp-for	CTAAGGGCACTAACCTGCTCGG
tetR-amp-rev	TTGCCAACACCACGTGTCCAGG
AcnR-strep-rev	TATATAGAATTCCTTACTTCTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTCGAG GTCGCGTTTACGGACAGTTCC (<i>Eco</i> RI)
acnR-rev-60	TATATAGAATTCCTAGGAACAGGTTTTCTTTGTCACCG (<i>Eco</i> RI)
acnR-rev-89	TATATAGAATTCATCTTCCAGCATTCCTCGCATC (<i>Eco</i> RI)
acnR-FP-for	TATATACATATGTCCGTAGCGGCAGGCGACAAAC (<i>Nde</i> I)
acnR-FP-28rev	TATATACTCGAGTTAGTTCGCGTTTACGGACAGTTC (<i>Xho</i> I)
acnR-FP-24rev	TATATACTCGAGGTCGCGTTTACGGACAGTTC (<i>Xho</i> I)

Primer für Primer Extension und DNase I-Footprintanalysen

acn-PEK-for	CCTTCATTAGTGTCTGGGCTCACG
acn-PEK-rev	GGATTTCGATGCTTGGATCGGAAG
acn-PE1	*GGGTGCTCTTAGCATTGAAGGAG
acn-PE3	*GTGAGATTTTCGCGACGGCGTCTG
acn-FP1	*GAAAGTCACATCACGCACGTACC

Primer zur Deletion von *NCgl0943*

1558-A-for	TATATAGAATTCGGATAAGGTCAAATTCCTTCGCTC (<i>EcoRI</i>)
1558-B-rev	CCCATCCACTAAACTTAAACA CAAGCTGGCAGAACTCATATCTC
1558-C-for	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG GAAGAACTTCTGAACACTCCTGTAC
1558-D-rev	TATATAAAGCTTGACGAAGAGGCCTTCGAATACTG (<i>HindIII</i>)
1558-amp-for	GTATTTTCGGTAGCGTATAAGTCC
1558-amp-rev	CCGGACAGCAGAAGGGAAATTC

Primer für reverse Transkriptase-Reaktionen und Kontroll-PCR

RT-1-for	CAGGCGACAAACCAACAAATAGCC
RT-1-rev	CTCGACCAGATCCAATACTTCGG
RT-2-for	CGAGACTCCTAAGACTGTCAAGG
RT-2-rev	GTTGCTTCTTCCAGTCGGCGTAC
RT-3-for	CAGAACCAGCTGGTTGACATCGC
RT-3-rev	CATCTGACGCAGCAGTACTGC

Primer für Gel-Retardations- und „fishing“-Experimente

Acn-for-1 (K)-2	CACAGTTCTGTGGAATGAGAATCC
Acn-for-2 (BS)-2	GTACCCATTTTCGAGCAAATCCGAC
Acn-for-3 (fish)-2	CAGGTTGGAAGTCATCACTGGAGT
Acn-Biotin-rev-2	GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACCGTCATAGGACTTGTCGCCAACTTC
Biotinprimer 1	#GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC
BS-1-for	TCCGACAAAACCGCTGCCTAGG
BS-1-rev	GGCGTCTGCTTCGGCTGAGCC
BS-2-for	AGACGTAGGGTCCTTTTCCACAG
BS-2-rev	TCATTATCCTAACAGTACAAGCGTT
BS-3-for	CAACTTTCCCGCCAGAACGCTTG
BS-3-rev	GGGTTCTTGGCGCGTCAATAACG
BS-4-for	CAACTTTCCCGCCAGATGGCTTCAACTGTTAGGA
BS-5-for	CAACTTTCCCGCGTGAACGCTTGTACTTAGGATAAT
BS-6-for	CAACTTTCCGGCCAGAACGCTTGTACTGTTTCGATAATGAAG
BS-7-for	CAACTTTCCCGCCAGAACCGAAGTACTGTTAG

Primer für die DNA-Sequenzierung

M13-fw	*TGTA AACGACGGCCAGT
M13-rv	*GGAAACAGCTATGACCATG

4. Nährmedien, Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

Nachfolgend sind die verwendeten Nährmedien aufgeführt. Sie wurden vor Verwendung für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Feste Medien wurden durch Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar (Bacto™ Agar, Difco, Detroit, USA) zu einer entsprechenden Nährlösung hergestellt, wenn nicht anders angegeben.

LB-Medium

NaCl	10,0	g
Hefeextrakt	5,0	g
Trypton	10,0	g
H ₂ O _{bid.}	ad 1000	ml

SOC-Medium

NaCl	580,0	mg	nach dem Autoklavieren:	
Hefeextrakt	5,0	g	MgCl ₂ (steril filtriert)	1,0 g
Trypton	20,0	g	Glukose	4,0 g
KCl	186,0	mg		
H ₂ O _{bid.}	ad 1000	ml		

CgIII-Medium

NaCl	2,5	g	nach dem Autoklavieren:	
Hefeextrakt	10,0	g	Glukose	20,0 g
Pepton	10,0	g		
H ₂ O _{bid.}	ad 1000	ml		

BHI-Medium

BHI	37,0	g	nach dem Autoklavieren:	
H ₂ O _{bid.}	ad 1000	ml	Glukose	20,0 g

BHIS-Medium

BHI	37,0	g	Sorbitol	91,0	g
H ₂ O _{bid.}	ad 500	ml	H ₂ O _{bid.}	ad 500	ml
getrennt Autoklavieren					

LBHIS-Medium

BHI	18,5	g	Sorbitol	91,0	g
NaCl	5,0	g	H ₂ O _{bid.}	ad 500	ml
Hefeextrakt	2,5	g			
Trypton	5,0	g			
H ₂ O _{bid.}	ad 500	ml			
getrennt Autoklavieren					

CgXII-Minimalmedium (ohne C-Quelle)

(NH ₄) ₂ SO ₄	20,0 g	nach dem Autoklavieren* ¹ :	
Harnstoff	5,0 g	<u>1 ml/l Spurensalzlösung</u> (steril filtriert)	
KH ₂ PO ₄	1,0 g	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g	MnSO ₄ · 1 H ₂ O	10,0 g
MOPS	42,0 g	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250,0 mg	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	313,0 mg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	13,3 mg	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20,0 mg
H ₂ O _{bid.}	920,0 ml	H ₂ O _{bid.}	ad 1000 ml
pH 7,0 mit KOH		pH 1,0 mit HCl	
		1 ml/l Protekatechuat* ² (steril filtriert)	
		1 ml/l Biotin* ³ (steril filtriert)	

*¹ wenn nicht anders angegeben

*² 300 mg in 3 ml 1 M NaOH lösen und ad 10 ml H₂O_{bid.} zugeben.

*³ 20 mg ad 100 ml H₂O_{bid.} (leicht erhitzen zum Lösen)

EPO-Medium

BHI	18,5 g	nach dem Autoklavieren:	
NaCl	10,0 g	Isoniazid	4,0 g
Hefeextrakt	5,0 g	Glycin	25,0 g
H ₂ O _{bid.}	ad 800 ml	Tween 80	20 ml
		H ₂ O _{bid.}	ad 200 ml
		(steril filtriert)	

E. coli-Stämme wurden im Allgemeinen in Luria-Bertani- (LB-) Medium (Sambrook & Russell, 2001) kultiviert. Nur zu Herstellung und Regeneration kompetenter *E. coli*-Zellen (vgl. 5.4.1) wurde SOC-Medium (Miller & Nickoloff, 1995) eingesetzt.

Die Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen erfolgte entweder in den Komplexmedien BHI (*Brain Heart Infusion*-Medium, Difco) mit 2 % (w/v) Glukose bzw. CgIII (Kase & Nakayama, 1972) oder im definierten Minimalmedium CgXII (Keilhauer *et al.*, 1993). Zur Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen (vgl. 5.4.2) wurde EPO-Medium (Schäfer *et al.*, 1994) und zur Regeneration nach der Elektroporation BHIS-Medium (Liebl *et al.*, 1989) verwendet. Anschließend wurden die Zellen auf LBHIS-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert.

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden nach Sambrook & Russell (2001) angesetzt, steril filtriert und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den autoklavierten Nährmedien nach Abkühlen auf ca. 50 °C in den in Tabelle 4 angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt. Die zur Kultivierung auxotropher Stämme benötigten Supplemente und die in CgXII-Minimalmedium eingesetzten Kohlenstoffquellen (C-Quellen) sind ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Medienzusätze (Antibiotika, Supplemente für auxotrophe Stämme, Kohlenstoffquellen)

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration <i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i>
Kanamycin	75 mg/ml in H ₂ O _{bid.}	50 / 50 oder 25* µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH (96 %, v/v)	34 / 15 oder 5* µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml in H ₂ O _{bid.}	100 / 250 µg/ml
L-Isoleucin	200 mM	- / 0,6 - 1,1 mM
D-Pantothenat	4,2 mM	- / 0,2 - 1 µM
L-Glutamat	2 M	- / 5 - 100 mM
D-Glukose	2,8 M	222 mM
Na-Acetat	5,5 M	244 mM
Na-Citrat / MgCl ₂	1 M / 2 M	50 mM / 100 mM
Na-Propionat	10,4 M	104 mM

* zur Selektion nach Elektroporation

Kultivierungen von *C. glutamicum*-Stämmen für Wachstumsversuche, RNA-Isolierungen und enzymatische Aktivitätsbestimmungen erfolgten immer ausgehend von einer Glycerinkultur, die auf BHI-Platten ausgestrichen wurde. Hiervon wurde eine 5 ml-Übertagkultur (BHI) angeimpft. Die Zellen wurden am Abend abzentrifugiert (5 min, 3500 x g, 4 °C) und zum Animpfen einer 60 ml-Übernachtkultur (CgXII + C-Quelle) mit einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ~ 0,1 (Glukose) bzw. ~ 1,0 (Acetat, Citrat, Propionat) verwendet. Die Kultivierung erfolgte dabei in 500 ml- Erlenmeyer-Kolben mit 2 Schikanen bei 120 Upm und 30 °C. Diese Vorkulturen enthielten die gleichen Zusätze wie die am darauf folgenden Morgen mit OD₆₀₀ = 1,0 angeimpften Hauptkulturen in CgXII-Minimalmedium, um eine 5 - 10 Generationen dauernde Adaption der Zellen an die Kultivierungsbedingungen für zu gewährleisten. Die Ernte der Hauptkulturen für RNA-Isolierung und Enzymtests erfolgte stets in der exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ von 4 - 6.

Kulturen zur Stammhaltung erfolgten im Allgemeinen in Reagenzgläsern mit 5 ml Vollmedium, die bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*C. glutamicum*) für 14 - 16 h mit 170 Upm geschüttelt wurden. Die Kulturen wurden anschließend abzentrifugiert (5 min, 3500 x g, 4 °C), in 1 ml 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

5. Molekulargenetische Methoden

5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

5.1.1. Isolierung von genomischer DNA

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* wurde nach Eikmanns *et al.* (1994) isoliert. Zur Ethanolfällung wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen eiskaltem Ethanol gemischt. Die präzipitierte DNA wurde sedimentiert (30 min Zentrifugation bei 15000 x *g* und 4 °C), mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in EB-Puffer (Qiagen, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst.

5.1.2. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA für globale Genexpressionsanalysen aus *C. glutamicum* erfolgte nach mechanischem Zellaufschluss mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) (Lange *et al.*, 2003), welches auf der Bindung von RNA an eine Silika-Matrix beruht. Dazu wurde ein Aliquot der Kultur (25 ml) zusammen mit 25 g Eis (vorgekühlt auf -20 °C) abzentrifugiert (5 min, 3500 x *g*, 4 °C) (Wendisch *et al.*, 2001). Die Zellen wurden in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) resuspendiert und 30 s lang mit 0,5 g Zirkonium-/Silica-Perlen (d = 0,1 mm, Roth, Karlsruhe) in einem Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (2 min, 14500 x *g*) wurde der Überstand zur RNA-Isolierung mit dem RNeasy Kit mit DNase-Behandlung auf der Säule nach Herstellerangaben verwendet. Die Qualität der RNA wurde durch denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (vgl. 6.3.2).

5.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden), das auf der alkalischen Lyse beruht (Birnboim & Doly, 1979). Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse präpariert, bei der die Zellen 1 h bei 37 °C mit Lysozym (20 mg/ml) im Puffer P1 aus dem Quiagen-Kit unter Schütteln inkubiert wurden (Schwarzer & Puhler, 1991). Die weiteren Schritte erfolgten dann nach dem Protokoll des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden).

5.2. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch (Specord S 100 B, Carl Zeiss, Jena) durch Messung der Extinktion (E) bei 230 - 280 nm bestimmt, wobei $E_{260} = 1$ einer Konzentration von 40 ng/ μ l RNA und 50 ng/ μ l doppelsträngiger DNA entspricht (Sambrook & Russell, 2001). Die Reinheit wurde mittels der Quotienten E_{260}/E_{280} (Protein-Verunreinigung) und E_{260}/E_{230} (Kohlenhydrat-Verunreinigung) kontrolliert, welche zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten (Sambrook & Russell, 2001).

5.3. Rekombinante DNA-Techniken

Alle verwendeten Enzyme wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) oder New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die Restriktion von DNA erfolgte im Allgemeinen nach den Angaben und mit den Puffern des Herstellers durch mindestens zweistündige Inkubation bei der benötigten Temperatur. Für analytische DNA-Restriktionen wurde ein Ansatz von 20 μ l mit maximal 5 U Enzym und 0,5 bis 1 μ g DNA gewählt. Für präparative Restriktionsansätze wurde das Volumen auf bis zu 100 μ l und die eingesetzte DNA-Menge auf 5 bis 20 μ g erhöht.

Für Ligationsreaktionen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) mit der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurde ein Stoffmengenverhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 angestrebt. Es wurden insgesamt etwa 200 ng DNA eingesetzt und die Ligationszeit auf ca. 30 min bei Raumtemperatur erhöht.

Zur Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen von Puffer-Bestandteilen, Enzymen und kurzen DNA-Fragmenten wurde das PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Hierbei bindet die DNA ab etwa 100 bp Länge selektiv an eine Silika-Matrix. Zur Abtrennung von Proteinen aus DNA-Lösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde die wässrige DNA-Lösung zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol (25 : 24 : 1) extrahiert. Zur Trennung der DNA-haltigen wässrigen Phase von der proteinhaltigen organischen Phase wurden die Proben 5 min bei 14500 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine weitere Extraktion mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1).

Zur Konzentrierung von DNA und zur Entfernung von Salzen wurde eine Fällung mit 2,5 Volumen Ethanol (-20 °C) und $1/10$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2)

durchgeführt (30 min Zentrifugation bei 14500 x *g* und 4 °C). Nachfolgend wurde mit 70 % (v/v) Ethanol (-20 °C) gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in Wasser oder Puffer gelöst.

5.4. Transformation von Bakterien

5.4.1. Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1985) verwendet. Zur Transformation wurde ein Aliquot der bei -70 °C schockgefrorenen Zellen mit 1 - 2 µl intaktem Plasmid oder 20 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s bei genau 42 °C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und mit 500 µl SOC-Medium (auf Raumtemperatur (RT) erwärmt) versetzt. Der Ansatz wurde dann für 45 min bei 37 °C geschüttelt und abschließend zu 50, 150 und ~400 µl auf vorgewärmte LB-Platten mit dem jeweils benötigten Antibiotikum ausplattiert.

5.4.2. Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation superkompetenter *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest *et al.* (1999). Von einer Übernacht-Vorkultur in CgIII-Medium mit 2 % (w/v) Glukose wurde die Hauptkultur in 100 ml EPO-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und 28 h bei 18 °C kultiviert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, die Zellen viermal mit eiskaltem, 10 %-igen (v/v) Glycerin gewaschen, in 500 µl 10 %-iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot der elektrokompenten Zellen aufgetaut, mit 0,25 - 1 µg DNA (maximal 2 µl) versetzt und in eine eiskalte, sterile Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm; VWR, Darmstadt) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 µF (Gene Pulser, Bio-Rad, Hercules, USA). Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml BHIS-Medium zugefügt und ein Hitzeschock für 6 min bei 46 °C durchgeführt. Nach einstündigem Schütteln bei 30 °C zur Regeneration wurden die Zellen auf selektiven LBHIS-Platten ausplattiert.

5.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur *in-vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten eingesetzt (Mullis & Faloona, 1987). Die Durchführung erfolgte mit dem Thermocycler Primus 25 oder 96 plus (MWG Biotech, Ebersberg). Die Temperatur zur Anlagerung der Primer („Annealing“; $T_M = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) \text{ } ^\circ\text{C}$) und die Elongationszeit ($t_E = 1 \text{ min/kb}$) richteten sich nach der Sequenz der Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden Fragments (Sambrook & Russell, 2001). Das PCR-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung (5 min, 95 °C), 35 Zyklen mit Denaturierung (30 s, 95 °C), Annealing (30 s, $T_M - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$) und Elongation (t_E , 72 °C) sowie einer abschließenden Elongation (5 min, 72 °C).

Bei PCR-Amplifikationen zur Herstellung von Genfragmenten für DNA-Chips sowie zur Überprüfung der Länge von DNA-Fragmenten wurde *Taq*-Polymerase nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Zur Verringerung der Fehlerrate wurde bei der PCR-Amplifizierung von Fragmenten, die anschließend in einen Plasmidvektor kloniert wurden, das Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt, welches neben *Taq*-Polymerase eine *Pwo*-Polymerase mit Proofreading-Aktivität (3' - 5'-Exonukleaseaktivität) enthält, oder die KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen-Merck, Darmstadt), welche laut Hersteller die beste Proofreading-Aktivität besitzt, benutzt. Für längere DNA-Fragmente (>4 kb) wurde das Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet.

Als Template (Matrize) wurden 100 - 500 ng chromosomale DNA bzw. Plasmid-DNA oder alternativ 1 - 2 μl *C. glutamicum*-Lysat eingesetzt, wozu Zellen einer Einzelkolonie in 10 μl Wasser resuspendiert und 10 min bei 95 °C erhitzt wurden.

5.6. Konstruktion von *C. glutamicum*-Deletionsmutanten

Deletionsmutanten von *C. glutamicum* wurden durch eine Kombination von „Crossover“-PCR (Link *et al.*, 1997) mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994), der in *C. glutamicum* nicht repliziert wird, konstruiert. Für die „Crossover“-PCR wurden zunächst zwei etwa 500 bp (1000 bp bei Δacn) große PCR-Produkte hergestellt, die den 5'-flankierenden Bereich inklusive der ersten 6 Codons (Primer ...A-for und ...B-rev) bzw. den 3'-flankierenden Bereich inklusive der letzten 12 Codons (Primer ...C-for und ...D-rev) des zu deletierenden Gens umfassten. Die

äußeren Primer (...A-for und ...D-rev) enthielten eine Restriktionsschnittstelle, die für die Klonierung in pK19*mobsacB* genutzt wurde. Die inneren Primer (...B-rev und ...C-for) enthielten eine 21 bp lange komplementäre Sequenz an ihrem 5'-Ende. Die beiden PCR-Fragmente wurden gereinigt und als Matrize in einer zweiten PCR mit den äußeren Primern 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 verdaut, gereinigt und in mit den gleichen Enzymen verdauten pK19*mobsacB*-Vektor kloniert. Nachdem das durch PCR erhaltene DNA-Fragment durch Sequenzierung auf etwaige Mutationen überprüft worden war, wurden fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert und der Transformationsansatz auf LBHIS-Platten (van der Rest *et al.*, 1999) mit Kanamycin ausplattiert. Da pK19*mobsacB* und seine Derivate in *C. glutamicum* nicht repliziert werden, sollte in kanamycinresistenten Klonen das Plasmid über homologe Rekombination im Bereich des Deletionskonstrukts in das Chromosom integriert worden sein. Um auf ein zweites Rekombinationsereignis zu selektionieren, wurden kanamycinresistente Klone für 24 h in BHI-Medium mit 2 % (w/v) Glukose aber ohne Kanamycin kultiviert und anschließend auf LBHIS-Platten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Bei Anwesenheit von Levansucrase, dem Produkt des *sacB*-Gens von pK19*mobsacB*, sind 10 % Saccharose für *C. glutamicum* letal. Deshalb sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch ein zweites Rekombinationsereignis aus dem Chromosom entfernt worden sein, wobei entweder der Wildtyp wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt wird. Klone, die sowohl saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden zunächst mittels Kolonie-PCR und anschließend durch Southern-Blot-Analyse mit dem „Crossover“-PCR-Produkt als Sonde überprüft.

5.7. Southern-Blot-Analyse

Bei der Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975) erfolgte der Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Transfer-Zelle (LKB VacuGene XL, Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Aliquots genomischer DNA (15 - 20 µg) wurden zunächst vollständig mit geeigneten Restriktionsenzymen über

Nacht verdaut und über ein 0,8 %-iges (w/v) Agarosegel bei 1 V/cm aufgetrennt. Parallel wurde auch Digoxigenin-markierter DNA-Standard II und III (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetrennt. Vor dem Blotten wurden zunächst die Membran und eine Maske auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Anschließend wurde der Blot zusammengesetzt: Zuerst wurde die Nylonmembran und dann die Maske aufgelegt. Danach wurde die Apparatur fixiert und das Gel aufgelegt, welches die Maske abdichten musste. Die Apparatur wurde dann an eine Pumpe (Bromma LKB 2016 VacuGene Vacuum Blotting Pump, Amersham Biosciences, Freiburg) angeschlossen (50 mbar). Vor dem Vakuum-Blotten wurde die DNA im Gel zunächst 20 min in 0,3 M; HCl depuriniert (bis der Blaumarker gelb wurde), dann 15 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH denaturiert (bis der Blaumarker wieder blau wurde) und schließlich 20 min in 1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 8,0 neutralisiert. Der Transfer erfolgte über eine Stunde in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0). Danach wurde die DNA durch dreiminütige UV-Bestrahlung kovalent auf der Nylonmembran fixiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung des Blots mit der Digoxigenin-markierten PCR-Sonde. Die Markierung der als Sonden eingesetzten PCR-Fragmente mit Digoxigenin, die Hybridisierung, das Waschen und die Detektion mit CDP-Star erfolgten mit dem DIG Chem-Link Labeling and Detektion Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die für die Herstellung der Sonden verwendeten Primer sind in Tabelle 3 angegeben. Zunächst wurde der Blot in Hybridisierungsröhren aus Glas (Bibby Sterilin ehemals Stuart Scientific, Staffordshire, UK) transferiert und mit 20 ml/100 cm² Membranfläche Prähybridisierungslösung (5 x SSC; 1 % (v/v) Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl; mit NaOH-Plätzchen auf pH 7,5 eingestellt) gelöst; 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin; 0,02 % (w/v) SDS) versetzt und die Röhren 2 - 4 Stunden bei 68 °C so langsam wie möglich im Hybridisierungsofen (Shake 'n' Stack, Thermo Life Sciences, Egelsbach) gedreht. Die Digoxigenin-markierte Sonde, von der 20 - 50 ng/ml Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung + Sonde) eingesetzt wurden, wurde vor Gebrauch denaturiert (10 min, 95°C). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wurde für eine spätere Wiederverwendung eingefroren. Vor der Detektion wurde die Membran 2 x 5 min in 50 ml 2 x SSC bei RT und 2 x 15 min in 50 ml 0,1 x SSC bei 68°C und anschließend kurz in Maleinsäurepuffer gewaschen. Danach wurde die Membran 30 min bei

Raumtemperatur in 80 ml Blockierungslösung und 30 min mit der Antikörperlösung (1:10000 Verdünnung des Antikörpers (Anti-Digoxigin-alkalische Phosphatase-Konjugat, Roche Diagnostics, Mannheim) in Blockierungsreagenz) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min mit 80 ml/100 cm² Waschpuffer (Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween[®]20) gewaschen und 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) äquilibriert. Zur Detektion wurde der Blot in eine Plastikfolie gelegt und auf die DNA-Seite 25 Tropfen/100 cm² CDP-Star-ready-to-use-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetropft. Nach ca. 5 min Inkubation wurde das Chemilumineszenz-Signal mit einer CCD-Kamera detektiert. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die AIDA-Software (Version 2.0, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) eingesetzt.

5.8. Primer-Extension-Analyse

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts und der relativen mRNA-Spiegel eines Gens unter verschiedenen Bedingungen wurden Primer-Extension-Versuche durchgeführt. Zunächst wurden 15-30 µg Gesamt-RNA von *C. glutamicum* mit 2 pmol eines IRD800-markierten Oligonukleotids hybridisiert, wobei die Oligonukleotide so gewählt wurden, dass sie unmittelbar stromabwärts des Translationsstartpunkts des entsprechenden Gens binden. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 2 µl 5 x Annealing-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1,25 mM KCl) zunächst für 5 min auf 65 °C erhitzt, um RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren und dann zur Anlagerung der Oligonukleotide langsam (0,5 °C/2 min) im Thermocycler auf 42 °C abgekühlt. Zur Synthese des komplementären cDNA-Strangs wurde ein Gemisch aus 10 µl 5 x reverse Transkriptase-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 125 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 µl DTT (100 mM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 1 µl dNTP-Gemisch (25 mM; von Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 0,5 µl Actinomycin D (5 mg/ml in Ethanol), 23 µl H₂O und 1 µl reverse Transkriptase (200 U, Superscript II, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zu dem Ansatz gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 42 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 µl RNase A-Reaktionsmix (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 µg/ml „sonicated“ Lachssperma-DNA, 0,24 µl RNase A (100 mg/ml, DNase-frei, frisch zugegeben)) gestoppt und zum Abbau der RNA 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 17 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 380 µl eiskaltem Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach der Ethanolfällung (vgl. 5.3) wurde das DNA-Pellet in

2 µl Wasser unter Schütteln gelöst und mit 2 µl Formamid-Ladepuffer (aus dem DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Freiburg) versetzt. Direkt vor dem Auftragen auf das Gel wurde die cDNA 5 min bei 70 °C inkubiert und 1 µl der Reaktion dann mittels denaturierender PAGE analysiert (vgl. 6.3.3). Zur Bestimmung der Länge des Primer-Extension-Produkts und damit des Transkriptionsstarts wurde eine DNA-Sequenzierungsreaktion mit dem gleichen markierten Primer durchgeführt, der auch für die Primer-Extension-Reaktion eingesetzt wurde. Die vier Sequenzierungsreaktionen wurden neben dem Primer-Extension-Produkt auf dem Gel aufgetrennt. Als Matrize für die DNA-Sequenzierung diente ein geeignetes PCR-Produkt.

5.9. DNase I-Footprint-Analysen

Zur Identifizierung der Bindungsstellen des Transkriptionsregulators AcnR im Promotorbereich des *acn*-Genes wurden DNase I-Footprintanalysen durchgeführt, wobei der vor dem Abbau durch DNase I geschützte Bereich der DNA-Sonden die Bindungsstelle des Proteins anzeigt.

Für die Herstellung der DNA-Sonde wurde die Promotorregion der Zielgene zunächst in einer PCR mit unmarkierten Oligonukleotiden amplifiziert, das PCR-Produkt aus dem Gel eluiert und als Template für eine PCR eingesetzt, bei der eines der Oligonukleotide am 5'-Ende eine IRD800-Markierung trug. Das IRD800-markierte PCR-Produkt wurde (ohne Aufreinigung über ein Gel) mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und anschließend mit Microcon YM-30 Mikrokonzentratoren (Millipore) auf ca. 20 µl konzentriert.

Vor der eigentlichen Footprinting-Reaktion wurde die DNA-Sonde mit dem entsprechenden DNA-bindenden Protein äquilibriert. AcnR-C und AcnR-N wurden dazu mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt (vgl. 7.2.1). In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden 0,75 - 1,5 nM IRD800-markierte DNA-Sonde mit 1 µl poly(dI-dC) (5 µg/µl, Sigma-Aldrich), 10 µl Footprinting-Salzlösung (100 mM MgCl₂, 50 mM CaCl₂), 20 µl Bindepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,05 % (v/v) Triton X-100, 500 mM NaCl) und verschiedenen Proteinmengen (5 nM - 2,5 µM Endkonzentration) gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl 0,25 µg/ml DNase I in DNase I-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT (frisch zugegeben)) und 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die

Sonde partiell fragmentiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 700 µl eiskalter Stopplösung (640 µl 96 %-iges (v/v) Ethanol, 10 µl Lachssperma-DNA („sonicated“, 2 µg/ml), 50 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung) gestoppt und die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA 30 min bei 16100 x *g* und 4 °C sedimentiert, mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in je 2,5 µl Wasser und Formamid-Ladepuffer (Thermosequenase-Kit, Pharmacia) gelöst.

Vor der Auftrennung in einem Sequenziergel (siehe 6.3.3) wurde der Ansatz 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Sequenzzuordnung des geschützten Bereichs erfolgte mittels einer parallel aufgetragenen Sequenzierungsreaktion. Dazu wurde das der Sonde entsprechende, unmarkierte PCR-Produkt als Matrize für die Sequenzierungsreaktion mit dem entsprechenden IRD800-markierten Oligonukleotid eingesetzt.

6. Elektrophoretische Methoden

Zur Darstellung von Proteinmustern und zur Überprüfung der Aufreinigung von AcnR wurden Polyacrylamidgel-Elektrophoresen unter denaturierenden und nativen Bedingungen durchgeführt. Zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten wurden Elektrophoresen sowohl in Agarose als auch in Polyacrylamidgelen durchgeführt.

6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse wurde SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt (Laemmli, 1970). Im Allgemeinen wurden 12 %-ige oder 15 %-ige Trenngele mit einem 4 %-igen Sammelgel genutzt (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad). Die Proben wurden mit 6 x Probenpuffer (350 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 6 % β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, nach Amersham Biosciences) gemischt und 5 min bei 90 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Broad Range Protein Marker (New England Biolabs) oder der Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke, die so eingestellt wurde, dass die Anfangsspannung 100 V betrug. Die maximale Spannung wurde auf 200 V begrenzt. Die Färbung der SDS-Gele erfolgte wie unter 7.5 angegeben.

6.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der nativen Größe von AcnR wurden parallel zur Gelfiltration (vgl. 7.7) Polyacrylamid-Fertigele (MicroGel, Gradipore, LTF-Labortechnik, Wasserburg) eingesetzt. Als Standard diente der „Native Molecular Weight Marker“ MW-100 der Firma Gradipore (Wasserburg). Der Gradient der nativen TBE-Microgele erstreckte sich über 3 - 20 % bzw. 5 - 40 %. Als Elektrodenpuffer diente 1 x TBE Puffer (10 x TBE Puffer = 890 mM Tris-HCl, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3), die Protein-Proben wurden 1:1 mit 2 x TBE-Probenpuffer (1 ml 10 x TBE-Puffer, 2 ml Glycerin, 1 ml 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 1 ml 0,1 % (w/v) Xylencyanol, ad 10 ml H₂O_{bid.}) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 200 - 215 V (30 mA bei 5 - 40 % bzw. 140 - 175 V (30 mA bei 3 - 20 %)).

6.3. Gel-Elektrophoresen zur Trennung von DNA- und RNA-Fragmenten

6.3.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Für Gelretardationsexperimente (vgl. 7.12) und für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (Sambrook & Russell, 2001). Je nach Fragmentgröße wurden 0,8 - 2,5 %-ige (w/v) Agarose-Gele in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,35 % (v/v) Essigsäure) hergestellt. TAE-Puffer diente auch als Elektrophorese-Puffer. Die Elektrophorese der mit 6 x Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau in 40 % (v/v) Glycerin) versetzten DNA-Probe wurde mit einer horizontalen Gelapparatur Sub-Cell GT (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung wurden die DNA-Standards 100 bp DNA Ladder (GIBCO, Karlsruhe), DNA-Standard XVI (Roche Diagnostics, Mannheim) sowie *Hind*III-geschnittene λ -Phagen DNA (200 ng/ μ l) und *Hind*III/*Eco*RI-geschnittene λ -Phagen DNA (200 ng/ μ l), die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden (Molekulargewichtsmarker II + III von Roche Diagnostics, Mannheim), eingesetzt. Nach der Auftrennung bei 75 - 120 V wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 mg/l) gefärbt, überschüssiges Ethidiumbromid mit Wasser entfernt und das Gel unter UV-Licht mit einem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) fotografiert.

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Methode beruht auf Freisetzung der DNA durch Aufschmelzen der Agarose und selektive Bindung an eine Matrix, von der die DNA isoliert werden kann.

6.3.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität isolierter RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Sambrook & Russell, 2001). Hierbei wurde 1 x MOPS-Puffer (10 x MOPS-Puffer, Eppendorf, Hamburg) als Elektrophoresepuffer und zur Herstellung des Gels (0,25 g Agarose, 2,5 ml 10 x MOPS, 18,25 ml H₂O_{bid.}, 4,25 ml Formaldehyd) verwendet. Das eingesetzte Formaldehyd wurde mit Ionenaustauscher (AG 501-X8 (D)-Resin 20 - 50 mesh, Bio-Rad) deionisiert. Die RNA-Proben (0,5 µg) wurden vor der Elektrophorese in RNA Gel Loading Buffer (Eppendorf; mit 0,7 % (v/v) 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung) für 10 min bei 65 °C und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit dem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) unter UV-Licht fotografiert.

6.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese für die DNA-Sequenzierung und Primer-Extension-Analysen

Die DNA-Sequenzierung von Plasmiden, die durch PCR-hergestellte DNA-Fragmente enthielten, sowie von PCR-Produkten, die als Größenstandards bei Primer-Extension- und DNase I-Footprint-Analysen benötigt wurden (vgl. 5.8 und 5.9) erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem Thermosequenzase-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) und dem LI-COR 4200 DNA-Sequenziergerät (MWG Biotech, Essenberg) nach den Angaben der Hersteller. Die verwendeten Oligonukleotide waren am 5'-Ende zur Detektion der Sequenzierungsprodukte mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 ($\lambda_{EX\ max}$ 795 nm, $\lambda_{EM\ max}$ 819 nm) markiert (Tabelle 3). Für die Sequenzierungsreaktion wurde zunächst ein DNA/Oligonukleotid-Prämix aus 130 ng/kb DNA, 2 pmol Primer und 4,1 % (v/v) DMSO in einem Gesamtvolumen von 17 µl erstellt. Je 4 µl dieses Prämixes wurden mit je 1 µl ddATP-, ddCTP-, ddGTP- oder ddTTP-Terminationsgemisch (Thermosequenzase-Kit) versetzt. Bei der PCR-Reaktion (vgl. 5.5) erfolgte die Anlagerung der Primer bei 57 °C, die Kettenverlängerung für 1 min bei 70 °C und die Denaturierung bei 70 °C. Die Sequenzierreaktionen wurden

mit je 2,5 µl Formamid-Ladepuffer (Thermosequenase-Kit) versetzt, 5 min bei 70 °C denaturiert und zur Erhaltung der Einzelstränge auf Eis abgekühlt. Je 1,2 µl der Proben wurden auf das Sequenziergel [21 g Harnstoff (Amersham Biosciences, Freiburg), 5,0 ml 10 x TBE (890 mM Tris-HCl, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA), 4,6 ml Long Ranger Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (Biozym, Hess. Oldendorf), 0,5 ml DMSO, 32 ml H₂O_{bid.}, 50 µl TEMED, 350 µl 10 % (w/v) APS] aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 2200 V, 37 mA, 50 W und 45 °C mit 1 x TBE als Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die Aufzeichnung und Analyse der Sequenzdaten erfolgten mit den erworbenen Software-Paketen Data Collection Modell 4200 Single Dye DEV7 und Image Analysis Version 4.1 von MWG Biotech (Ebersberg).

7. Biochemische Methoden

7.1. Zellaufschluss und Fraktionierung

Für die StrepTactin-Affinitätschromatographie von Proteinen wurde die mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Stämme in 100 ml LB-Medium kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5200 x *g*, 4 °C) geerntet, mit einem Kulturvolumen 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 gewaschen, in 10 ml dieses Puffers resuspendiert und mit 100 µl eines Proteaseinhibitor-Mixes aus Diisopropylfluorophosphat und Phenylmethylsulfonylfluorid (je 100 mM DFP und PMSF in trockenem Ethanol) versetzt.

Für die Affinitätsreinigung von Proteinen mittels DNA-beladener Dynabeads[®] wurden die *C. glutamicum*-Zellen aus 600 - 1200 ml Kultur mit 200 ml TGED-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,01 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 20 ml TGED-Puffer mit 200 µl Protease-Inhibitor-Mix (100 mM PMSF und DFP) aufgenommen.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte sowohl bei *E. coli* als auch bei *C. glutamicum* in einer French-Press-Zelle (SLM Aminco[®] Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei 108 MPa (*E. coli*) bzw. 207 MPa (*C. glutamicum*). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 5200 x *g* (StrepTactin-Affinitätschromatographie) bzw. 60 min bei 18000 x *g* (Affinitätsreinigung mit

Dynabeads) sedimentiert. Der Überstand wurde 75 min bei 150.000 x *g* in einem Type 70.1 Ti-Rotor (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) ultrazentrifugiert, um die Membranfraktion von den cytosolischen Proteinen zu trennen.

Für die Bestimmung der Aconitase-Enzymaktivität wurde *C. glutamicum* wie bei der Isolierung von RNA (vgl. 5.1.2) in 60 ml CgXII-Minimalmedium kultiviert, auf Eis geerntet und das Zellpellet zunächst schockgefroren und bei -70 °C zwischengelagert. Zum Aufschluss wurden die Zellen in 500 µl 90 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert und mit 0,5 g Zirkonium-/Silica-Perlen (*d* = 0,1 mm, Roth) versetzt. Dieses Gemisch wurde 3 x 20 s in einem Amalgamator (Silamat S5, Vivadent, Ellwangen) mit hoher Frequenz geschüttelt und dazwischen jeweils 1 min auf Eis gekühlt. Durch den mechanischen Stress wurden die Zellen aufgeschlossen. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (8 min, 18.320 x *g*, 4 °C) abgetrennt.

7.2. Proteinreinigung

7.2.1. StrepTactin-Affinitätschromatographie

AcnR mit einem StrepTag II (Sequenz: WSHPQFEK) wurde durch Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose gereinigt (Skerra & Schmidt, 2000). Die cytosolische Proteinfraction wurde zunächst zur Absättigung von biotinylierter Proteine (BCCP in *E. coli*) mit 2 µl Avidin-Lösung (5 mg/ml, aus Hühnereiweiß, Sigma, Seelze) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Säule mit StrepTactin-Sepharose (2 ml Bettvolumen, IBA, Göttingen) gegeben, die zuvor mit 5 ml 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 äquilibriert worden war. Nach Waschen mit 5 x 2 ml 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 wurde spezifisch gebundenes Protein mit 6 x 1 ml 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 15 mM Desthiobiotin (Sigma, Seelze), pH 8 eluiert. Die Säule wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 ml 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8, 1 mM 4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure (HABA) und zweimaliges Waschen mit je 8 ml dieses Puffers ohne HABA regeneriert und bei 4 °C gelagert.

Zur Lagerung und für die weiteren Versuche wurde das gereinigte Protein durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 (PD-10-Säule, Amersham Pharmacia, Freiburg) in 10 mM Tris-HCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8 umgepuffert. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 ml dieses Puffers äquilibriert und anschließend 2,5 ml Proteinlösung

auf die Säule gegeben. Das Protein wurde in insgesamt 3,5 ml Puffer eluiert und konnte so bei -20 °C gelagert. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml Puffer regeneriert.

7.2.2. Affinitätsreinigung mittels Dynabeads® Streptavidin

Zur Identifikation von DNA-bindenden Proteinen, die mit der Promotorregion des *acn*-Gens interagieren, wurde die Ziel-DNA-Sequenz (*acn*-Promoter) über Biotin an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gebunden und eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Dynabeads® M-280 Streptavidin (DynaL A. S., Oslo) sind uniforme, supramagnetische „Kugeln“, an die aufgereinigtes Streptavidin, welches Biotin mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-15}$ M) bindet, kovalent gebunden ist.

Der *acn*-Promotor (632 bp) wurde zunächst durch PCR mit unmarkierten Primern (Acn-for-3 (fish)/Acn-Biotin-rev-2) amplifiziert (vgl. 3). Das verwendete Fragment erstreckt sich dabei von Position -444 bis +188 bezüglich des Transkriptionsstarts. Dazu wurde der im 3'-Bereich bindende Primer („Reverse-Primer“) so gewählt, dass er neben der zu *acn* komplementären Sequenz am 3'-Ende auch eine 23 bp lange Sequenz enthielt, die identisch zu dem Biotinprimer 1 (vgl. 3) enthielt. Das resultierende PCR-Produkt wurde dann als Template in eine zweite PCR mit dem am 5'-Ende biotinylierten Biotinprimer 1 (vgl. 3) eingesetzt. Die Bindungskapazität der Dynabeads® M-280 Streptavidin liegt bei ca. 40 bis 50 pmol eines 300 bp langen DNA-Fragmentes pro mg Beads. Bei größeren Fragmenten ist die Bindungskapazität aufgrund der sterischen Behinderung reduziert. Die Dynabeads liegen in Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 10 mg/ml Dynabeads pro ml vor. Es wurden 206 pmol (86 µg) biotinyliertes *acn*-Promotorfragment (1 µg eines 1 kb langen DNA-Fragmentes entspricht 1,52 pmol) an 0,75 ml Dynabeads® M-280 Streptavidin (Bindungskapazität ≤ 300 pmol) gebunden.

Vor der Kopplung der DNA-Fragmente wurden die Dynabeads zunächst mit einem Ausgangsvolumen B + W-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 M NaCl) gewaschen. Die Sedimentation der Beads erfolgte in einem Dynal MPC-1 Magnethalter und der Waschpuffer wurde mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurden die Beads wieder im gleichen Puffer resuspendiert. Auch alle nachfolgenden Waschschriffe und die Proteinbindung erfolgten auf diese Weise. Die Dynabeads wurden nach einem zweiten Waschschriffe in dem gleichen Volumen (1,5 ml) wie das DNA-Fragment in

B + W-Puffer resuspendiert, mit dem biotinylierten DNA-Fragment versetzt und 1 h bei RT in einem 15 ml Falcon geschüttelt, wobei die Umdrehungszahl so gewählt wurde, dass die Dynabeads nicht sedimentierten. Anschließend wurde der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von drei Waschschrritten mit jeweils einem Ausgangsvolumen (bezogen auf die eingesetzte Menge Dynabeads[®] M-280 Streptavidin) B + W-Puffer. Zur Lagerung und bei der Verwendung zur eigentlichen Affinitätsreinigung wurden die mit den DNA-Fragmenten beladenen Dynabeads[®] M-280 Streptavidin in einem Ausgangsvolumen TGED-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,01 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl) resuspendiert.

Für die Proteinbindung wurden die *C. glutamicum*-Proteinextrakte (ca. 20 ml, vgl. 7.1) mit 500 µg chromosomaler *C. glutamicum*-DNA (vgl. 5.1.1) und den DNA-beladenen Dynabeads in einem 50 ml Falcon gemischt und 45 min bei RT unter Schütteln (wobei die Umdrehungszahl so gewählt wurde, dass die Dynabeads nicht sedimentierten) inkubiert. Danach wurde der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit 1 ml TGED, zweimal mit 2 ml TGED mit jeweils 400 µg chromosomaler *C. glutamicum*-DNA und ein weiteres Mal mit 1 ml TGED gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden dann in zwei Schritten mit jeweils 350 µl Elutionspuffer (TGED-Puffer mit 2 M NaCl) eluiert. Die Eluate wurden gepoolt, die Proteine mittels TCA gefällt (vgl. 7.3) und anschließend in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) gelöst. Diese Lösung wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (vgl. 7.5.1 und 7.5.2).

Zur Regeneration der DNA-beladenen Dynabeads wurden diese zunächst zweimal mit 1 ml Elutionspuffer und anschließend dreimal mit 1 ml B + W-Puffer gewaschen. Nach Resuspension in 1 ml TGED-Puffer konnten die DNA-beladenen Dynabeads bei 4 °C gelagert und für weitere Reinigungen eingesetzt werden.

7.3. TCA-Fällung

Zur Aufkonzentrierung von Proteinen nach der Affinitätsreinigung mittels DNA-beladener Dynabeads[®] Streptavidin wurde die Probe (700 µl) mit ¼ Volumen 100 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) vermischt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,5 ml Aceton gewaschen und wieder für 15 min bei 15.000 x g und

4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Proteine in 20 µl TE-Puffer gelöst.

7.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach der Bicinchoninsäure-Methode (Smith *et al.*, 1985) mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Als Standard wurde Rinder-Serumalbumin verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit dem BCA-Reagenz versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und vor der Messung der Extinktion bei 562 nm auf Raumtemperatur abgekühlt.

7.5. Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen

7.5.1. Detektion mit kolloidalem Coomassie

Um größere Mengen Protein nachzuweisen, erfolgte eine Färbung mit kolloidalem Coomassie (Nachweisgrenze: 50 - 200 ng). Hierfür wurde die Fertiglösung GelCode[®] Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, Illinois, USA) entsprechend der Anweisung des Herstellers verwendet.

7.5.2. Silberfärbung

Zum Nachweis geringerer Proteinmengen (Nachweisgrenze: 0,1 - 1 ng) wurde die Silberfärbung genutzt (Blum *et al.*, 1987). Hierfür wurden die Gele mindestens 30 min in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig und 500 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro Liter) inkubiert und dann 2 x 10 min in 30 % (v/v) Ethanol und einmal 10 min mit H₂O_{dest.} gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung (0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃ • 5 H₂O) und anschließendes Waschen für 3 x 20 s in H₂O_{dest.}. Als nächstes wurde das Gel 20 min in frisch angesetzter Silbernitratlösung (0,2 % (w/v) AgNO₃, 75 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro 100 ml) inkubiert und wieder 3 x 20 s mit H₂O_{dest.} gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 3 % (w/v) NaCO₃, 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat und 500 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro Liter. Nach ausreichender Färbung wurden die Gele 2 x kurz mit Wasser gespült und dann 10 min in Stop-Lösung (50 mM EDTA) geschüttelt.

7.6. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

7.6.1. Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-„Fingerprint“-Analyse (Schaffer *et al.*, 2001). Dazu wurden Banden aus eindimensionalen SDS-Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einer Pinzette in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis & Langen, 1997). Die Gelstücke wurden durch mehrmaliges Waschen mit 750 µl 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat entfärbt und anschließend für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurden die Gelstücke 30 min in 5 µl 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 mit Trypsin (10 ng/µl Endkonzentration, Promega) rehydratisiert und nach Zugabe von 6 µl 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 über Nacht bei RT inkubiert. Die Peptide wurden durch Zugabe von 12 µl H₂O, 15 min Inkubation bei RT, Zugabe von 10 µl 30 % (v/v) Acetonitril (ACN) mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) und weiterer 10-minütiger Inkubation aus den Gelstücken eluiert. Die eluierten Proteine wurden entweder direkt für die Massenspektrometrie verwendet oder für eine spätere Messung bei -20 °C gelagert.

7.6.2. Aufreinigung von Peptiden für MALDI-TOF

Wenn die Anzahl der zugeordneten Peptide für eine sichere Identifizierung nicht ausreichte, wurden die Peptide durch ZipTip-Behandlung (Millipore, Schwalbach) aufkonzentriert und gereinigt. Das ZipTip wurde zweimal mit 50 % (v/v) ACN befeuchtet und dann zweimal mit Äquilibriumspuffer (0,1 % (v/v) TFA) gespült. Die Peptide wurden durch zehnmaliges Aufziehen (10 µl) an die ZipTip-Matrix gebunden. Vor der Elution der Peptide in 5 µl 50 % (v/v) ACN und 0,1 % (v/v) TFA wurde fünfmal mit Äquilibriumspuffer gespült. Ein Aliquot der aufgereinigten Peptidlösung wurde erneut im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert.

7.6.3. Erstellen von Peptidmassen-Fingerprints

Für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden 0,5 µl der Peptidlösung zusammen mit 0,5 µl einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxy-*trans*-zimtsäure-Lösung in 50 % (v/v) ACN, 0,25 % (v/v) TFA auf eine Probenplatte gegeben. Eine externe Kalibrierung erfolgte mit den Calibration Mixtures 1 und 2 des Sequazyme Peptide

Mass Standard Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) analysiert. 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) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mit den theoretisch erwarteten Peptidmassen aus einer lokalen Datenbank mit 3746 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der GPMAW-Software 4.0 (Lighthouse Data) verglichen. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den für ein bestimmtes Protein vorhergesagten Peptidmassen übereinstimmten und die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen.

7.7. Größenausschlusschromatographie

Die native Größe von AcnR-C und AcnR-N wurden durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Hierfür wurde aufgereinigtes Protein mittels einer HiLoad 26/60 Superdex 200 „prep grade“-Säule (Amersham Biosciences), welche an ein Äkta Explorer-System (Amersham Biosciences) angeschlossen war, nach Größe aufgetrennt. Die Säule wurde zuvor mit Puffer (20 mM HEPES, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT) äquilibriert. Für die Bestimmung wurden 0,5 - 1 mg aufgereinigtes Protein auf die Säule aufgegeben und bei 4 °C mit einer Flussrate von 2 ml/min von der Säule eluiert. Die Säule wurde zuvor mit einem Protein Molekulargewichtsmarker (MWGF-200, Sigma Chemie, Deisenhofen) kalibriert. Dafür wurden 20 mg Albumin; 10 mg der Alkohol-DH; 8 mg Amylase; 6 mg der Carboanhydrase und 4 mg Cytochrom *c* in je 2 ml HEPES-Puffer gelöst und einzeln chromatographisch aufgetrennt.

7.8. Bestimmung der Aconitase-Aktivität

Für die Bestimmung der Aconitase-Enzymaktivität wurden die Zellen aus ca. 25 ml der CgXII-Hauptkultur (OD_{600} von 5 - 7) in einem Falcon-Gefäß mit ~25 g Eis (vorgekühlt auf -20 °C) durch Zentrifugation (4,000 x *g* für 5 min) geerntet, in 500 µl Puffer resuspendiert und anschließend mechanisch mit dem Amalgamator aufgeschlossen (vgl. 7.1). Der Rohextrakt (2 - 20 mg/ml) wurde auf Eis gelagert und umgehend für den Enzymtest eingesetzt.

Die Aconitase-Aktivität wurde durch die Umsetzung von D,L-Isocitrat zu *cis*-Aconitat bei Raumtemperatur bestimmt (Henson & Cleland, 1967). Ein Reaktionsansatz enthielt 950 - 995 μl 90 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 20 mM D,L-Na₃-Isocitrat. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 5 - 50 μl Rohextrakt. Die Bildung an *cis*-Aconitat wurde durch Absorptionszunahme bei 240 nm mit dem Jasco V560 Spektrophotometer gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde ein Extinktionskoeffizient für *cis*-Aconitat von $\epsilon_{240} = 3,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ benutzt. Eine Aktivitätseinheit (Unit) entspricht dabei der Umsetzung von 1 μmol Isocitrat zu *cis*-Aconitat pro Minute. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Proteinkonzentration des Rohextrakts bestimmt (vgl. 7.4).

7.9. Bestimmung der Eisenkonzentration

Die Bestimmung der Eisenkonzentration in CgXII-Minimalmedium erfolgte mit Bathophenanthrolin und beruht auf der Komplexbildung mit Fe^{2+} . Der dabei entstehende Komplex ist farbig (rötlich) und kann im Photometer bei 546 nm ($\epsilon_{535} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) erfasst werden. In einem Pyrex-Röhrchen mit Dichtung und Schraubverschluss wurden 2,5 ml Probe mit 5 μl Thioglykolsäure (zur Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+}), 0,2 ml Eisessig und 0,2 ml kaltgesättigter Na-Acetat-Lösung (Puffersystem bei pH 4,8 - 5) versetzt und anschließend kurz geschüttelt. Abschließend wurde 1 ml einer Bathophenanthrolin-Lösung (83 mg in 100 ml Isoamylalkohol) zugegeben und 30 s stark gevortext. Zur besseren Phasentrennung wurden die Röhrchen 2 min bei 4000 x *g* zentrifugiert und die obere Phase mit einer Pasteurpipette in eine 1 ml fassende Glasküvette überführt und die Extinktion bei 546 nm gemessen. Mit einer Eichlösung (10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) wurde eine Standardreihe aufgenommen und mit Wasser der Nullwert bestimmt. Von 0 - 18 μM FeSO_4 waren die Messungen im linearen Bereich. Darüber hinaus wurden keine Messungen durchgeführt.

7.10. Enzymatische Glukosebestimmung

Für die Bestimmung von Restglukose in Kultivierungsüberständen wurde D-Glukose in einem gekoppelten enzymatischen Test durch Hexokinase mit ATP zu Glukose-6-phosphat (G-6-P) und dieses durch die G-6-P-Dehydrogenase von *Leuconostoc mesenteroides* (Roche Diagnostics, Mannheim) mit NAD^+ zu

6-Phospho-D-glucono- δ -lacton umgesetzt. (Bergmeyer *et al.*, 1974). Die gebildete Menge an NADH wurde photometrisch bei 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ThermoMax microplate reader, MWG, Ebersberg) gemessen und war der umgesetzten Glukosemenge direkt proportional. Das Protokoll wurde für einen 300- μl -Mikrotiterplattenansatz angepasst. Es wurden dabei folgende Lösungen verwendet: 50 mM Tris-Maleat-Puffer (TMP, 12,1 g/l Tris, 11,6 g/l Maleinsäure, der pH-Wert wurde mit konzentrierter Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt), 100 mM MgCl_2 -Lösung in TMP, NAD^+ /ATP-Mix (1,2 mM NAD^+ , 1,2 mM ATP, 4,2 mM MgCl_2 in TMP). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Eichgerade aus jeweils acht Glukosestandards (0,1 - 2,5 mM), die für jede Mikrotiterplatten-Messung neu erstellt wurde.

7.11. Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC

Zur Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen wurde der Kulturüberstand mittels Zentrifugation (5 min, 16000 x g) von den Bakterien abgetrennt. Der Überstand wurde entsprechend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ 1:10 bis 1:500 verdünnt und zur HPLC-Analyse eingesetzt. Die Konzentrationen der Aminosäuren in den Verdünnungen sollten dabei 5 mM nicht überschreiten, da die Ergebnisse sonst außerhalb des linearen Bereichs der Eichungen lagen. Die Aminosäurebestimmung erfolgte durch automatische Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd (*o*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz, Pierce, Rockford, USA) (Lindroth & Mopper, 1979) und reversed-phase-HPLC (HP1100 Serie, Hewlett-Packard, Waldbronn). Die entstehenden thiosubstituierten Isoindole wurden über Vorsäule (40 x 4 mm, Hypersil ODS 5 μm) und Hauptsäule (4 x 120 mm, Hypersil ODS 5 μm ; beide von Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) in einem zunehmend unpolaren Gradienten aus Methanol (B) und Natriumacetat (0,1 M, pH 7,2; mit 0,03 % (v/v) Natriumazid) bei einer Flussrate von 0,55 ml/min aufgetrennt (1. min ist B bei 25 %, 3. min bei 45 %, 5. min bei 53 %, 20. min B bei 53 %, 21. min bei 75 %, 22. min bei 80 %, 23. min bei 80 %, 24. min bei 25 %). Die Fluoreszenzdetektion erfolgte durch Anregung bei 230 nm und Messung der Emission bei 450 nm. Zur Quantifizierung wurde L-Asparagin als interner Standard und ein Aminosäuregemisch als externer Standard verwendet. Die Ermittlung der Peakflächen erfolgte mit der Software HP-Chem-Station (Hewlett-Packard).

7.12. Gelretardation

Als Nachweis der Bindung von AcnR an die Promoterregion des *acn*-Gens und zur Identifizierung eines möglichen Effektors von AcnR wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Aufgrund der Bindung des Proteins an die DNA ändert sich deren „Laufverhalten“ in der Gelelektrophorese aufgrund der veränderten Masse und Ladung. Hierfür wurde frisch aufgereinigtes AcnR-C (vgl. 7.2.1) mit oder ohne potentiellen Effektoren für 20 min bei RT in 2 µl Bindepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,05 % (v/v) Triton X-100, 500 mM NaCl) und 1 µl Salzlösung (100 mM MgCl₂, 50 mM CaCl₂) inkubiert (Gesamtvolumen 20 µl - Volumen der DNA). Anschließend wurde dem Ansatz noch eine entsprechende Menge DNA (mind. 50 ng) zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 6.3.1) bei 4 °C analysiert. Hierbei wurde für 4 - 5 h eine Spannung von 75 V angelegt. Das ideale Stoffmengenverhältnis von Protein zu DNA wurde dabei in Ansätzen ohne Effektor bestimmt. Dabei zeigte sich bereits ab einem 4- bis 6-fachen molaren Überschuss von AcnR zu DNA eine deutliche Retardation. Im Normalfall wurde daher ein 10-facher Überschuss an AcnR (200 - 500 nM) zu DNA (20 - 50 nM) gewählt.

8. DNA-Chip-Technologie

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chips basierten auf 3542 PCR-Produkten von *C. glutamicum*-„open reading frames“ (Lange *et al.*, 2003; Sindelar, 2003; Wendisch, 2003). Bei allen Experimenten wurden jeweils zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden gleichzeitig mit einem DNA-Chip hybridisiert (Khodursky *et al.*, 2003; Rhodius *et al.*, 2002; Shalon *et al.*, 1996; Wendisch *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2000). Die DNA-Chips wurden eingesetzt, um für alle Gene des *C. glutamicum*-Genoms das mRNA-Verhältnis in zwei zu vergleichenden Proben zu bestimmen (Transkriptom-Vergleich) und damit Änderungen der Genexpression zu erkennen. Die verwendete DNA-Chip-Technologie und das Robotersystem zur Herstellung der DNA-Chips beruhen auf dem an der Stanford-Universität entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996). Detaillierte Protokolle sind im Internet (Brown, The MGuide. <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) verfügbar.

8.1. Herstellung von *C. glutamicum* DNA-Chips

Zur Herstellung von DNA-Chips wurden PCR-Fragmente der *C. glutamicum*-Gene auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger aufgebracht. Die *C. glutamicum*-Gene wurden in 96-well Mikrotiterplatten (PE Applied Biosystems, Kalifornien, USA) mittels PCR (*Taq*-Polymerase, Qiagen, Hilden; GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) mit genspezifischen Primerpaaren (GeneScan, Freiburg) und genomischer DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 als Template amplifiziert. Größe (125 - 574 bp) und Menge der PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Isopropanol gefällt, in 3 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) resuspendiert und in 384-well Mikrotiterplatten (PE Applied Biosystems) transferiert (Polen, 2002; Wendisch *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2000). Die Glasobjektträger (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) wurden in einem Gemisch aus 60 % (v/v) Ethanol und 10 % (w/v) Natriumhydroxid gereinigt, mit Poly-L-Lysin (17 % (v/v); Sigma-Aldrich) beschichtet, mit Wasser gewaschen und abschließend bei 48 °C im Trockenschrank getrocknet (Polen, 2002; Zimmer *et al.*, 2000). Die PCR-Produkte (~5 nl mit 1,3 - 6,5 ng je Spot) wurden mittels eines computergesteuerten Robotersystems (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) an definierten Positionen auf einer Fläche von 2 x 2 cm auf die beschichteten Objektträger aufgebracht (Polen *et al.*, 2003). Die DNA-Chips wurden im Exsikkator gelagert, um Alterungsprozesse zu verlangsamen.

Zur Normierung und als Positivkontrolle wurde genomische *C. glutamicum*-DNA (1,3 - 6,5 ng je Spot) an bis zu 196 Positionen aufgebracht, als Negativkontrollen dienten λ -DNA, genomische *E. coli*-DNA, das *E. coli aceK*-Gen und sechs verschiedene Plasmide (Sindelar, 2003).

8.2. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Zur Absättigung freier ϵ -Aminogruppen von Poly-L-Lysin sowie zur Immobilisierung und Denaturierung der DNA wurden die DNA-Chips vor der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden chemisch und thermisch behandelt. Zunächst wurde die aufgebrachte DNA in einer Feuchtigkeitskammer über einer 1 x SSC-Lösung rehydratisiert und anschließend bei 100 - 130 °C auf einer Heizplatte 2 - 3 s blitzgetrocknet, um gleichmäßigere und größere Hybridisierungssignale zu erzielen.

Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA; 650 μJ) kovalent mit der Poly-L-Lysinbeschichtung vernetzt (Polen, 2002; Shalon *et al.*, 1996). Freie ϵ -Aminogruppen von Poly-L-Lysinmolekülen wurden durch Derivatisierung mit 180 mM Bernsteinsäureanhydrid blockiert, um eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonde zu verhindern (Polen, 2002; Shalon *et al.*, 1996) <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>. Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurden die DNA-Chips für 1,5 min in 95 °C heißem Wasser inkubiert und die Einzelstränge anschließend durch Inkubation in kaltem Ethanol fixiert (Polen *et al.*, 2003; Shalon *et al.*, 1996). Nach Trocknung durch Zentrifugation (5 min, 50 x *g* Sigma 4K15-Zentrifuge und (Ausschwing-)Grundrotor für 4 Becher bzw. Becher für Mikrotiterplatten) wurden die DNA-Chips bis zur Hybridisierung im Exsikkator gelagert.

8.3. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Zum Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen (20 - 25 μg) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) mit 500 ng Zufalls-Hexamerprimern (Invitrogen), wobei 3 nmol der fluoreszenzmarkierten dUTP-Analoga FluoroLink Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{EX max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 570 nm, grünfluoreszierend) oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{EX max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 670 nm, rotfluoreszierend; Amersham Pharmacia, Freiburg) zugesetzt wurden (Khodursky *et al.*, 2003; Polen, 2002; Wendisch *et al.*, 2001). Anschließend wurde die RNA in 25 mM NaOH (aufgrund der 2'-OH der Ribose; DNA hat 2'-H) hydrolysiert (10 min, 70 °C) und mit 25 mM HCl neutralisiert. Die 50 μl umfassenden Ansätze wurden mit 450 μl RNase-freiem H_2O verdünnt und mittels Microcon YM-30 Säulen (Ausschlussgröße von 50 Nucleotiden dDNA; Millipore, Schwalbach) unter Abtrennung nicht eingebauter Nucleotide durch Zentrifugation bei 10000 x *g* für 7 - 15 min eingeeengt (Khodursky *et al.*, 2003; Polen *et al.*, 2003) (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>). Die Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten Proben wurden vereinigt und in einem zweiten Reinigungsschritt mit den Microcon-Säulen auf ca. 14,5 μl eingeeengt und direkt anschließend zur DNA-Chip-Hybridisierung eingesetzt.

8.4. DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die unter 8.3 vereinigten Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten Proben mit einem DNA-Chip hybridisiert. Zuvor wurden noch 1,2 µg poly(A) oder poly(dI-dC) (Sigma, Taufkirchen) als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz, 3 x SSC mit 30 mM HEPES (pH 7,0) zur Sicherung stringenter Hybridisierungsbedingungen und 0,3 % (w/v) SDS zur Verringerung der Oberflächenspannung zugefügt. Darauf wurde der Ansatz für 2 min bei 100 °C denaturiert und nach dem Abkühlen bei RT (5 - 10 min) zur Hybridisierung eingesetzt (Zimmer *et al.*, 2000). Die Sonde (ca. 16 µl) wurde zwischen ein Spezialdeckgläschen (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA) und den Objektträger mit der immobilisierten DNA pipettiert und der DNA-Chip in einer Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., USA) für 5 - 16 h bei 65 °C inkubiert (Polen, 2002; Zimmer *et al.*, 2000). Nach der Hybridisierung erfolgte ein stringentes Waschen in 1 x SSC mit 0,03 % SDS und anschließend in 0,05 x SSC zum Entfernen unspezifisch gebundener fluoreszenzmarkierter DNA (Polen, 2002; Zimmer *et al.*, 2000). Der DNA-Chip wurde durch Zentrifugation getrocknet (5 min, 50 x g), bevor die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt wurde.

8.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots auf dem DNA-Chip gemessen, welche direkt mit der Menge gebundener, fluoreszenzmarkierter Sonde korreliert. Nach der Hybridisierung und dem stringenten Waschen des DNA-Chips wurden hierzu orts aufgelöste Fluoreszenzintensitäten mit einem GenePix 4000 Laserscanner (Axon Inc., Union City, Kalifornien, USA) bestimmt und als 16-bit-TIFF-Dateien elektronisch gespeichert (Software GenePix Pro 3.0, Axon Inc.). Die Anregung von Cy3-dUTP erfolgte mit monochromatischem Licht von 532 nm (Messung der Emission bei 570 nm) und die von Cy5-dUTP bei 635 nm (Emission bei 670 nm). Die Lichtemission wurde mit lichtempfindlichen Kathoden registriert (Polen, 2002). Dabei wurde das Bild in Bildpunkte unterteilt, die jeweils eine Fläche von 10 x 10 µm auf dem DNA-Chip hatten. Die Fluorogramme wurden quantitativ mit der GenePix-Software analysiert, wobei der Quotient der Mediane als Maß für das Verhältnis der roten zur grünen Fluoreszenz verwendet

wurde. Die Quantifizierung der Fluoreszenz ist in Abbildung 2 dargestellt. Hierbei wurde das Verhältnis der Cy5- (rot)/Cy3- (grün) Nettofluoreszenzintensität für jedes detektierbare Hybridisierungssignal berechnet.

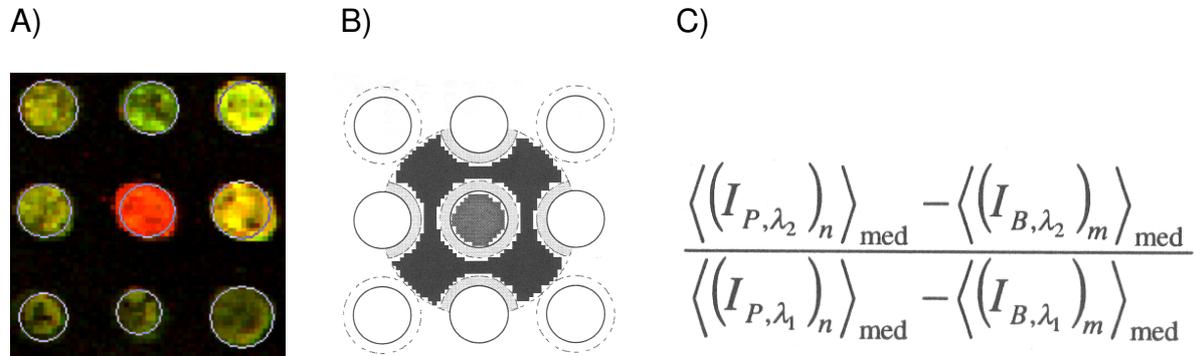


Abbildung 2: Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen auf einem DNA-Chip mit der Software GenePix Pro 3.0

- A) Ausschnitt aus einem Fluorogramm mit identifizierten Hybridisierungssignalen (Kreise)
- B) Quantifizierung der Hybridisierungssignal-Fluoreszenz (schematisch): Bildpunkte des inneren Kreises bilden das Hybridisierungssignal; Bildpunkte des mittleren Kreises gehören zum unberücksichtigten Ausschlussbereich und Bildpunkte des äußeren, dunklen Bereichs bilden den Hintergrund.
- C) Zur Berechnung des Quotienten der Mediane eines Hybridisierungssignals wird vor der Bildung des Cy5/Cy3-Fluoreszenzverhältnisses die Hintergrundfluoreszenz von der Signalfuoreszenz bei der entsprechenden Wellenlänge subtrahiert.
- (A: (Polen, 2002); B,C: aus dem Handbuch zur GenePix 3.0 Software)

8.6. Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten

Um Unterschiede bei Einbau und Stabilität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe ausgleichen zu können, wurden die erhaltenen Fluoreszenzverhältnisse durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor so normiert, dass der durchschnittliche Quotient der Mediane der genomischen DNA von *C. glutamicum* den Wert 1 ergab (Eisen *et al.*, 1998; Khodursky *et al.*, 2003; Wendisch *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2000). Um nur zuverlässige Hybridisierungssignale für die Normierung zu verwenden, wurden nur Spots berücksichtigt, die optisch deutlich zu erkennen waren und bei denen die Fluoreszenzintensität des inneren Kreises in Abb. 1B mindestens dreifach über der Fluoreszenzintensität des Hintergrunds lag, und zwar für mindestens einen der beiden Farbstoffe (Signal/Rausch-Verhältnis ≥ 3). Zu schwache Signale wurden als nicht quantifizierbar angesehen.

Um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können, wurden die Experimente mehrfach wiederholt und für jedes Gen der p -Wert mit einem t -Test nach Student (einseitiger Test, heteroskedastisch; TTEST-Tabellenfunktion, Excel 2003, Microsoft, Redmond, USA) bestimmt. Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der als mit 1 angenommenen normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky et al. 2000). Die Verhältnisse wurden dabei in logarithmierter Form verwendet. Bei einem p -Wert $\leq 0,05$ (entspricht einer 95 %igen Sicherheit der Ergebnisse) wurde die Veränderung des mRNA- bzw. DNA-Spiegels als signifikant betrachtet (Arfin *et al.*, 2000; Lehnen *et al.*, 2002; Polen, 2002; Polen *et al.*, 2003). Bei der Analyse der DNA-Chips wurde nach Genen gesucht, deren mRNA-Verhältnis mindestens zweifach verändert war und bei denen der p -Wert $\leq 0,05$ war. Nur solche Gene sind in den Transkriptom-Vergleichen, die in dieser Arbeit beschrieben werden, berücksichtigt.

8.7. Archivierung von DNA-Chip-Daten

Zur Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten wurde die für das Computer-Betriebssystem Linux frei erhältliche relationale Datenbank mySQL verwendet (MySQL AB Company, Uppsala, Schweden, <http://www.mysql.com>). Die DNA-Chip-Daten, Fluorogramme sowie die relevanten Informationen zur Kultivierung der Zellen, RNA-Isolierung etc. wurden mit Hilfe einer von T. Polen entwickelten Software (Polen, 2002; Polen & Wendisch, 2004) erfasst und auf dem Linux-Zentralrechner des Instituts in einer mySQL-Datenbank hinterlegt, so dass sie über das institutsinterne Netzwerk für weitere Analysen zur Verfügung standen.

8.8. Hierarchische Clusteranalyse

Für Clusteranalysen war es notwendig, aus der Gesamtheit der DNA-Chip-Daten die relevanten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse der Gene herauszufiltern (Eisen *et al.*, 1998). Dazu wurden mit Hilfe einer von T. Polen entwickelten Software (Summarize Expression Data) ausgehend von den in der mySQL-Datenbank des Linux-Zentralrechners elektronisch gespeicherten DNA-Chip-Daten Tabellen mit den normalisierten Cy3-/ Cy5-Fluoreszenzverhältnissen (entspricht dem relativem mRNA-Spiegel) der zu analysierenden Experimente erstellt. Dabei wurden grundsätzlich nur

die Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse von den Genen berücksichtigt, deren Spots bei der Bildauswertung von der Software automatisch erkannt wurden (Flags ≥ 0 , GenePix Pro 4.0), deren PCR-Produkt laut Gelkontrolle einwandfrei war und deren Signalintensitäten (Cy3- oder Cy5-Fluoreszenz) mindestens dreifach über der Hintergrundfluoreszenz lag. Andernfalls wurden die Signale als zu schwach angenommen, um den relativen mRNA-Spiegel zuverlässig bestimmen zu können (nicht auswertbar). Die den relativen mRNA-Spiegeln entsprechenden Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse wurden in hierarchischen Clusteranalysen zur bildlichen Darstellung in roten (Cy5-Fluoreszenz) und grünen (Cy3-Fluoreszenz) Farbwerten angezeigt (average linkage method, (Eisen *et al.*, 1998). Hierbei symbolisiert schwarze Signale unveränderte relative mRNA-Spiegel und graue Signale nach den Kriterien nicht auswertbare mRNA-Spiegel. Für die hierarchische Sortierung der Expressionsdaten und zur bildlichen Darstellung wurde ebenfalls eine von T. Polen entwickelte Software verwendet (Treeview & Cluster, (Polen, 2002; Polen & Wendisch, 2004)), die auf dem Algorithmus der hierarchischen Clusteranalyse-Software von (Eisen *et al.*, 1998) beruht.

IV. ERGEBNISSE

1. Globale Expressionsanalysen zur Identifizierung neuer Zielgene für die Optimierung eines Valin-Produktionsstammes von *C. glutamicum*

Das Ziel der ersten Phase dieser Arbeit im Rahmen des EU-Projekts „Construction of *Corynebacterium glutamicum* strains producing either L-valine or D-pantothenic acid – a rational approach using genome research [VALPAN]“ war es, durch genomumfassende Expressionsanalysen von verschiedenen Valin-produzierenden *C. glutamicum*-Stämmen Gene zu identifizieren, die aufgrund der Valin-Bildung signifikant in ihrer Expression verändert waren. Dabei waren solche Gene von besonderem Interesse, die nicht unmittelbar an der Valin-Biosynthese beteiligt sind und daher neue Ansatzpunkte zu einer weiteren Optimierung der Produktionsstämme liefern können.

1.1. Optimierung der Valin-Bildung durch Variation verschiedener Kulturparameter

Die den Untersuchungen zugrunde liegenden Stämme wurden von der Arbeitsgruppe Dr. L. Eggeling (Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt oder selbst konstruiert (13032 Δ *panBC* Δ *ilvA*/pJC1). Bei dem Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* werden die Valin-Biosynthese-Gene plasmidkodiert überexprimiert. Bei den Stämmen mit den Deletionen Δ *panBC* und Δ *ilvA* ist sowohl die Pantothenat-Biosynthese als auch die Isoleucin-Biosynthese unterbunden. Diese Stämme sind bezüglich Pantothenat und Isoleucin auxotroph. Bisherige Untersuchungen zur Valin-Bildung wurden in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose durchgeführt. Der Stamm *C. glutamicum* 13032 Δ *panBC* Δ *ilvA*/pJC1*ilvBNCD* (VAL1) bildete unter Zugabe von 1,1 mM L-Isoleucin und 1 μ M D-Pantothenat maximal 95 mM Valin (Radmacher *et al.*, 2002).

Durch Veränderung der Supplementkonzentrationen von Isoleucin und Pantothenat (Abbildung 3) oder der eingesetzten Glukose-Konzentration (Tabelle 5) sollte zunächst überprüft werden, welchen Einfluss diese Parameter auf die Valin-Bildung haben. Neben den hier dargestellten Versuchen mit dem Stamm VAL1 wurde auch eine erhöhte Glukosekonzentration bei den Stämmen 13032/pJC1 (Kontrollstamm), 13032/pJC1*ilvBNCD* und 13032 Δ *panBC* Δ *ilvA* untersucht. Dabei wurde jedoch keine

deutliche Steigerung (Zunahme weniger als 10 %) der Valin-Bildung beobachtet. Daher wurden die folgenden Untersuchungen zur Valin-Bildung nur mit dem Stamm VAL1 durchgeführt.

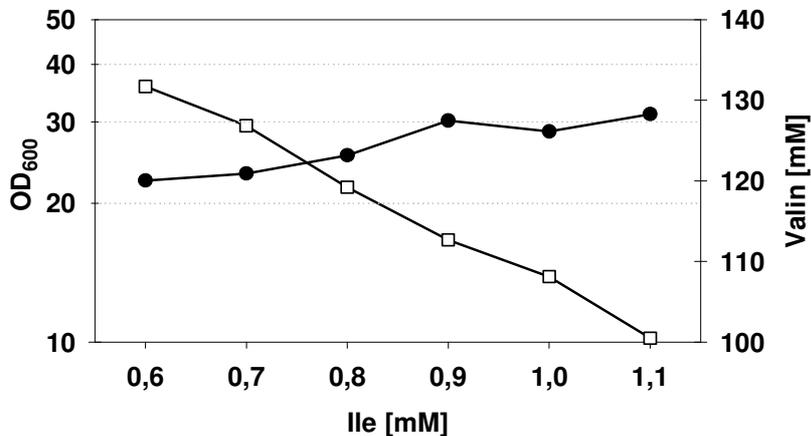


Abbildung 3: Einfluss der L-Isoleucin-Konzentration auf die Bildung von Valin (□; maximal erreichte Konz.) und Biomasse (●; OD₆₀₀ nach 32 h) durch den Stamm VAL1 bei Kultivierung in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose. Die Pantothenat-Konzentration betrug 0,5 μM.

Aus Abbildung 3 geht hervor, dass mit zunehmender Isoleucin-Konzentration eine höhere End-OD₆₀₀ erreicht wird. Auf die Valin-Bildung hat eine erhöhte Isoleucin-Konzentration allerdings einen gegenteiligen Effekt. Je mehr Isoleucin dem Medium zugegeben wurde, desto weniger Valin wurde gebildet.

Höhere Pantothenat-Konzentrationen bei konstanter Isoleucin-Konzentration von 0,9 mM führten ebenfalls dazu, dass mehr Biomasse gebildet wurde. Während bei Pantothenat-Konzentrationen von 0,5 μM ein Maximum der Bildung von Valin (130 mM) beobachtet wurde, führten höhere und niedrigere Konzentrationen von Pantothenat (0,75 μM und 0,3 μM) zu einer geringeren Bildung von Valin (113 mM und 116 mM), so dass ein Optimum im Bereich um die 0,5 μM Pantothenat bei 0,9 mM Isoleucin angenommen werden konnte.

In den anschließenden Untersuchungen wurde die Valin-Bildung durch den Stamm VAL1 bei vier verschiedenen Glukose-Konzentrationen und bei fünf verschiedenen Isoleucin/Panthotenat-Kombinationen bestimmt. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die dabei erhaltenen Ergebnisse. Während eine Erhöhung der Glukose-Konzentration von 222 mM auf 333 mM noch zu einer signifikanten Steigerung der Valin-Bildung führte, war dies bei noch höheren Glukose-Konzentrationen (444 mM bzw. 555 mM) nicht mehr der Fall.

Tabelle 5: Valin-Bildung in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration und den Supplement-Konzentrationen von L-Isoleucin und D-Pantothenat beim Stamm VAL1.

Valin [mM]	0,3 mM Ile 0,5 µM Pan	0,6 mM Ile 0,5 µM Pan	0,6 mM Ile 0,75 µM Pan	0,75 mM Ile 0,5 µM Pan	0,9 mM Ile 0,5 µM Pan
222 mM Glukose	82	115	103	114	108
333 mM Glukose	77	163	156	156	140
444 mM Glukose	75	157	143	140	132
555 mM Glukose	69	120	133	140	123

Des Weiteren wurde bei den beiden höchsten Konzentrationen die Glukose auch nach über 120 h nicht vollständig verbraucht. Eine anschließende pH-Wert Kontrolle der Kulturüberstände zeigte, dass ab Konzentrationen von 333 mM Glukose der pH-Wert auf bis zu 4,5 gesunken war. Eine HPLC-Analyse der Überstände brachte zwar vereinzelte Hinweise auf das Vorhandensein von organischen Säuren (α -Ketoisovalerat bis zu 20 mM und 2-Ketoglutarat bis zu 10 mM) in den Kulturen mit 444 und 555 mM Glukose, jedoch konnten diese Säuren nicht alleine für einen derartig drastischen pH-Abfall verantwortlich sein, zumal das Medium mit MOPS gepuffert war. Das Vorhandensein weiterer Säuren kann nicht ausgeschlossen werden, da bei der HPLC-Analyse nur eine begrenzte Anzahl an Referenzsäuren zur Verfügung stand. Aufgrund des starken Absinkens des pH-Wertes bei höheren Glukose-Konzentrationen wurde die Konzentration von MOPS-Puffer im Medium von 200 mM auf 400 mM erhöht. Dies führte jedoch zu nur geringfügigen Veränderungen in der Valin-Bildung. Auf eine Bestimmung der pH-Werte und der organischen Säuren wurde aufgrund dessen verzichtet.

Zusammenfassend konnte durch Erhöhung der Glukose-Konzentration und Optimierung der Supplement-Konzentrationen (Pantothenat und Isoleucin) eine Steigerung der Valin-Bildung um 65 % von 95 mM (Radmacher *et al.*, 2002) auf 163 mM Valin erreicht werden.

Repräsentativ ist in Abbildung 4 ein Fermentationsverlauf des Stammes VAL1 in CgXII-Minimalmedium mit 0,6 mM L-Isoleucin, 0,5 µM D-Pantothenat und 333 mM Glukose, wie er für nahezu alle Experimente aufgezeichnet wurde, dargestellt. Hieraus geht hervor, dass eine signifikante Valin-Konzentration im Kulturüberstand erst nach ca. 24 h auftritt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen schon im Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase bzw. waren schon in der

stationären Phase. Ebenfalls nach 24 h begann der Abfall des pH-Wertes. Die Glukose war vermutlich nach ca. 80 h vollständig aufgebraucht. Aus 333 mM Glukose wurden 163 mM Valin gebildet, bzw. 0,32 g Valin pro g Glukose.

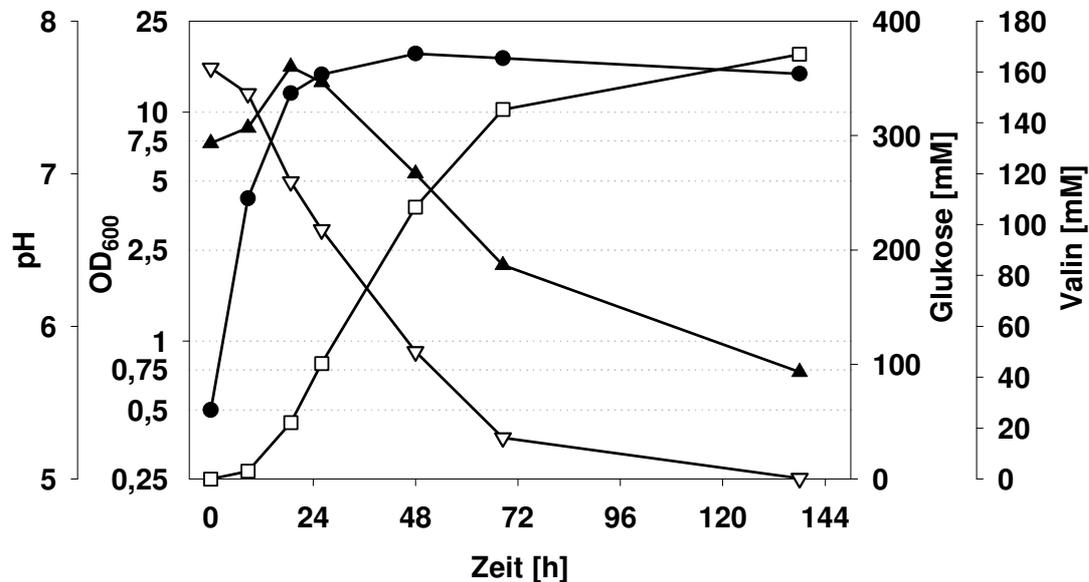


Abbildung 4: Fermentationsverlauf von Stamm VAL1 mit 0,6 mM L-Isoleucin, 0,5 μ M D-Pantothenat und 333 mM Glukose. Dargestellt sind die Valin-Bildung (\square), OD₆₀₀ (\bullet), pH-Wert (\blacktriangle) und die Glukose-Konzentration (∇). Die Kultivierung erfolgte in 60 ml CgXII-Minimalmedium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen bei 30 °C und 120 Upm.

Die Kultivierungen für die vergleichenden Transkriptomanalysen mit dem Stamm VAL1 wurden unter den in Abbildung 4 genannten Bedingungen jedoch mit 222 mM anstatt 333 mM Glukose durchgeführt, da die Unterschiede zwischen beiden Konzentrationen erst zum Ende der Kultivierung (nach über 24 h) in Erscheinung treten.

1.2. Vergleichende Transkriptomanalysen von verschiedenen Valinproduzierenden Stämmen

Der Einfluss von L-Valin auf die globale Genexpression vier verschiedener *C. glutamicum*-Stämme wurde mittels Transkriptomanalyse untersucht, um potentielle neue Zielgene zur Verbesserung der Valin-Bildung zu identifizieren. Zum einen wurde der Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* mit dem Stamm 13032/pJC1 verglichen (schwacher Valin-Produzent [\sim 50 mM Valin] vs. Nicht-Valin-Produzent [\leq 1,0 mM Valin]) und zum anderen der Stamm 13032 Δ *panBC* Δ *ilvA*/pJC1*ilvBNCD*

(= VAL1) mit 13032 Δ panBC Δ ilvA/pJC1 („guter“ Valin-Produzent [>100 mM Valin] vs. „schlechter“ Valin-Produzent [~ 30 mM Valin]). Hierfür wurden parallele Kultivierungen aller vier Stämme unter den in Abbildung 5 dargestellten Bedingungen durchgeführt und die Zellen zur RNA-Extraktion zwischen OD₆₀₀ 4 - 6 in der exponentiellen Phase geerntet.

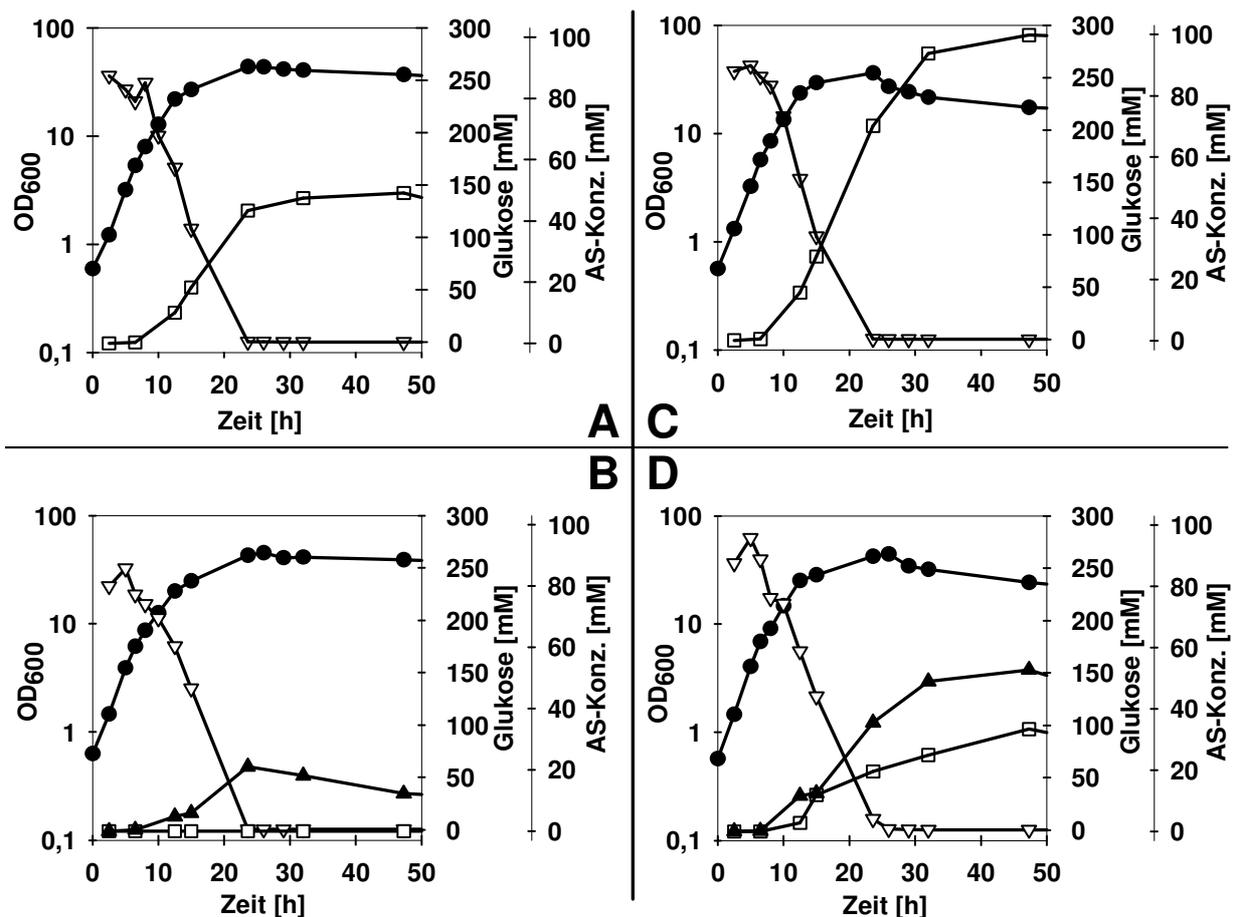


Abbildung 5: Fermentationsverlauf der vier *C. glutamicum*-Stämme 13032/pJC1ilvBNCD (A), 13032/pJC1 (B), VAL1 (C) und Δ panBC Δ ilvA/pJC1 (D) in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose. Bei Bedarf wurden die Stämme mit 0,6 mM L-Isoleucin und 0,5 μ M D-Pantothenat supplementiert. Dargestellt sind die Valin-Bildung (□), OD₆₀₀ (●), Alanin-Bildung (▲) und die Glukose-Konzentration (▽).

Nach Herstellung der markierten cDNA-Sonden durch reverse Transkriptase wurden relative mRNA-Spiegel (= mRNA-Konzentration in Stamm 1/mRNA-Konzentration in Stamm 2) durch Hybridisierung auf DNA-Chips bestimmt.

Insgesamt wurden drei unabhängige Kultivierungen der vier Stämme durchgeführt, die RNA isoliert und die RNA für 12 DNA-Chip-Experimente eingesetzt. In vier Experimenten wurden das Verhältnis der mRNA-Konzentrationen von

13032/pJC1*ilvBNCD* und 13032/pJC1 miteinander verglichen. In den anderen acht Experimenten wurden die mRNA-Level von 13032Δ*panBCΔilvA*/pJC1*ilvBNCD* und 13032Δ*panBCΔilvA*/pJC1 miteinander verglichen. In Tabelle 6 sind die Gene zusammengestellt, die in mindestens einem der beiden Vergleiche ein mRNA-Verhältnis von ≤0,5 oder ≥2,0, ein Signal/Rausch-Verhältnis ≥3 sowie einen *p*-value ≤0,05 hatten. Es wurden nur solche Gene aufgenommen, die in mehr als der Hälfte der Experimente zu einem Vergleichspaar auswertbar waren. Die in Klammern angegebenen Werte erfüllen nicht alle oben genannten Kriterien, wurden aber zum Vergleich trotzdem mit in die Tabelle aufgenommen.

Tabelle 6: Gene mit signifikant erhöhten (≥2) oder erniedrigten (≤0,5) RNA-Verhältnissen¹ beim Vergleich der unten angegebenen Stamm-Paare in der exponentiellen Wachstumsphase (OD600 = 4 - 6). Die Zellen wurden unter den in Abbildung 4 dargestellten Bedingungen kultiviert. Die Valin-Konz. zum Zeitpunkt der RNA-Isolation betrug im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* ca. 0,5 mM, im Stamm VAL1 ca. 1 mM und in den beiden Vergleichsstämmen ≤0,2 mM. Es wurden nur solche Gene berücksichtigt, für die sicher messbare (Signal / Rausch-Verhältnis >=3) und signifikante (*p* <0,05 = * and *p* <0,005 = **) Werte bestimmt wurden. σ = Standardabweichung.

4 DNA-Chips mit

C. glutamicum 13032/pJC1*ilvBNCD*
C. glutamicum 13032/pJC1

8 DNA Chips mit

C. g. 13032Δ*panBCΔilvA*/pJC1*ilvBNCD*
C. g. 13032Δ*panBCΔilvA*/pJC1

NCgl ²	ORF ³	Gene - annotierte Funktionen		σ	<i>p</i>		σ	<i>p</i>
1219	3566	<i>ilvD</i> - Dihydroxysäure Dehydratase	(1,9)	0,7	*	2,7	0,8	**
1222	2793	<i>ilvB</i> - Acetohydroxysäure-Synthase	5,6	1,2	**	5,2	2,9	**
1223	2792	<i>ilvN</i> - Acetohydroxysäure-Synthase	5,9	1,7	**	9,2	5,6	**
1224	2790	<i>ilvC</i> - Isomero-reduktase	2,2	0,4	**	3,1	1,5	**
0137	533	putative Permease	(1,3)	0,2	*	2,1	0,5	**
0030	3534	<i>rbsC</i> - putatives Ribose-Transportprotein	0,5	0,2	*	(0,5)	---	
1272	2727	<i>recG</i> - ATP-abhängige DNA-Helikase	0,5	0,1	*	(0,7)	---	
1816	1963	putative Integrase	2,6	0,5	**	(1,0)	0,1	
2439	3472	<i>ftn</i> - Ferritin	0,5	0,2	*	(1,1)	0,3	

¹ hierbei handelt es sich um die Mittelwerte des Quotienten der Mediane

² NCBI-Annotation (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=232>)

³ Biomax-Annotation (nicht öffentlich zugänglich)

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass nur sehr wenige Gene ein erhöhtes bzw. erniedrigtes mRNA-Verhältnis aufwiesen. Die Gene der Valin-Biosynthese (*ilvBNCD*), die in beiden Vergleichen ein erhöhtes Verhältnis zeigen, dienen als Positivkontrolle, da die entsprechenden Gene in jeweils einem der Stämme plasmidkodiert überexprimiert wurden. Im Wildtyp-Hintergrund zeigte lediglich ein

Gen (*NCgl1816*) ein erhöhtes und drei Gene (*recG*, *ftn*, *rbsC*) ein erniedrigtes mRNA-Verhältnis. Ein offensichtlicher Zusammenhang dieser vier ORFs mit der Valin-Bildung war jedoch nicht erkennbar. Beim Vergleich im $\Delta panBC\Delta ilvA$ -Hintergrund zeigte neben den *ilvBNCD*-Genen lediglich das Gen *NCgl0137* ein zweifach erhöhtes mRNA-Verhältnis. Ein Sequenzvergleich mit dem *NCgl0137*-Protein ergab Ähnlichkeiten zu einer putativen Permease, die in vielen Bakterien hoch konserviert ist. Jedoch gibt es zu keinem der homologen Proteine Untersuchungen zu deren Funktion. Eine Analyse des *NCgl0137*-Proteins hinsichtlich seiner Hydrophobizität mit verschiedenen Programmen (z.B. <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>) ergab, dass es vermutlich sieben Transmembranhelices enthält. Da *NCgl0137* nur beim Vergleich des Stammpaares mit der *ilvA*- und der *panBC*-Deletion auftrat, wäre es möglich, dass es einen Carrier kodiert, der am Transport von Isoleucin oder Pantothenat beteiligt ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Einfluss einer Deletion des *NCgl0137*-Gens im Wildtyp, im Stamm $\Delta panBC\Delta ilvA$ und im Stamm VAL1 untersucht (siehe Kapitel 1.3).

Aufgrund der geringen Anzahl an Genen mit veränderter Expression, die beim Vergleich der beiden Stammpaare in der exponentiellen Wachstumsphase auftraten, wurden noch weitere Transkriptom-Vergleiche während des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre Phase durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt bereits signifikante Valin-Konzentrationen im Überstand der Valin-Produktionsstämme vorhanden waren (13032/pJC1*ilvBNCD* ~18 mM, 13032/pJC1 $\leq 1,0$ mM, VAL1 28 mM und $\Delta panBC\Delta ilvA$ /pJC1 12 mM). Hierfür wurden die Zellen zur RNA-Extraktion nach ca. 15 h geerntet und DNA-Chip-Experimente durchgeführt. Aufgrund des stark unterschiedlichen Wachstums der Stämme VAL1 und 13032 $\Delta panBC\Delta ilvA$ /pJC1 wurden hier nur die beiden Stämme 13032/pJC1*ilvBNCD* und 13032/pJC1 miteinander verglichen. Der Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* bildet maximal ca. 50 mM Valin, während der Kontroll-Stamm $\leq 1,0$ mM Valin bildet. Beim Vergleich der vier durchgeführten Experimente zeigte eine Vielzahl von Genen einen veränderten mRNA-Level. Neben den *ilvBNCD*-Genen (Positivkontrolle) zeigten noch 17 weitere Gene einen 2- bis 12-fach erhöhten mRNA-Level im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD*. Insgesamt 59 Gene hatten einen 2- bis 5-fach reduzierten mRNA-Level im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD*. Darunter befanden sich nahezu alle Gene des Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus). Den am stärksten verminderten

Expressionslevel hatte das Aconitase-Gen (*acn*) mit einem Faktor von 3,3. Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass die Valin-Bildung zu einem reduzierten Fluss durch den TCA-Zyklus führt. Eventuell wird dies durch die Verwendung von Pyruvat für die Valin-Biosynthese anstelle für die oxidative Decarboxylierung verursacht. Eine Übersicht aller veränderten Gene dieses Vergleichs befindet sich im Anhang in Tabelle 14.

1.3. Einfluss von NCgl0137 auf die Valin-Bildung

Zur Untersuchung der Funktion des NCgl0137-Proteins wurde eine *in-frame* Deletion des entsprechenden Gens im Wildtyp und im Stamm $\Delta panBC\Delta ilvA$ mittels pK19*mobsacB* durchgeführt. Für die Konstruktion des Stammes VAL1 Δ NCgl0137 wurde anschließend das Plasmid pJC1*ilvBNCD* wieder eingebracht. Parallel wurde das NCgl0137-Gen einschließlich des eigenen Promotors mit Hilfe des Vektors pEC7 plasmidkodiert überexprimiert. Zur Kontrolle wurde auch der „Leervektor“ pEC7 in die jeweiligen Stämme eingebracht, so dass sechs Stammpaare hinsichtlich der Valin-Bildung miteinander verglichen werden konnten.

Tabelle 7: Valin-Bildung verschiedener *C. glutamicum*-Stämme nach 48 und 72 h. Die Kultivierungen erfolgten in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose. Bei Bedarf wurde das Medium mit 0,6 mM L-Isoleucin und 0,5 µM D-Pantothentat supplementiert.

Stamm	Valin [mM] nach 48 h	Valin [mM] nach 72 h
13032 Wildtyp	0,0	0,0
13032 Δ NCgl0137	0,0	0,0
13032/pEC7	0,0	0,0
13032/pEC7-NCgl0137	0,0	0,0
$\Delta panBC\Delta ilvA$	12,2	13,0
$\Delta panBC\Delta ilvA\Delta$ NCgl0137	11,0	12,0
$\Delta panBC\Delta ilvA$ /pEC7	nicht bestimmt	13,6
$\Delta panBC\Delta ilvA$ /pEC7-NCgl0137	7,6	13,2
VAL1	99,8	99,5
VAL1 Δ NCgl0137	91,0	102,0
VAL1/pEC7	61,6	80,1
VAL1/pEC7-NCgl0137	50,4	82,6

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass weder die Überexpression noch die Deletion von *NCgl0137* in einem der Stämme zu einer signifikanten Veränderung der Valin-Bildung führte.

2. Identifizierung und Charakterisierung von AcnR, einem Repressor der Aconitase in *C. glutamicum*

2.1. Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Aconitase-Aktivität

Frühere Untersuchungen in *C. glutamicum* zeigten, dass der Kohlenstofffluss durch den TCA-Zyklus in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle variierte (Wendisch *et al.*, 2000). Der Fluss durch den TCA-Zyklus bei Wachstum auf Acetat betrug $0,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{Protein}}^{-1}$ und war damit vierfach so hoch wie bei Wachstum auf Glukose. Die spezifischen Aktivitäten der Citrat-Synthase (*gltA*-Genprodukt) und der Isocitrat-Dehydrogenase (*icd*-Genprodukt) in Rohextrakten von *C. glutamicum* waren bei Wachstum auf Acetat und Glukose jedoch annähernd gleich. Sie betrug $0,5 - 0,8 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$ für die Citrat-Synthase (Eikmanns *et al.*, 1994) und $0,9 - 1,1 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$ für die Isocitrat-Dehydrogenase (Eikmanns *et al.*, 1995). Diese liegen über den maximalen *in vivo* gemessenen Flüssen und sollten daher nicht limitierend sein. Basierend auf dem Wissen, dass die Aconitase-Aktivität in anderen Bakterien stark reguliert wird, stellte sich die Frage, ob sich die Aktivität der Aconitase bei Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen verändert.

Für diese Untersuchungen wurde *C. glutamicum* auf CgXII-Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen wie Glukose, Acetat, Citrat und Propionat kultiviert (vgl. 4) und im Anschluss die Aconitase-Aktivität von Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt (vgl. 7.8). In Tabelle 8 sind die entsprechenden Resultate für den Wildtyp zusammengefasst. Während die spezifische Aktivität der Aconitase auf Glukose $0,2 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$ betrug, war sie auf Acetat ($0,8 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$), Citrat ($0,5 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$) und Propionat ($0,5 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$) um das 2,5- bis 4-fache erhöht. Es gibt also eine C-Quellen-abhängige Regulation der Aconitase-Aktivität in *C. glutamicum*. Die Aconitase könnte somit einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im TCA-Zyklus darstellen. Die gesteigerte Aktivität auf Acetat korreliert mit dem gesteigerten Stofffluss durch den TCA-Zyklus unter diesen Bedingungen (Wendisch *et al.*, 2000). Die erhöhte Aconitase-Aktivität bei Wachstum auf Citrat könnte ebenfalls mit einem gesteigerten TCA-Zyklus-Fluss erklärt werden. Dazu gibt

es allerdings noch keine experimentellen Daten. Propionat wird in *C. glutamicum* durch den Methylcitrat-Zyklus verstoffwechselt, bei dem Methylcitrat zu Methylisocitrat umgesetzt wird (Claes *et al.*, 2002). In *E. coli*, das Propionat ebenfalls über den Methylcitrat-Zyklus umsetzt (Textor *et al.*, 1997), wurde gezeigt, dass diese Umsetzung zwei Enzyme erfordert, nämlich die Methylcitrat-Dehydratase (PrpD) und die Aconitase (AcnB), die für die Rehydratisierung von Methyl-Aconitat notwendig ist (Brock *et al.*, 2002). Es ist anzunehmen, dass auch in *C. glutamicum* die Aconitase für diese Reaktion benötigt wird und dies könnte die gesteigerte Aconitase-Aktivität in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Propionat erklären.

2.2. Identifizierung eines Gens (*acnR*) für einen TetR-Typ-Regulator stromabwärts des *acn*-Gens für die Aconitase

Frühere DNA-Chip-Experimente zeigten, dass der mRNA-Level des Aconitase-Gens (*acn*) vierfach erhöht war, wenn *C. glutamicum* auf Acetat anstatt Glukose kultiviert wurde (Gerstmeir *et al.*, 2003). Dies legte die Vermutung nahe, dass das *acn*-Gen auf Transkriptionsebene reguliert wird.

In Bakterien kommt es häufig vor, dass Transkriptionsregulatoren in der unmittelbaren Umgebung ihrer Zielgene im Genom lokalisiert sind. Daher wurde die Region des *acn*-Gens im *C. glutamicum*-Genom näher untersucht. Im Gegensatz zu *E. coli* und anderen Bakterien besitzt *C. glutamicum* nur ein einziges Aconitase-Gen (Kalinowski *et al.*, 2003), das für ein 943 AS großes Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 102,6 kDa kodiert. Das Protein konnte auch bereits im Rahmen einer Proteom-Analyse nachgewiesen werden (Schaffer *et al.*, 2001). Dort zeigte es eine apparente Masse von 110,9 kDa und einen apparenten pI von 4,54. Die Aconitase aus *C. glutamicum* besitzt 53,0 % Sequenzidentität zur Aconitase AcnA von *E. coli* (Prodromou *et al.*, 1991; Prodromou *et al.*, 1992), aber weniger als 20 % zu AcnB von *E. coli* (Gruer & Guest, 1994). Daher kann man die Aconitase von *C. glutamicum* der bakteriellen AcnA-Gruppe (Gruer *et al.*, 1997) von Aconitasen zuordnen, welche hohe Sequenzidentitäten zu den sogenannten „Eisen-Antwort“-Proteinen (IRP = iron responsive proteins) aus Eukaryonten haben.

In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass direkt stromabwärts von *acn* ein Gen liegt, das für einen putativen Transkriptionsregulator mit 188 AS und einer Masse von 21,2 kDa kodiert. Im Folgenden wird dieser putative Transkriptionsregulator AcnR genannt. Die gleiche genomische Anordnung wie in *C. glutamicum* findet sich auch in *C. efficiens*,

C. diphtheriae, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. marinum* und *Rhodococcus* strain IG124. In *M. leprae* ist das *acnR*-Gen wie viele andere Gene durch Frameshifts und Stop-Codons verkleinert (Cole *et al.*, 2001). Bei *Rhodococcus* sp. war nur der 3'-terminale Bereich von *acn* verfügbar.

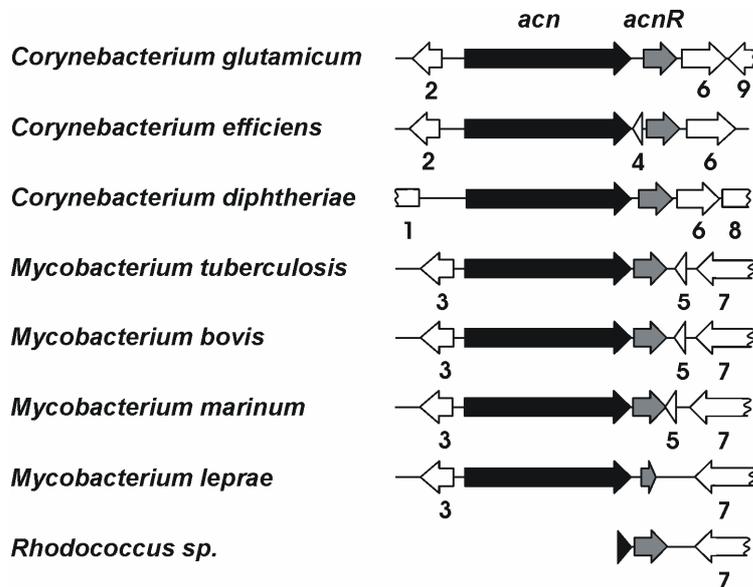


Abbildung 6: Genomische Umgebung des Aconitase-Gens (*acn*) von *C. glutamicum* und anderen Spezies der Unterordnung *Corynebacterineae*, für welche die genomischen Informationen erhältlich waren. Die Daten stammen von NCBI und der Bioinformatik-Software ERGO (Integrated Genomics). Das Aconitase-Gen (*acn*) ist schwarz und der stromabwärts lokalisierte Transkriptionsregulator (*acnR*) grau hervorgehoben. Die anderen Gene wurden durchnummeriert und wie folgt annotiert: (1) Invasin; (2), (3), (4) and (8) hypothetische Proteine; (5) hypothetisches cytosolisches Protein; (6) putative GMP Synthase - Glutamin Amidotransferasedomäne; (7) ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein; (9) putative NAD⁺-abhängige Dehydrogenase.

Ein Aminosäuresequenz-Alignment der AcnR-Homologen (Abbildung 7) zeigte, dass die Primärsequenzen der Proteine hoch konserviert sind. Im N-terminalen Bereich des Proteins an den Positionen 16 bis 62 lag die Identität bei nahezu 75 %. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser N-terminale Bereich des AcnR-Proteins zur TetR-Familie von bakteriellen Regulatorproteinen (PFAM-Familie PF00440) gehört (Bateman *et al.*, 2002). Vertreter dieser Familie besitzen eine multi-helikale DNA-Bindedomäne in der N-terminalen Hälfte und eine stark unterschiedliche C-terminale Domäne, die in vielen Fällen an der Bindung von Effektoren beteiligt sind (Aramaki *et al.*, 1995).

TetR N		ILDAALELFAEKGYDATSVREIAKRAGVSKGALYRHFKSKEELLAL
		IL+ A+++FAE+GY++++VR++ ++ G S+GA+++HF++KE L+LAL
<i>C. glutamicum</i>	1	MSVAAGDKPTNSRQETILEGARRCFAEHGYEGATVRRLEEATCKSRGAIFFHFGDKENLFLALAREDAARM
<i>C. efficiens</i>	1	MSVATGDKPVNSRQETILEGARRCFAEHGYEGATVRRLEEATCKSRGAIFFHFGDKENLFLALAREDAARM
<i>C. diphtheriae</i>	1	MPVVSNTELSMRRQETILEGARRCFAEHGYEGATVRRLEETVCKSRGAIFFHFSCKENLFLALAREDAARM
<i>M. tuberculosis</i>	1	VPKVSEDHLAARRRQILLDCARRCFAEYGYDKATVRRLEQAICMSRGAIFHHERKDALFFALAREDAARM
<i>M. bovis</i>	1	MPKVSEDHLAARRRQILLDCARRCFAEYGYDKATVRRLEQAICMSRGAIFHHERKDALFFALAREDAARM
<i>M. marinum</i>	1	MPKVSEDHLAARRRQILLDCARRCFAEYGYDKATVRRLEQAICMSRGAIFHHERKDALFFALAREDAARM
<i>Rhodococcus sp.</i>	1	VPKVSEDHLAARRRQILLDCARRCFAEYGYDKATVRRLEQAICMSRGAIFHHERKDALFFALAREDAARM
<i>C. glutamicum</i>	71	AEVVENGLVEVMRGMLEDPEPRYDWEISVRLIEISKOLRTDPEFRAKWIDHQSVLDEAVRVRLSRNVDKGM
<i>C. efficiens</i>	71	AETVSENGLEVMRGMLEDPEPRYDWEISVRLIEISKOLRTDPEFRAKWIDHQSVLDEAVRVRLARNADKGRM
<i>C. diphtheriae</i>	71	AEVVAENGLVEVMRDMLAHPERHDWATRLEITKMLRTDESERNRWIEHQRVLDDAVLERLORNAHLGRM
<i>M. tuberculosis</i>	71	AAVASREGLIGVMRDMLAAPPQFDWATRLEITARKLRNDEDESRGWAERSAELAAATTDRLRROKQANRV
<i>M. bovis</i>	71	AAVASREGLIGVMRDMLAAPPQFDWATRLEITARKLRNDEDESRGWAERSAELAAATTDRLRROKQANRV
<i>M. marinum</i>	71	ADVASREGLIGVMRDMLAAPPQFDWATRLEITARKLRNDEDESRGWAERSAELAAATTDRLRROKQANRV
<i>Rhodococcus sp.</i>	71	ADVAAEQGLIGVMRDMLAAPPQFDWATRLEITARKLRNDEDESRGWAERSAELAAATTDRLRROKQANRV
<i>C. glutamicum</i>	141	RTDVEIEVLTHTFLETVLDGFTSRLAICASTEGLSEVLDLVEGTVRKRDD--
<i>C. efficiens</i>	141	RTDVEIEVLTHTFLETVLDGFTSRLAICASTEGLSEVLDLVEGTVRKRDD--
<i>C. diphtheriae</i>	141	RDDVEIDVLTHTFLETVLDGFTSRLAICASTEGLSEVLDLVEGTVRKRDD--
<i>M. tuberculosis</i>	141	RDDVSDVLRCYLDLVDLGLARLASCEDPQRTAAVLDLVENSVRSS---
<i>M. bovis</i>	141	RDDVSDVLRCYLDLVDLGLARLASCEDPQRTAAVLDLVENSVRSS---
<i>M. marinum</i>	141	RDDVENEVLQCYLDLVDLGLARLASCEDPQRTAAVLDLVENSVRSS---
<i>Rhodococcus sp.</i>	141	RDDVETEVLVLSYLDLVDLGLARLASCEDPQRTAAVLDLVENSVRSS---

Abbildung 7: Sequenzvergleich von AcnR-Proteinen aus verschiedenen Spezies der Unterordnung *Corynebacterineae*. Aminosäuren, welche in allen sieben Spezies identisch waren, wurden schwarz hinterlegt und andere konservierte Aminosäuren grau schattiert. Das N-terminale Drittel der Proteine (AS 16 - 62) ist hoch konserviert und zeigt große Ähnlichkeit zur TetR_N-Proteinfamilie (PFAM00440). Die Konsensus-Sequenz von TetR_N ist über dem Alignment angegeben und die zu *C. glutamicum* AcnR identischen Aminosäuren direkt darunter.

2.3. Hinweise auf die Co-Transkription der Gene *acn* und *acnR*

Die transkriptionelle Organisation der Gene *acn* und *acnR* wurde mittels RT-PCR untersucht. Hierfür wurde Gesamt-RNA von *C. glutamicum* zunächst durch reverser Transkriptase mit drei verschiedenen Primern (RT-1-rev, RT-2-rev and RT-3-rev) in cDNA umgeschrieben (A, B und C in Abbildung 8). Die dabei erhaltenen DNA-Produkte wurden umgehend für PCR-Reaktionen eingesetzt (Nr. 1 - 5). Die PCR-Produkte wurden dann durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 9). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass *acn* und *acnR* co-transkribiert werden, da die cDNA, deren Synthese am 3'-Ende von *acnR* (RT-Reaktion A) startet, nicht nur zur Amplifikation eines *acnR*-Fragmentes (PCR Nr. 1) sondern auch zu einer Amplifikation eines *acn*-Fragmentes (PCR Nr. 2) führte. Als interne Kontrolle bei den reverse Transkriptase Reaktionen wurde *dnaE*, das für eine Untereinheit der DNA-Polymerase kodiert, eingesetzt. Interessanterweise war die Intensität des *dnaE*-PCR-Produkts (untere Bande in Abbildung 9) in dem Ansatz Nr. 5 deutlich schwächer als in den Ansätzen Nr. 1 - 4. Reaktion Nr. 5 ist die einzige Reaktion, bei der die eingesetzte cDNA am 3'-Ende von *acn* und nicht am 3'-Ende von *acnR* oder mitten im *acnR*-Gen beginnt. Eine hypothetische Erklärung für das schwache *dnaE*-PCR-

Produkt in Ansatz 5 könnte sein, dass die Menge an Transkript, welches nur das *acn*-Gen abdeckt, um ein Vielfaches höher ist als die Menge an Transkript, welches *acn* und *acnR* abdeckt. Dadurch könnte es zu einer Konkurrenz um die reverse Transkriptase und/oder um die Taq-DNA-Polymerase kommen, die zu einem reduzierten *dnaE*-Produkt führt.

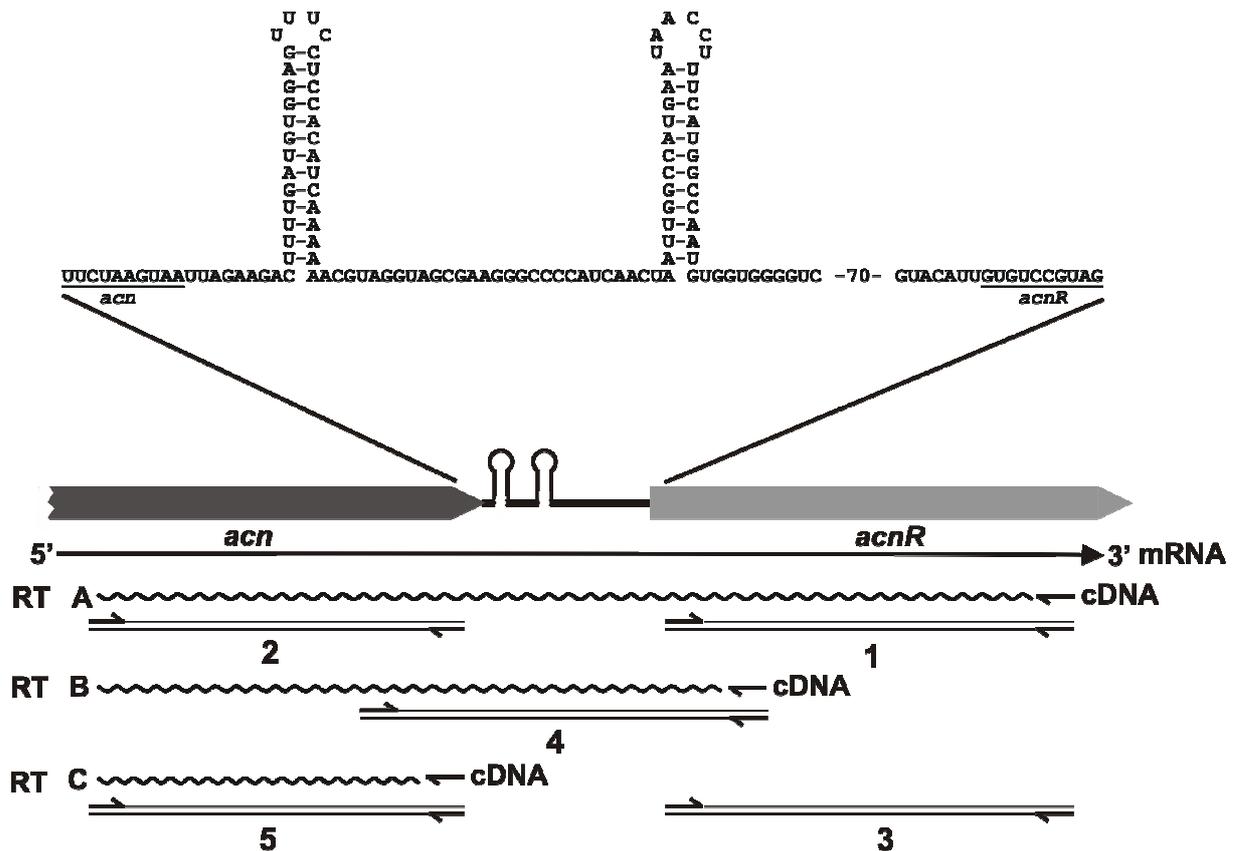


Abbildung 8: Schema zur Aufklärung der Organisation der Gene *acn* und *acnR* mittels RT-PCR. Oben dargestellt ist die Sequenz der intergenischen Region von *acn* und *acnR*, die zwei putative Haarnadelschleifen-Strukturen enthält. Im unteren Teil sind die reverse Transkriptase-Reaktionen A - C sowie die daran anschließenden PCR-Ansätze Nr. 1 - 5 schematisch dargestellt.

Ursache für die postulierten stark unterschiedlichen *acn*- und *acnR*-mRNA-Level sind zwei Haarnadelschleifen-Strukturen („stem-loops“) in der nicht-kodierenden Region zwischen beiden Genen, die zur Termination der Transkription führen könnten. Aus physiologischer Sicht wäre diese Situation sinnvoll, da die Zelle höhere Konzentrationen eines Enzyms aus dem Zentralstoffwechsel benötigt als von dessen Transkriptionsregulator.

Neben der Kontrollreaktion Nr. 3, in der ausgehend von einer nur *acn*-umfassenden cDNA kein *acnR*-Produkt erhalten wurde, wurden fünf weitere Kontrollreaktionen

(Nr. 6 - 10) durchgeführt. Diese waren zu den Ansätzen Nr. 1- 5 identisch, enthielten jedoch in den anfänglichen RT-Reaktionen A - C keine reverse Transkriptase. Die Tatsache, dass in diesen Ansätzen keine PCR-Produkte erhalten wurden, zeigt, dass die eingesetzte RNA nicht durch chromosomale DNA verunreinigt war.



Abbildung 9: Ergebnis der RT-PCR-Analyse. Das kleinere DNA-Fragment, welches in den Spuren 1 - 5 sichtbar ist, repräsentiert die *dnaE*-mRNA, die als Positivkontrolle in allen Reaktionen eingesetzt wurde. Das größere DNA-Fragment entspricht jeweils dem Produkt der PCR-Reaktionen 1 - 5 aus Abbildung 8. Die Spuren 6 - 10 zeigen die Produkte von Reaktionen, die entsprechend den Reaktionen 1 – 5 durchgeführt wurden, jedoch keine reverse Transkriptase enthielten.

2.4. Konstruktion und Charakterisierung einer $\Delta acnR$ -Deletionsmutante

Aufgrund der Co-Transkription von *acn* und *acnR* und der Tatsache, dass es sich bei AcnR um ein Mitglied der TetR-Familie handelte, lag die Vermutung nahe, dass AcnR als Repressor des Aconitase-Gens fungiert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine *in-frame*-Deletionsmutante (vgl. 5.6) von *C. glutamicum* (13032 $\Delta acnR$) konstruiert. Hierbei wurden die Codons 7 bis 177 von *acnR* durch eine 21 bp-Sequenz ersetzt. Die genomische Struktur der Mutante wurde zunächst durch PCR mit der chromosomalen DNA und dem Primerpaar tetR-amp-for/tetR-amp-rev überprüft. Die PCR-Produkte hatten die für den Wildtyp (1,6 kb) und die $\Delta acnR$ -Mutante (1,1 kb) erwarteten Größen. Desweiteren wurde die Mutante durch Southern-Blot-Analyse überprüft (Southern, 1975). Auch hier wurden die erwarteten Fragmente, nämlich ein 1,8 kb *EcoRI*-Fragment für den Wildtyp und ein 1,3 kb *EcoRI*-Fragment für die Mutante erhalten (Abbildung 10).

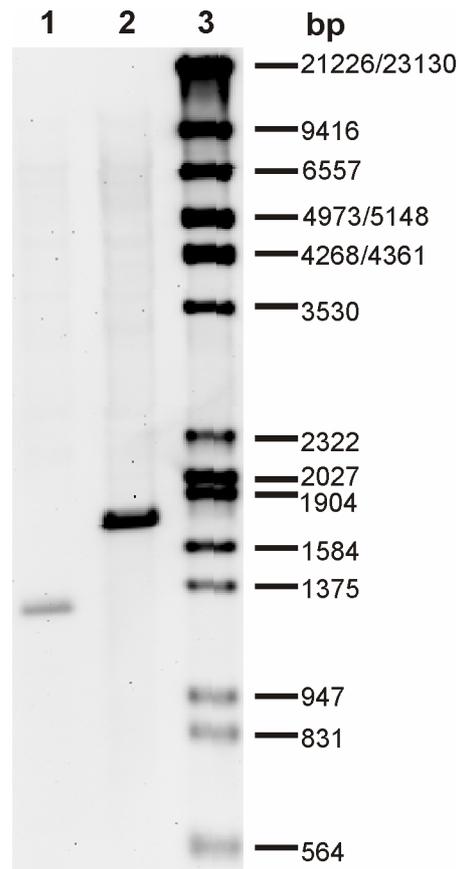


Abbildung 10: Southern-Blot-Analyse der $\Delta acnR$ -Mutante von *C. glutamicum*. Je 10 μg genomischer DNA der $\Delta acnR$ -Mutante (Spur 1) und des Wildtyps (Spur 2) wurden mit *EcoRI* über Nacht komplett verdaut, auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran gebロットet. Die Membran wurde mit einem 1,4 kb langen Digoxigenin-markierten PCR-Fragment (tetR-A-for und tetR-D-rev) hybridisiert, welches das *acnR*-Gen umfasste. In Spur 3 wurde ein Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard aufgetragen.

2.4.1. Einfluss der *acnR*-Deletion auf Wachstum und Aconitase-Aktivität

In einer ersten Serie von Experimenten zur Charakterisierung der $\Delta acnR$ -Mutante wurde getestet, welchen Einfluss die Deletion auf die Aconitase-Aktivität hat. Dazu wurden die Zellen in CgXII-Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für die Aktivitätsbestimmung geerntet. Aus Tabelle 8 geht hervor, dass die spezifische Aktivität der $\Delta acnR$ -Mutante auf Glukose mit ca. 1 $\text{U}/\text{mg}_{\text{Protein}}$ fünffach höher war als im Wildtyp. Dieses Ergebnis unterstützte die Annahme, dass es sich bei AcnR um einen Repressor der *acn*-Expression handelte. Bei Wachstum auf Acetat, Citrat und Propionat zeigte die $\Delta acnR$ -Mutante eine zwei-, drei- bzw. fünffach erhöhte Aconitase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.

Beim Vergleich der Aconitase-Aktivität von Acetat/Glukose, Citrat/Glukose und Propionat/Glukose zeigten sich im Wildtyp durchweg höhere Verhältnisse (4, 2,5 und 2,5) als in der $\Delta acnR$ -Mutante (1,5, 2,3 und 2,3). Besonders stark differierten die Werte für Acetat. Die Tatsache, dass in der Mutante die Aktivität nur 1,5-fach erhöht war, deutet darauf hin, dass die 4-fach erhöhte Aktivität im Wildtyp zu einem erheblichen Teil auf eine verringerte AcnR-Repression zurückzuführen ist. Andererseits weist das Resultat, dass es auch in der $\Delta acnR$ -Mutante noch eine Steigerung der Aconitase-Aktivität auf Acetat gibt, darauf hin, dass neben AcnR noch ein weiterer *acn*-Transkriptionsregulator oder ein anderer Regulationsmechanismus für die Aconitase existiert.

Tabelle 8: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Aconitase-Aktivität im Wildtyp und in der $\Delta acnR$ -Mutante. Beide Stämme wurden in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose, 50 mM Na-Citrat (+100 mM $MgCl_2$), 244 mM Na-Acetat oder 104 mM Na-Propionat kultiviert, in der exponentiellen Phase bei $OD_{600} \sim 5$ geerntet und schockgefroren. Die Zellen wurden anschließend mit Glasperlen aufgeschlossen, abzentrifugiert und der Überstand zur Aktivitäts-Bestimmung eingesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Kultivierungen dar.

Kohlenstoffquelle	Aconitase-Aktivität (U/mg _{Protein})					
	13032 Wildtyp			13032 $\Delta acnR$		
Glukose	0,20	±	0,05	1,04	±	0,06
Acetat	0,82	±	0,08	1,54	±	0,08
Citrat	0,53	±	0,08	1,78	±	0,40
Propionat	0,48	±	0,13	2,38	±	0,21

Während der Kultivierungen für die Bestimmung der Aconitase-Aktivität wurde beobachtet, dass die $\Delta acnR$ -Mutante in den meisten Fällen schneller wuchs als der Wildtyp. Dieser Effekt zeigte sich manchmal auf Citrat aber nahezu immer auf Glukose und Acetat. Aus sieben Vergleichen auf Glukose ergab sich für den Wildtyp eine mittlere Wachstumsrate (μ) von $0,362 \text{ h}^{-1} \pm 0,015$ und für die $\Delta acnR$ -Mutante von $0,397 \text{ h}^{-1} \pm 0,019$. In Abbildung 11 sind repräsentative Wachstumskurven für Glukose und Acetat dargestellt. Das schnellere Wachstum lässt sich möglicherweise mit einer erhöhten TCA-Zyklus-Aktivität in der Mutante erklären und unterstützt die Annahme, dass der Fluss durch den TCA-Zyklus auf Glukose und Acetat limitierend sein könnte (vgl. 1.2). In drei von fünf Fällen erreichte die $\Delta acnR$ -Mutante ($OD_{600} 62,9 \pm 7,5$) zudem auch eine höhere End-OD als der Wildtyp ($OD_{600} 53,1 \pm 9,8$).

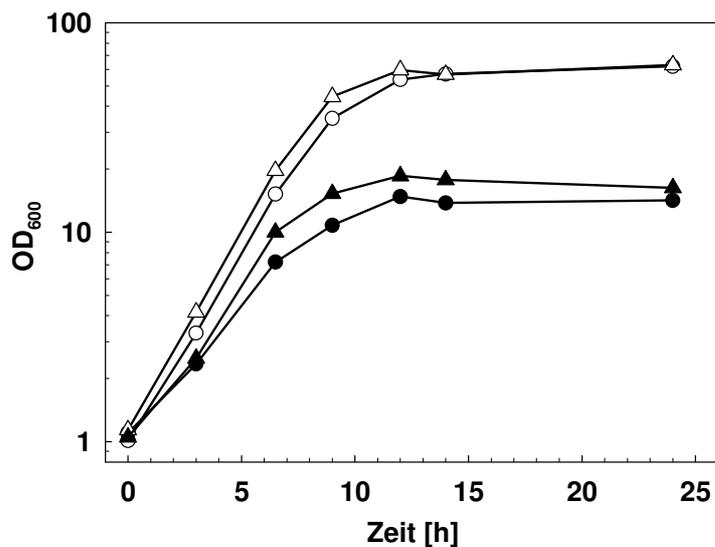


Abbildung 11: Wachstumsvergleich von Wildtyp (○,●) und $\Delta acnR$ -Mutante (△,▲) auf CgXII-Minimalmedium ($36 \mu\text{M FeSO}_4$; Zugabe der Spurensalze nachdem Autoklavieren) mit 222 mM Glukose (△,○) oder 244 mM Acetat (▲,●) als Kohlenstoffquelle.

2.4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante

Um den Effekt der *acnR*-Deletion auf die globale Genexpression und im Speziellen auf die *acn*-Expression zu untersuchen, wurden die Transkriptome von $\Delta acnR$ -Mutante und Wildtyp mittels DNA-Chip-Analyse miteinander verglichen. Hierfür wurden beide Stämme in CgXII-Minimalmedium (Spurensalze wurden hier noch vor dem Autoklavieren zugesetzt, so dass nur etwa $8 \mu\text{M FeSO}_4$ im Medium waren) mit 222 mM Glukose kultiviert und die exponentiell wachsenden Zellen ($\text{OD}_{600} \sim 6$) zur RNA-Isolation eingesetzt. Die Auswertung ergab, dass das *acn*-Gen im Stamm 13032 $\Delta acnR$ ein im Mittel um den Faktor $4,9 \pm 2,4$ erhöhten mRNA-Level gegenüber dem Wildtyp hatte. Insgesamt wurden 14 Microarray-Vergleiche ausgehend von sieben verschiedenen RNA-Isolierungen durchgeführt. Während in zehn dieser Experimente (A01 - A10 in Abbildung 13) neben *acn* auch sehr viele Eisenmangel-Gene eine verstärkte Expression in der $\Delta acnR$ -Mutante zeigten, traten diese in vier Experimenten nicht auf. Bei näherer Betrachtung der Wachstumskurven der für die RNA-Isolation verwendeten Kulturen zeigte sich, dass in den beiden Kultivierungen, in denen die Eisenmangel-Gene nicht auftraten, der Wildtyp mit einer etwas höheren optischen Dichte inokuliert wurde als die $\Delta acnR$ -Mutante und auch bei einer etwas höheren OD geerntet wurde (Abbildung 12). Eine Erklärung für das Auftreten der Eisenmangel-Gene könnte in einem erhöhten Eisenbedarf der $\Delta acnR$ -Mutante liegen

bedingt durch die verstärkte Synthese des [4Fe–4S]-Proteins Aconitase. Wurden Wildtyp und Mutante bei der gleichen OD geerntet, hatte die Mutante anscheinend bereits Eisenmangel, während dem Wildtyp noch ausreichend Eisen zur Verfügung stand. Wurde der Wildtyp aber bei einer etwas höheren OD geerntet als die Mutante, hatten beide Stämme Eisenmangel und die entsprechenden Gene traten bei der vergleichenden Transkriptom-Analyse nicht in Erscheinung.

CGXII-Medium sollte aufgrund der zugegebenen Spurensalz-Lösung 36 μM Eisen enthalten. Die Bestimmung der Eisenkonzentration mit Bathophenanthrolin (vgl. 7.9) ergab jedoch, dass das Medium nach dem Autoklavieren nur ca. 8 μM Eisen enthielt. Dabei wurden die Spurensalze vor dem Autoklavieren zugegeben. Wurden sie nach dem Autoklavieren zugesetzt, ergab die Eisen-Bestimmung eine Konzentration von 34 μM . Das Autoklavieren führt also zu einem signifikanten Verlust von gelöstem Eisen durch Präzipitation und dies ist vermutlich der Grund dafür, dass bereits bei relativ geringen Zelldichten ein Eisenmangel auftritt und die Eisenmangel-Gene induziert werden.

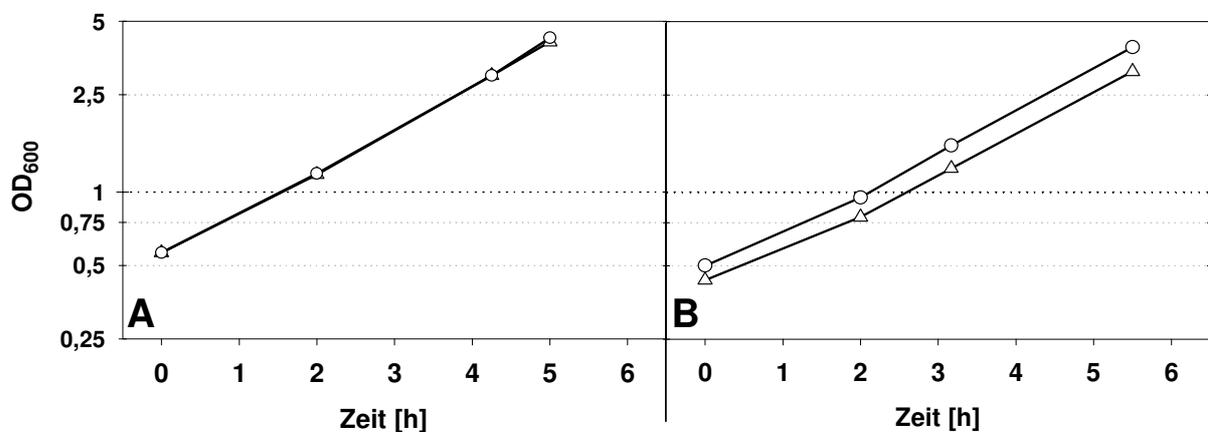


Abbildung 12: Repräsentative Wachstumskurven von Wildtyp (○) und $\Delta acnR$ -Mutante (△) für sieben RNA-Isolierungen. Bei A wurden beide Stämme zur gleichen OD₆₀₀ angeimpft und ein Auftreten der Eisen-Aufnahme Systeme konnte beobachtet werden. Bei B wurde der Wildtyp mit leicht erhöhter optischer Dichte angeimpft als die Mutante. Ein Auftreten der Eisen-Aufnahmesysteme in den DNA-Chips konnte nicht beobachtet werden. Die Kultivierungen erfolgten in CgXII-Minimalmedium, bei dem die Spurensalze noch vor dem Autoklavieren zugegeben wurden ($\sim 8 \mu\text{M}$ FeSO₄).

Die gleichen Wachstumsraten von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante bei diesen Experimenten im Gegensatz zu dem unter 2.4.1 beschriebenen besseren Wachstum der $\Delta acnR$ -Mutante lassen sich am ehesten mit dem im Medium zur Verfügung

stehenden Eisenkonzentrationen erklären. Bei den in Abbildung 12 gezeigten Experimenten wurden nur ca. 8 μM FeSO_4 eingesetzt, während die Eisenkonzentration bei den unter 2.4.1 beschriebenen Experimenten 36 μM betrug.

2.4.3. Einfluss von Eisen auf die globale Genexpression von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante

Um die obigen Vermutungen zu bestätigen und um zu klären, ob es sich bei AcnR nun um einen lokalen Regulator der Aconitase oder darüber hinaus um einen globalen Regulator der Eisenmangel-Gene handelte, wurden weitere DNA-Chip-Experimente durchgeführt. Wildtyp und Mutante wurden nach Wachstum in CGXII-Medium verglichen, das zusätzlich 100 μM bzw. 500 μM FeSO_4 enthielt. In diesen vier Experimenten (B01 - B04, Abbildung 13) wurde erneut ein im Mittel 5,8-fach erhöhter mRNA-Level von *acn* in der $\Delta acnR$ -Mutante ermittelt. Die mRNA-Level der Eisenmangel-Gene, die in zehn der vorangegangenen Experimente (vgl. 2.4.2) um den Faktor 3 in der Mutante erhöht waren (A01 - A10, Abbildung 13), zeigten keine Unterschiede mehr. Die vier Experimente aus der ersten Serie, bei denen die Eisenmangel-Gene nicht auftraten, wurden in Abbildung 13 nicht berücksichtigt. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass *acn* das einzige Gen ist, dessen mRNA-Level in der $\Delta acnR$ -Mutante von *C. glutamicum* signifikant erhöht ist.

In zwei weiteren Reihen von Experimenten wurde der Einfluss von verschiedenen Eisenkonzentrationen (508 μM vs. 8 μM) auf die globale Genexpression sowohl im Wildtyp (Abbildung 13, C01 - C03) als auch in der $\Delta acnR$ -Mutante (Abbildung 13, D01 - D03) untersucht. Anhand Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Eisenmangel-Gene in diesen sechs Experimenten (C und D) einen um ≥ 3 -fach reduzierten mRNA-Level unter Eisenüberschuss (508 μM) aufwiesen. Eine andere Gruppe von Genen wies dagegen einen um ≥ 3 -fach erhöhten mRNA-Level unter Eisenüberschuss auf. Einige dieser Gene kodieren vermutlich Transportproteine für den Import von zweiwertigen Kationen wie Zink oder Mangan. Dies lässt sich damit erklären, dass die hohen Eisen-Konzentrationen die Aufnahme anderer zweiwertiger Kationen kompetitiv hemmen. Der überwiegende Teil der Gene mit ≥ 3 -fach erhöhtem mRNA-Level unter Eisenüberschuss kodierte jedoch für Eisen-enthaltende Proteine wie Aconitase (ein [4Fe-4S]-Cluster), Succinat-Dehydrogenase (je ein [4Fe-4S]-, [2Fe-2S]- und [3Fe-4S]-Cluster, Häm b_L and Häm b_H ; (Bott & Niebisch, 2003)), Nitrat-

Reduktase (drei [4Fe-4S]- und ein [3Fe-4S]-Cluster, Häm b_L and Häm b_H ; (Bott & Niebisch, 2003)), Katalase (Häm b ; Bott et al., unveröffentlicht), Isopropylmalat-Dehydratase (ein [4Fe-4S]-Cluster), Benzoat-1,2-dioxygenase ([2Fe-2S]-Cluster, ein Nicht-Häm Eisen) und Catechol-1,2-dioxygenase (ein Nicht-Häm Eisen).

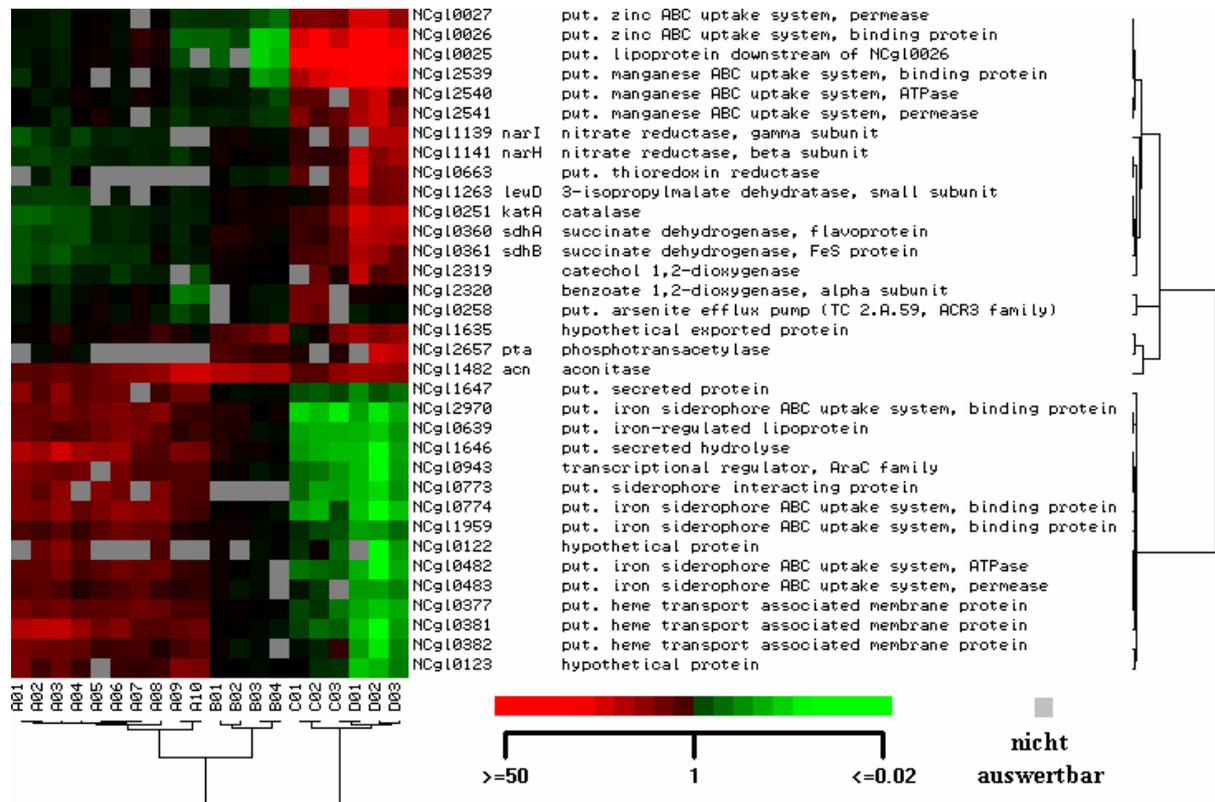


Abbildung 13: Hierarchische Clusteranalyse der Genexpressionsveränderungen aus vier verschiedenen Versuchsreihen (A - D) mit insgesamt 20 DNA-Chip Experimenten. Das Cluster enthält die Gene, deren durchschnittlicher mRNA-Level im Mittel in einer der vier Reihen ≥ 3 oder ≤ 3 verändert war. Die folgenden Serien an Experimenten wurden durchgeführt: A01 - A10, $\Delta acnR$ vs. Wildtyp in CgXII-Minimalmedium mit $\sim 8 \mu M$ Fe; B01 - B04, $\Delta acnR$ vs. Wildtyp in CgXII-Minimalmedium mit $108 \mu M$ Fe (B01, B02) oder $508 \mu M$ Fe (B03, B04); C01 - C03, Wildtyp mit $508 \mu M$ Fe vs. Wildtyp mit $8 \mu M$ Fe; D01 - D03, $\Delta acnR$ mit $508 \mu M$ Fe vs. $\Delta acnR$ mit $8 \mu M$ Fe. Die Farbskala gibt die relativen mRNA-Level ($\Delta acnR$ -Mutante/Wildtyp bzw. Eisenüberschuss/Eisenmangel) wieder.

Interessanterweise zeigten viele dieser Gene mit Ausnahme von *acn* in den ersten Experimenten (A01 - A10) einen erniedrigten mRNA-Level in der $\Delta acnR$ -Mutante, in der ein Eisen-Mangel nachgewiesen wurde. Dies zeigt, dass die Synthese der Eisenenthaltenden Proteine in *C. glutamicum* teilweise über die Verfügbarkeit von Eisen kontrolliert wird. Die Tatsache, dass die Genexpressionsveränderungen beim Vergleich $500 \mu M$ Eisen vs. $8 \mu M$ Eisen für Wildtyp (C01 - C03) und $\Delta acnR$ -Mutante

(D01 - D03) gleich waren, bestätigt die Annahme, dass AcnR nicht direkt an der Regulation der Eisenmangel-Gene beteiligt ist.

2.5. Identifizierung des Transkriptionsstarts des *acn*-Gens

Mittels Primer-Extension-Analysen sollten zum einen die Ergebnisse der DNA-Chip-Experimente bestätigt werden und zum anderen der Transkriptionsstart des *acn*-Gens bestimmt werden. Hierfür wurden gleiche Mengen Gesamt-RNA von Wildtyp bzw. $\Delta acnR$ -Mutante, reverse Transkriptase und zwei verschiedene Primer, *acn*-PE1* (Abbildung 14A) und *acn*-PE1* (Abbildung 14B) eingesetzt. Mit beiden Primern wurden zwei Produkte erhalten. Der Transkriptionsstart mit der stärkeren Intensität lag 110 bp stromaufwärts des vorgeschlagenen TTG-Startcodons des *acn*-Gens. Der Primer mit der schwächeren Intensität befand sich 113 bp stromaufwärts des Startcodons. Die Intensität beider Primer-Extension-Produkte war in der $\Delta acnR$ -Mutante um ein Vielfaches stärker als im Wildtyp, was die Ergebnisse der DNA-Chips bestätigte (Abbildung 14B).

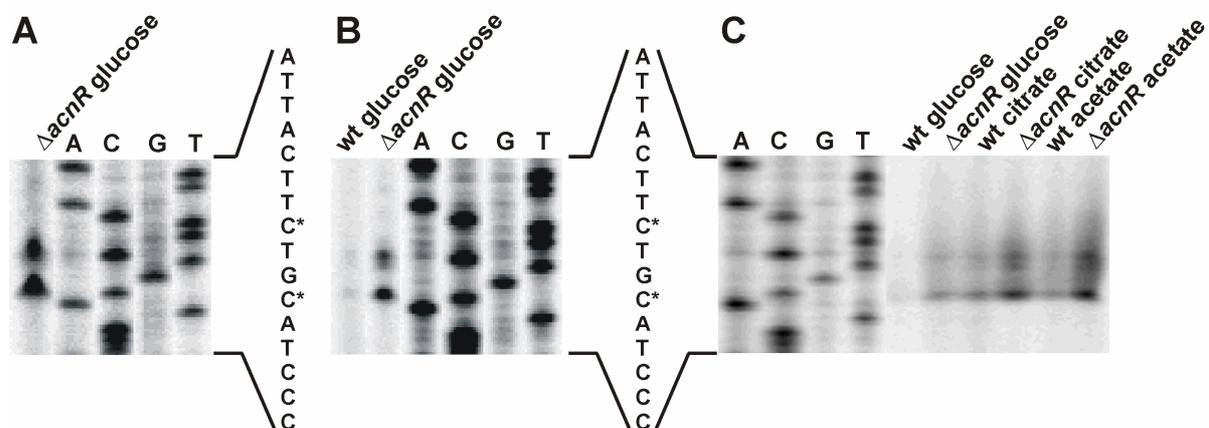


Abbildung 14: Bestimmung des Transkriptionsstarts des *acn*-Gens of *C. glutamicum* mittels Primer-Extension-Analyse. 12,5 μ g (A und B) oder 15 μ g (C) Gesamt-RNA aus Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante, welche auf CgXII-Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen kultiviert worden waren, wurden zur Primer-Extension-Analyse mit den Primern *acn*-PE1* (A und C) und *acn*-PE3* (B) eingesetzt. Die Transkriptionsstarts wurden mit einem * markiert. Die dazugehörigen Sequenzierungsreaktionen wurden mit den gleichen Primern und einem den DNA-Bereich abdeckenden PCR-Produkt durchgeführt.

Dies galt nicht nur für RNA, die aus Glukose-gewachsenen Zellen isoliert wurde, sondern auch für RNA, die aus Acetat- und Citrat-gewachsenen Zellen isoliert wurde

(Abbildung 14C). Die Intensität der Signale auf Citrat und Acetat korrelierten qualitativ mit den Ergebnissen der Aconitase-Aktivitätsmessungen (Tabelle 8) in den beiden Stämmen. Das Verhältnis der Intensitäten der beiden Primer-Extension-Produkte war unter den genannten Kultivierungsbedingungen immer etwa gleich.

2.6. Nachweis der Bindung von AcnR an den *acn*-Promotor

2.6.1. Heterologe Expression und Aufreinigung von AcnR

Die erhöhten mRNA-Level von *acn* und die erhöhten Aconitase-Aktivitäten in der $\Delta acnR$ -Mutante deuteten darauf hin, dass AcnR die *acn*-Transkription blockiert. Um die Operatorregion zu identifizieren, wurde aufgereinigtes AcnR-Protein benötigt. Hierfür wurden die Plasmide pET24b-*acnR*-C und pET28a-*acnR*-N konstruiert, welche eine Überexpression von *acnR* unter Kontrolle des T7-Promoters in *E. coli* BL21(DE3) ermöglichen.

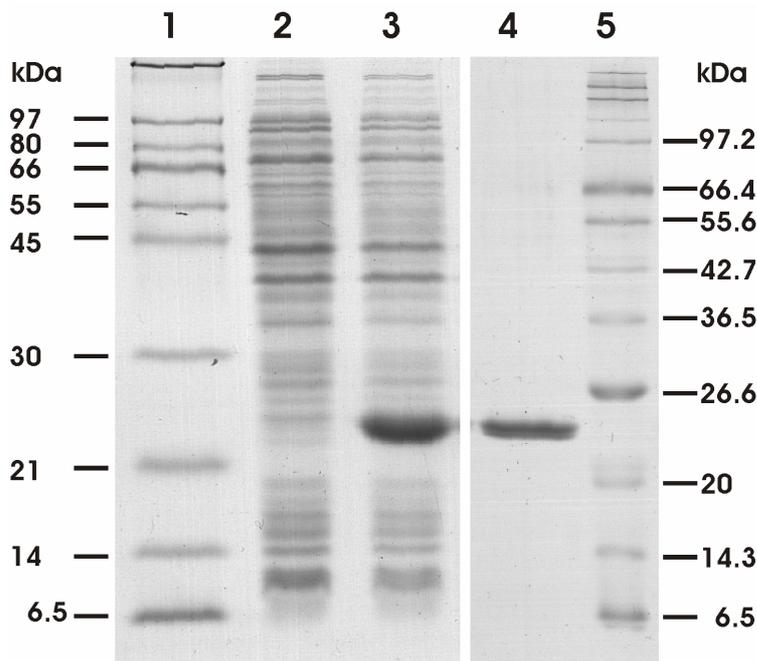


Abbildung 15: Coomassie-gefärbtes 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel zum Nachweis der Überproduktion und der Aufreinigung von AcnR-C. Die Spuren 1 und 5 enthalten Größenstandards; Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pET24b-*acnR*-C vor (Spur 2) und 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG (Spur 3); aufgereinigtes AcnR-C nach StrepTactin-Affinitätschromatographie (Spur 4).

Das AcnR-Protein, welches durch das pET24-Derivat kodiert wird (AcnR-C), enthält 10 zusätzliche Aminosäurereste (LEWSHPQFEK) am C-terminalen Ende, die eine StrepTag-II Sequenz (unterstrichen) beinhalten. Das AcnR-Protein, welches durch

das pET28-Derivat kodiert wird (AcnR-N), enthält 14 zusätzliche Aminosäurereste (MASWSHPQFEKGAH) am N-terminalen Ende, die eine StrepTag-II Sequenz (unterstrichen) beinhalten. Sowohl AcnR-N als auch AcnR-C wurden in *E. coli* überproduziert und durch Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose aufgereinigt. Anhand von Abbildung 15 ist am Beispiel von AcnR-C die Überproduktion und Aufreinigung im SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Die apparente Masse von AcnR-C im SDS-Gel entsprach der berechneten Masse von 22,5 kDa.

2.6.2. Bestimmung der nativen Größe von AcnR

Die native molekulare Masse von gereinigtem AcnR wurde durch Größenausschlusschromatographie (vgl. 7.7) sowohl mit AcnR-C (1 mg) als auch mit AcnR-N (0,5 mg) bestimmt. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Albumin (20 mg), Alkohol-DH (10 mg), Amylase (8 mg), Carboanhydrase (6 mg) und Cytochrom *c* (4 mg) in einem Gesamtvolumen von 2 ml auf die Säule appliziert und chromatographiert.

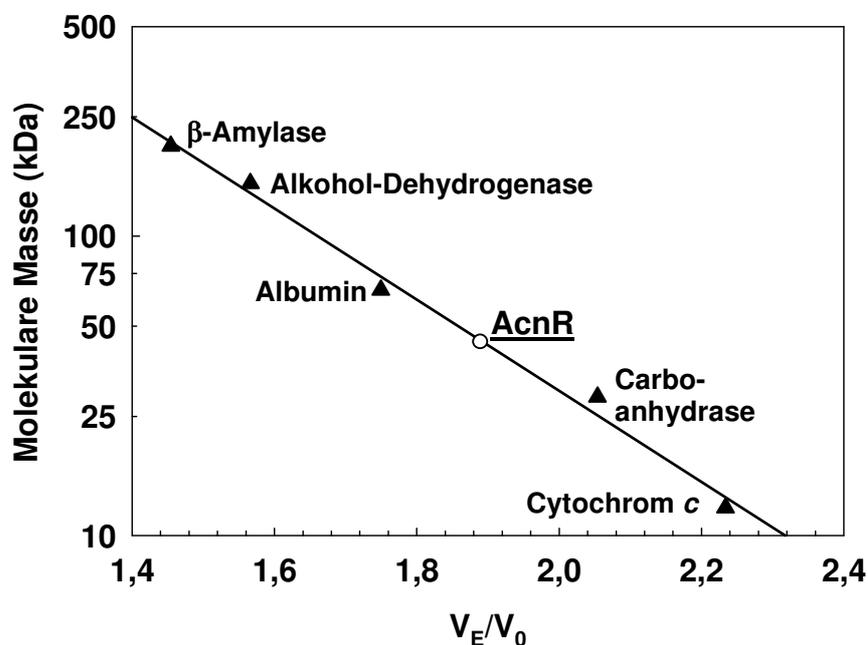


Abbildung 16: Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von AcnR. AcnR-C oder AcnR-N und die 5 Standardproteine wurden über eine HiLoad 26/60 Superdex 200 „prep grade“ Säule aufgetrennt. Als Elutionspuffer diente 20 mM HEPES-Puffer (pH 8.0) mit 300 mM NaCl und 1 mM DTT. V_0 entspricht dem Ausschlussvolumen der Säule, das mit Blue Dextran (2.000 kDa) bestimmt wurde. V_E entspricht dem Elutionsvolumen der verschiedenen Proteine.

Anhand der Eichgeraden (Abbildung 16) wurde für AcnR eine native Masse von 44 kDa ermittelt, die ziemlich exakt der berechneten Masse eines AcnR-Dimers entspricht. Eine dimere Struktur wird auch für viele andere Proteine der TetR-Familie gefunden z.B. TetR (Hinrichs *et al.*, 1994), CamR (Aramaki *et al.*, 1995), QacR (Grkovic *et al.*, 2001) oder EthR (Engohang-Ndong *et al.*, 2004).

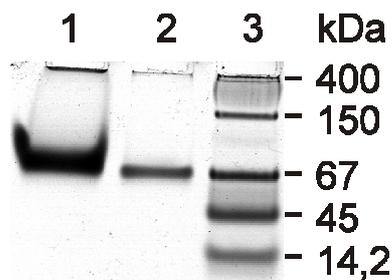


Abbildung 17: 5 - 40 % iger Gradientengel zur Abschätzung der nativen Masse von AcnR. Hierfür wurden 5 μ g (Spur 1) und 1 μ g (Spur 2) aufgereinigtes AcnR-C verwendet. Spur 3 enthält einen nativen Molekulargewichtsstandard.

In einem weiteren Experiment wurde AcnR in einem nativen 5 - 40 %-Gradientengel aufgetrennt. Dabei verhielt sich AcnR wie ein Protein mit einer Masse von ca. 67 kDa (Abbildung 17). Dies weicht deutlich von der durch Größenausschlusschromatographie bestimmten nativen Masse von 45 kDa ab.

2.6.3. DNase I-Footprints zum Nachweis der Bindung von AcnR an den *acn*-Promotor

Die Bindestelle von AcnR im *acn*-Promotorbereich wurde durch DNase I-Footprints bestimmt. Dazu wurden steigende Konzentrationen von AcnR-C mit einer konstanten Konzentration eines PCR-Fragments inkubiert, das den DNA-Bereich von Position -346 bis +52 relativ zum *acn*-Startcodon umfasste. Das PCR-Produkt wurde mit dem Primerpaar *acn*-PEK-for/*acn*-PE1* generiert, wobei der letztgenannte Primer am 5'-Ende eine IRD800-Markierung trug. Auf diese Weise war der kodierende Strang markiert. Alternativ wurde AcnR-C mit einem PCR-Fragment (Primerpaar *acn*-FP1*/*acn*-PEK-rev) inkubiert, das die DNA-Region von -268 bis +241 relativ zum *acn*-Startcodon umfasste und bei dem der nicht-kodierende Strang IRD800-markiert war. Die DNA-AcnR-Gemische wurden mit DNase I behandelt und die resultierenden Produkte über denaturierende PAGE in einem LI-COR 4200-Sequenzierungssystem aufgetrennt. Beim kodierenden Strang war der Bereich von -11 bis -28 relativ zum

Transkriptionsstart 110 bp stromaufwärts des Startcodons vor DNase I-Verdau ab einem AcnR-Dimer/DNA-Konzentrations-Verhältnis von ca. 26:1 geschützt (Abbildung 18A). Beim nicht-kodierenden Strang war lediglich im Bereich von -18 bis -20 ein Schutz ab einem AcnR-Dimer/DNA-Konzentrations-Verhältnis von ca. 7:1 zu erkennen (Abbildung 18B).

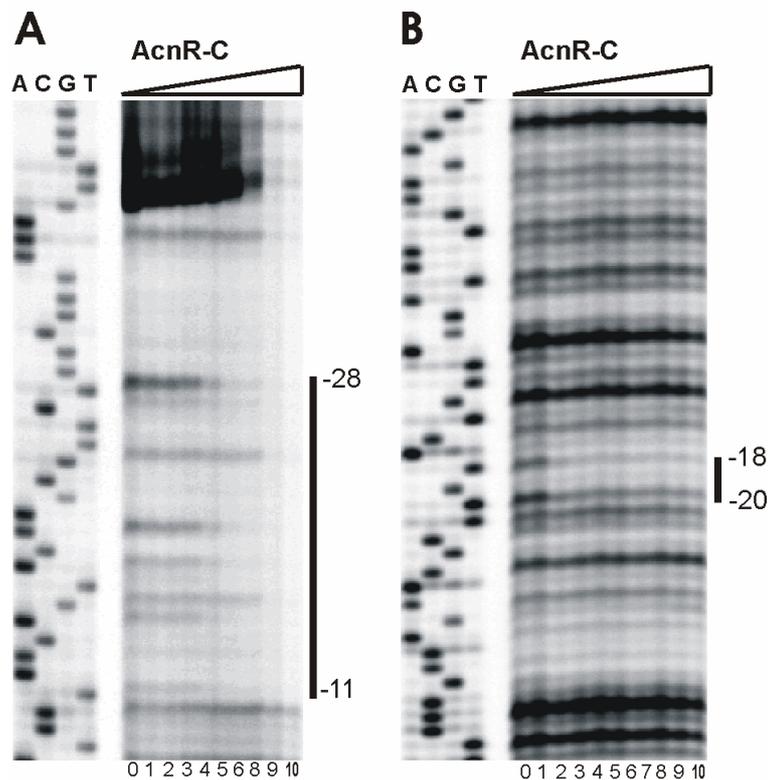


Abbildung 18: Analyse der Bindestelle von AcnR an den *acn*-Promoter durch DNase I-Footprint-Analyse. Dargestellt sind Ausschnitte aus DNase I-Footprints mit dem kodierenden Strang der DNA (A, 0,95 nM IRD800-markierte Sonde) und mit dem nicht-kodierenden Strang (B, 0,75 nM IRD800-markierte Sonde). Die Sonden wurden mit verschiedenen Konzentrationen von gereinigtem AcnR-C inkubiert und anschließend für 2 min mit DNase I verdaut. Spur 0 enthielt kein Protein, Spur 1 5 nM, Spur 2 10 nM, Spur 3 25 nM, Spur 4 50 nM, Spur 5 100 nM, Spur 6 250 nM, Spur 7 500 nM (nicht in A), Spur 8 1,0 µM, Spur 9 2,5 µM und Spur 10 5,0 µM. Die durch AcnR vor DNase I-Verdau geschützten Bereiche sind durch Striche markiert. Die Zahlen geben die Position relativ zum Transkriptionsstart an, der 110 bp stromaufwärts des *acn*-Startcodons lokalisiert ist. Die dazugehörigen Sequenzierungsreaktionen wurden mit den gleichen Primern und einem den DNA-Bereich abdeckenden PCR-Produkt durchgeführt.

Eine Analyse der DNA-Regionen stromabwärts der *acn*-Gene von *C. diphtheriae*, *C. efficiens* und vier *Mycobacterium*-Spezies offenbarte, dass alle ein Sequenzmotiv enthalten, das ähnlich zu der durch AcnR geschützten Sequenz aus *C. glutamicum* ist. Aus dem Sequenz-Alignment dieser Regionen (Abbildung 19) konnte eine

steigenden Konzentrationen verschwindet die untere Bande vollends und es ist nur noch die retardierte Bande zu erkennen. Bei den höchsten eingesetzten AcnR-Konzentrationen sind keine diskreten Banden mehr erkennbar. Dazu kommt es möglicherweise aufgrund der Bildung von AcnR-Multimeren. Da in allen Ansätzen die gleiche DNA-Konzentration (15,5 nM) eingesetzt wurde, kann man aus diesem Experiment die Aussage treffen, dass ab einem 2-fachen molaren Überschuss an Repressor (AcnR) eine deutliche Bindung beobachtet werden kann.

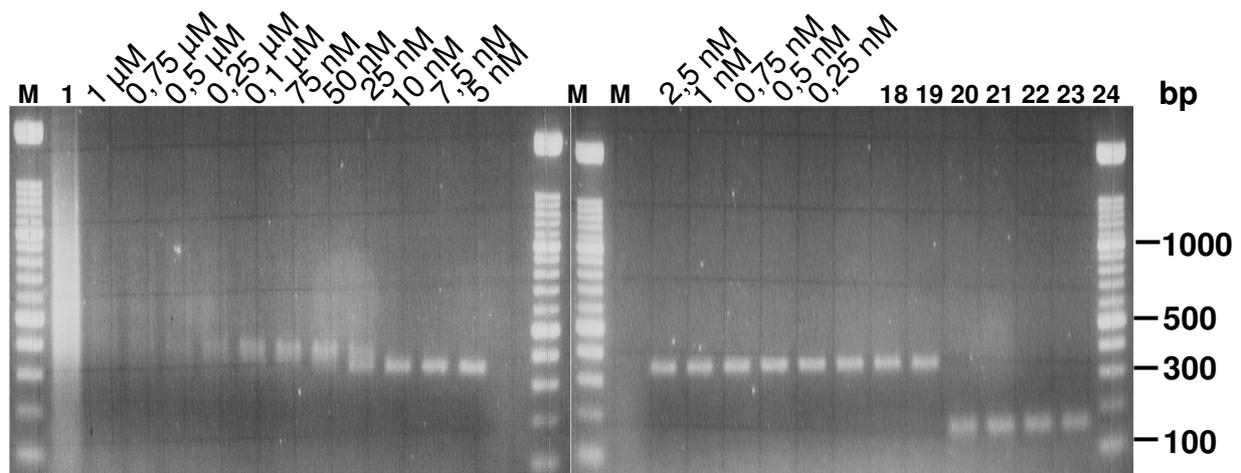


Abbildung 20: Gelretardations-Experiment mit AcnR-C und der *acn*-Promotorregion (15,5 nM). In Spur 1 ist ein Ansatz mit 1 µM AcnR und Poly-dIdC-Kompetitor-DNA aufgetragen. In den Spuren 2 - 17 sind absteigende Konzentrationen (1 µM bis 0,25 nM) von AcnR-C eingesetzt. In den Spuren 18 - 24 sind Kontrollen ohne Protein (18), mit 1 µM *C. glutamicum* Lrp (Lange *et al.*, 2003) anstelle von AcnR-C (Spuren 19 - 20) und mit der *clgR*-Promotorregion (33,7 nM) (Engels *et al.*, 2004) anstelle der *acn*-Promotorregion (Spuren 21 - 24) aufgetragen. Die Bindung an die *clgR*-Promotorregion wurde mit 1 µM AcnR-C (Spur 21), 100 nM AcnR-C (Spur 22), 1 µM Lrp (Spur 23) und 100 nM Lrp (Spur 24) getestet.

Da der Einsatz von Poly-dIdC-Kompetitor-DNA zur Färbung der gesamten Spur mit Ethidiumbromid führte (Spur 1), wurden die übrigen Ansätze ohne Kompetitor-DNA durchgeführt. Um zu zeigen, dass die Bindung von AcnR-C an die *acn*-Promotorregion spezifisch ist, wurde einerseits anstelle des *acn*-Promotors ein *clgR*-Promotorfragment eingesetzt (Spuren 21 - 24). Dieses Fragment wurde durch AcnR und Lrp nicht retardiert. Weiterhin wurde anstelle von AcnR-C die Bindung von einem C-terminal strepgetaggten Lrp-Protein (1 µM) an den *acn*-Promotor getestet (Spuren 19 und 20). Dabei trat auch keine Retardation des *acn*-Fragments auf. Diese Kontrollen bestätigen die Spezifität der AcnR- P_{acn} -Interaktion.

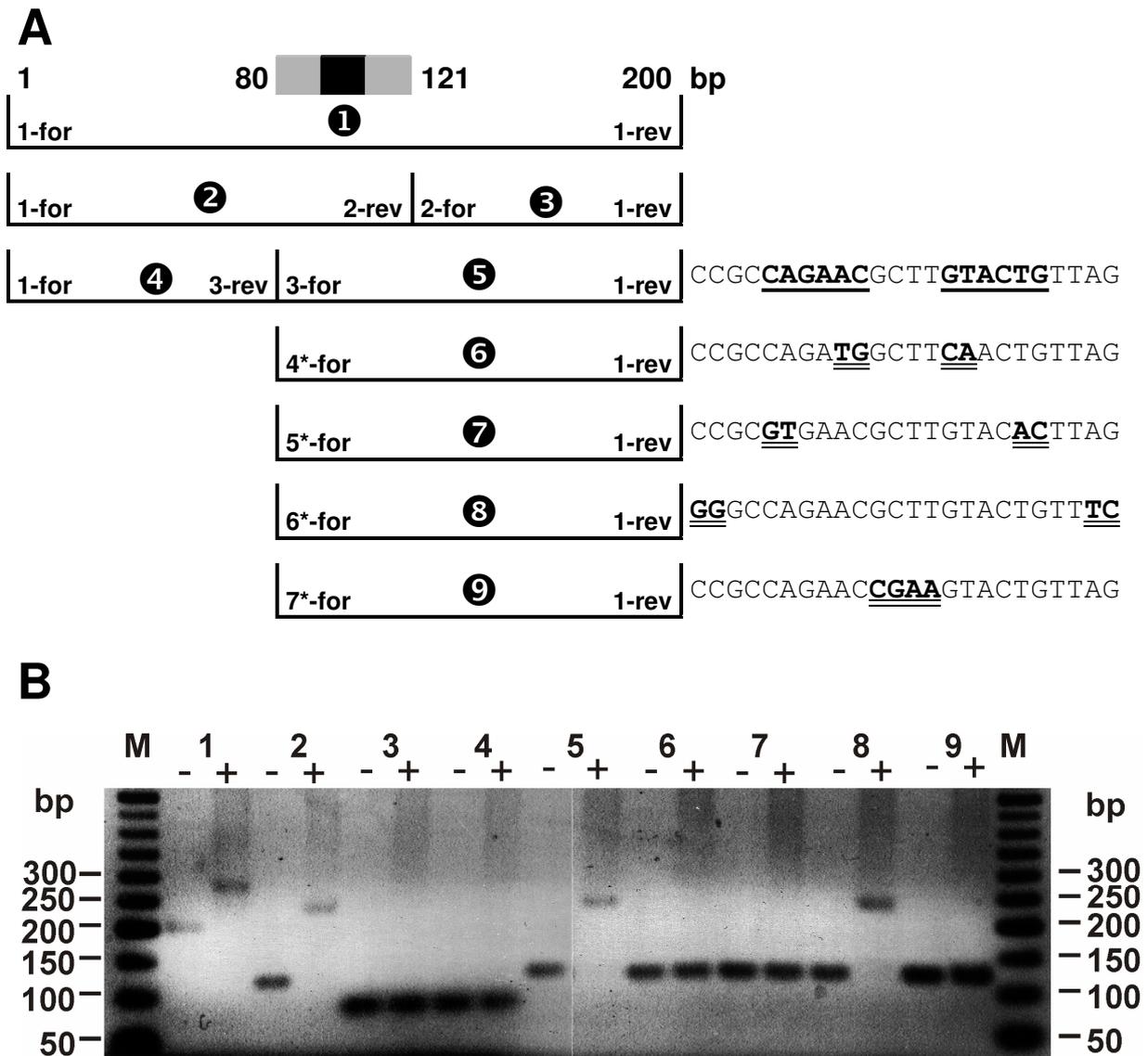


Abbildung 21: (A) Schematische Übersicht zur genaueren Untersuchung der Binderegion von AcnR an den *acn*-Promoter. Von 1 bis 9 sind unterschiedliche PCR-Reaktionen aufgeführt, die mit den angegebenen Primern durchgeführt wurden. Der graue Bereich (81 - 120 bp) ist der Bereich, der durch die Reaktionen 2 - 5 eingegrenzt werden sollte. Der schwarze Bereich gibt die Sequenzen wieder, die auf der rechten Seite der Abbildungen aufgeführt worden sind. Dabei entspricht Reaktion 5 der Wildtyp-Situation. Bei den Reaktionen 6 - 9 wurden durch die Primer gezielte Basenaustausche vorgenommen. Die ausgetauschten Basen sind fett und doppelt unterstrichen hervorgehoben. (B) Gelretardations-Experiment mit AcnR-C (500 nM) und verschiedenen aus (A) konstruierten PCR-Fragmenten, die die *acn*-Binderegion (1, 2 und 5), benachbarte Regionen (3 und 4) oder mittels PCR eingefügte fehlerhafte *acn*-Binderegionen (6 - 9) in einer Konzentration von 50 nM enthielten. „-“ und „+“ geben jeweils an, ob AcnR-C in 10-fachem Überschuss dem Ansatz zugefügt wurde oder nicht.

Um die Position der AcnR-Bindestelle im *acn*-Promoterbereich zu verifizieren, wurden Gelretardationsexperimente mit fünf verschiedenen PCR-Fragmenten durchgeführt (Abbildung 21A, Fragmente 1 - 5). Diese enthielten entweder den

mittels DNase I-Footprint-Analysen identifizierten Bereich (Fragmente 1, 2 und 5) oder eine benachbarte Region (Fragmente 3 und 4), welche die postulierte Bindestelle nicht mehr enthielt. Anhand von Abbildung 21B ist zu erkennen, dass nur die Fragmente retardiert wurden, welche die postulierte Bindungsstelle enthielten.

Der Bereich der Bindestelle konnte somit eindeutig auf 40 Basenpaare eingeschränkt werden. Um die Richtigkeit der postulierten Bindestelle noch weiter zu bestätigen, wurden mutierte Derivate von Fragment 5 eingesetzt, i.e. die Fragmente 6 - 9. Die Mutationen wurden dabei mittels der Primer, die für die Amplifikation der Fragmente verwendet wurden, eingeführt. Der Austausch der beiden äußeren Basen in beiden Hälften des „inverted repeat“ oder der beiden inneren Basen führte dazu, dass die entsprechenden Fragmente Nr. 6 und 7 nicht mehr retardiert wurden. Ebenso führte der Austausch der vier Basen, welche die beiden „inverted repeats“ trennen, dazu, dass das Fragment Nr. 9 nicht mehr retardiert wurde. Demgegenüber wurde ein Fragment (Nr. 8), in dem je zwei Basen ausserhalb des „inverted repeats“ verändert worden waren, immer noch retardiert. Diese Ergebnisse unterstützen eindeutig die postulierte AcnR-Bindestelle.

2.7.2. Suche nach dem AcnR-Effektor

Nachdem die Bindung von AcnR an den *acn*-Promoter nachgewiesen und die Bindungsstelle lokalisiert werden konnte, stellte sich die Frage, wodurch die Bindung von AcnR an den *acn*-Promotor reguliert wird. Bei den bisher untersuchten TetR-Typ-Regulatoren wurden in der Regel niedermolekulare Substanzen identifiziert, welche durch Bindung an die C-terminale Domäne der Regulatoren deren Bindung an die DNA aufheben können z.B. Tetracyclin im Falle von TetR (Hinrichs *et al.*, 1994) oder verschiedenste Substanzen bei QacR (Grkovic *et al.*, 1998).

Tabelle 9: Übersicht über die bei den Gelretardationsexperimenten eingesetzten Substanzen.

Acetaldehyd	AMP	Glykolaldehyd	Oxalacetat
Acetat-K	Citrat-Na ₃	Glykolsäure	Oxalsäure
Acetyl-CoA	FeSO ₄	Glyoxal	Phosphoenolpyruvat
Acetyl-P	Fructose-1,6-BP	Glyoxylat	2-Phosphoglycerat
<i>cis</i> -Aconitat	Fructose-6-P	Isocitrat	3-Phosphoglycerat
ADP	Fumarat	2-Oxoglutarat	Propionat
Aminosäure-Mix aller 20	Glukose-6-P	Malat	Pyruvat-Na
Aminosäuren	Glutamat	NAD ⁺	Succinat
	Glutamin	NADP ⁺	Succinyl-CoA

Da AcnR ein Enzym des Zentralstoffwechsels reguliert, lag die Vermutung nahe, dass ein Metabolit des Zentralstoffwechsels die DNA-Bindung von AcnR steuert. Daher wurde mit Hilfe des Gelretardations-Assays der Einfluss verschiedener Metabolite, Coenzyme, Nukleotide und anorganischer Salze auf die AcnR-Bindung an den *acn*-Promotor getestet. In Tabelle 9 sind alle Verbindungen aufgeführt, mit denen untersucht wurde, ob sie einen Shift und somit die Bindung von AcnR an den *acn*-Promotor verhindern. Hierfür wurde AcnR-C (200 nM) zunächst 20 min mit 10 - 50 mM einer Substanz in Bindepuffer inkubiert, danach das *acn*-Fragment (22,7 nM) zugegeben und der Ansatz weitere 20 min inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann wieder mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Zu einer kompletten Aufhebung der Retardation des *acn*-Fragments führten sowohl Glyoxylat (50 mM bis 25 nM) und Glykolaldehyd (50 mM bis 25 nM) als auch Glyoxal (50 mM) und Acetaldehyd (50 mM). Während Glyoxylat ein Intermediat des Glyoxylat-Zyklus darstellt, gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass Glyoxal, Glykolaldehyd und Acetaldehyd physiologische Zwischenprodukte im Stoffwechsel von *C. glutamicum* darstellen. Daher besteht die Vermutung, dass der inhibierende Effekt dieser Substanz eher auf einer unspezifischen Inaktivierung des AcnR-Proteins beruht als auf einer spezifischen Interaktion. Unter dieser Annahme konnte der Effektor von AcnR bisher nicht identifiziert werden.

2.8. Suche nach weiteren Transkriptionsregulatoren des *acn*-Gens mittels DNA-Affinitätschromatographie mit der *acn*-Promotorregion

Die bisher erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das *acn*-Gen nicht nur durch AcnR reguliert wird. Einerseits zeigte auch die $\Delta acnR$ -Mutante bei Wachstum auf Acetat, Citrat und Propionat höhere Aconitase-Aktivitäten als auf Glukose (Tabelle 8), andererseits gab es klare Hinweise auf eine Eisen-abhängige Regulation der *acn*-Expression (Abbildung 13). Außerdem wurde beschrieben, dass es 492 bp stromaufwärts des *acn*-Startcodons putative Bindemotive für den kürzlich identifizierten Transkriptionsregulator RamB gibt (Gerstmeir *et al.*, 2004). Daher wurde mittels DNA-Affinitätschromatographie versucht, weitere Transkriptionsregulatoren des Aconitase-Gens zu identifizieren. Hierfür wurde ein 632 bp großes PCR-Fragment (Position -444 bis +188 bezüglich des ersten Transkriptionsstarts) mit einem Biotin-Tag am 5'-Ende amplifiziert und an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gekoppelt. Diese wurden dann mit Proteinrohextrakten aus

C. glutamicum-Kulturen inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden spezifisch gebundene Proteine wieder mit 2 M NaCl eluiert und über SDS-Page aufgetrennt (Abbildung 22).

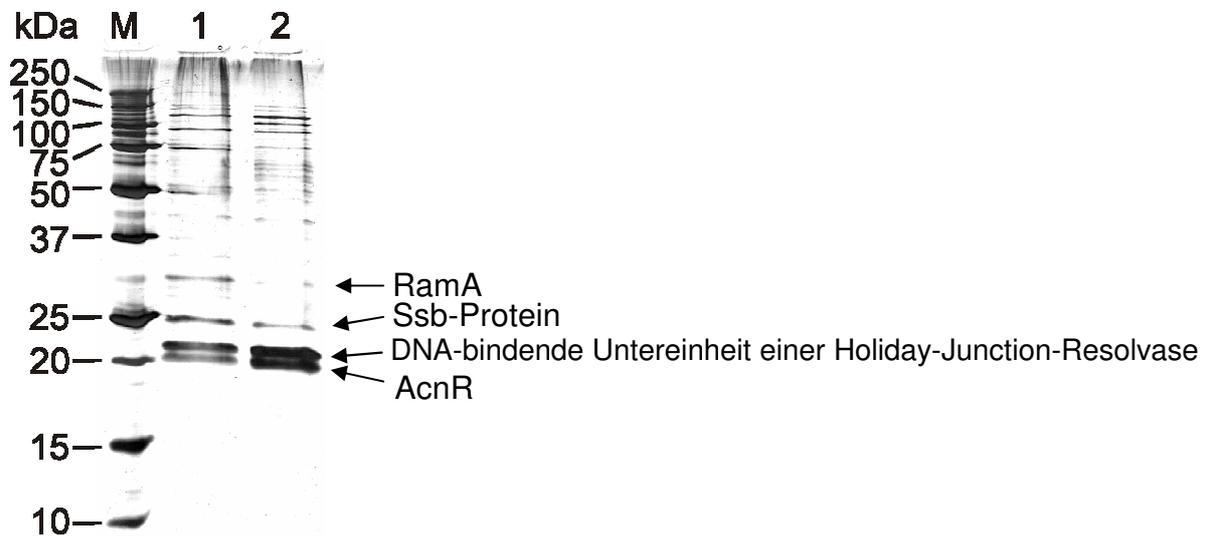


Abbildung 22: Silbergefärbtes SDS-Gel der Proteine, die durch DNA-Affinitätschromatographie mit dem *acn*-Promoterbereich aus einem Ganzzell-Proteinextrakt von *C. glutamicum* angereichert wurden. Die Biotin-getaggte *acn*-Promotorregion wurde an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gebunden und dann mit dem Zellextrakt inkubiert. Spezifisch bindende Proteine wurden mit einer hohen Salz-Konzentration eluiert und im Verhältnis 4:1 auf zwei SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie gefärbt, während das andere mit Silber gefärbt wurde. Spur 1 enthielt die eluierten Proteine des Wildtyps, der auf CgXII-Minimalmedium mit 244 mM Acetat kultiviert wurde. Spur 2 zeigt die eluierten Proteine des Wildtyps, der auf CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose kultiviert wurde.

Die Identifizierung der so erhaltenen Proteine erfolgte abschließend über MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Sowohl aus Glukose- als auch aus Acetat-gewachsenen Zellen konnte das AcnR-Protein (21,2 kDa) angereichert werden, wodurch dessen Bindung an die *acn*-Promotorregion nochmals mit einer unabhängigen Methode gezeigt sowie die Spezifität der eingesetzten Methode bestätigt werden konnte. Die Menge an AcnR-Protein, die aus Acetat-gewachsenen Zellen angereichert wurde, war deutlich geringer als die aus Glukose-gewachsenen Zellen, was mit der erhöhten Aconitase-Aktivität auf Acetat korreliert. Außer AcnR konnten noch drei weitere der angereicherten Proteine identifiziert werden, nämlich die DNA-bindende Untereinheit einer Holliday-Junction-Resolvase (NCgl1597; 21,5 kDa), das Einzelstrang-bindende Protein Ssb (NCgl2880, 23,3 kDa) sowie der Transkriptionsregulator RamA (NCgl2472; 30,8 kDa). Die beiden erstgenannten Proteine konnten sowohl aus

Glukose- als auch aus Acetat-gewachsenen Zellen angereichert werden, vermutlich weil bei der Präparation der Biotin-markierten *acn*-Promotorfragmente z.T. auch einzelsträngige DNA isoliert und dann an die Beads gebunden wurde. Im Gegensatz zu Ssb und der Resolvase-Untereinheit wurde RamA praktisch nur aus Acetat-gewachsenen Zellen angereichert. Das RamA-Protein wurde als Aktivator von Genen des Acetat-Stoffwechsels isoliert. Eine *ramA*-Deletionsmutante hingegen kann nicht mehr mit Acetat als einziger C- und Energiequelle wachsen (B. Eikmanns, Universität Ulm, persönliche Mitteilung). Daraus könnte man die Hypothese ableiten, dass die erhöhte Aconitase-Aktivität der $\Delta acnR$ -Mutante bei Wachstum auf Acetat auf eine RamA-abhängige Transkriptionsaktivierung von *acn* zurückzuführen ist. Das RamB-Protein konnte in den beschriebenen Experimenten nicht identifiziert werden.

2.9. Einfluss der Überexpression von *acnR* und *acnR*-Derivaten auf die Aconitase-Aktivität des Wildtyps und der $\Delta acnR$ -Mutante

Da die Deletion von *acnR* zu einer verstärkten *acn*-Expression führte, sollte untersucht werden, ob die Überexpression von *acnR* auch zu einer verstärkten Repression führt.

Tabelle 10: Aconitase-Aktivitäten verschiedener *C. glutamicum*-Stämme. Alle Stämme wurden in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Bei Plasmid-tragenden Stämmen wurden dem Medium 50 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG zugesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei bis sieben unabhängigen Kultivierungen dar.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Aconitase-Aktivität (U/mg _{Protein})
13032 Wildtyp	0,20 ± 0,05
13032/pEKEx2	0,24 ± 0,01
13032/pEKEx2- <i>acnR</i>	0,09 ± 0,01
13032/pEKEx2- <i>acnR</i> C-Strep	0,08 ± 0,02
13032/pEKEx2- <i>acnR</i> 60	0,24 ± 0,02
13032/pEKEx2- <i>acnR</i> 89	0,25 ± 0,01
$\Delta acnR$	1,04 ± 0,06
$\Delta acnR$ /pEKEx2	1,17 ± 0,21
$\Delta acnR$ /pEKEx2- <i>acnR</i>	0,16 ± 0,13

Aus Tabelle 10 geht hervor, dass die Überexpression des unmodifizierten *acnR*-Gens durch das Plasmid pEKEx2-*acnR* zu einer 2-fachen Abnahme der Aconitase-Aktivität führt. Eine vergleichbare Abnahme wurde auch bei Überexpression eines modifizierten *acnR*-Gens beobachtet, das für ein AcnR-Protein mit einem C-terminalem StrepTag kodierte. Dieses Ergebnis zeigte, dass der StrepTag sich nicht negativ auf die AcnR-vermittelte Repression auswirkte. Die Überexpression von zwei *acnR*-Derivaten, die für verkürzte AcnR-Derivate bestehend aus den 60 bzw. 89 N-terminalen AS-Resten kodierten, hatte keinen Einfluss auf die Aconitase-Aktivität. Daraus lässt sich folgern, dass die N-terminale DNA-Binderegion von AcnR alleine nicht ausreicht, um eine Repression der *acn*-Expression zu bewirken, sondern dass dazu auch die C-terminale Effektor-Binderegion notwendig ist. Höchstwahrscheinlich ist die C-terminale Domäne für die Dimerisierung von AcnR wichtig, wie dies schon für TetR (Hinrichs *et al.*, 1994) und QacR (Schumacher *et al.*, 2002) gezeigt wurde. Die Überexpression des unmodifizierten *acnR*-Gens in einer $\Delta acnR$ -Mutante führte dazu, dass die Aconitase-Aktivität wieder auf das Niveau des Wildtyps gesenkt wurde.

3. Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsregulators NCgl0943

Bei der vergleichenden Transkriptomanalyse (Abbildung 13) fiel ein Gen (NCgl0943) für einen Transkriptionsregulator aus der AraC/XylS-Familie auf, dessen mRNA-Konzentration bei Eisenmangel erhöht und bei Eisenüberschuss erniedrigt war. Sein Expressionsmuster verhielt sich also wie das der Eisenmangel-Gene. Um Hinweise darauf zu erhalten, welche Rolle das NCgl0943-Protein bei der Regulation des Eisenstoffwechsels spielt, wurde das entsprechende Gen deletiert und die Mutante charakterisiert.

3.1. Konstruktion und Charakterisierung einer $\Delta NCgl0943$ -Mutante

Die Konstruktion einer „*in-frame*“-*NCgl0943*-Deletionsmutante wurde nach dem bereits für *NCgl0137* und *acnR* beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Deletion wurde durch PCR-Analyse von mehreren Kan^S-Sac^R-Klonen analysiert (Abbildung 23). Dabei wurden sowohl Klone identifiziert, die dem Wildtyp

entsprachen (1987 bp-Fragment) als auch Klone mit der gewünschten Deletion (1069 bp-Fragment). Mit einem dieser Klone wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

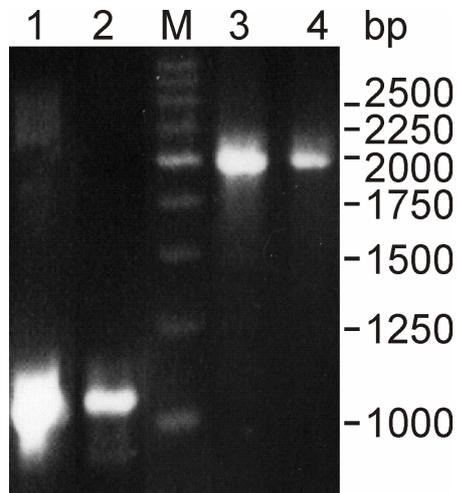


Abbildung 23: Agarosegel mit den Produkten der Kolonie-PCR von vier Kan^SSac^R-Klonen, die bei der Konstruktion einer Δ NCgl0943-Deletionsmutante erhalten wurden. Die in den Spuren 1 und 2 analysierten Klone zeigen die gewünschte Deletion (1069 bp-Fragment), während die in den Spuren 3 und 4 analysierten Klone das Wildtyp-Fragment zeigen (1987 bp).

Ein Wachstumsvergleich von Wildtyp und Δ NCgl0943-Mutante in CgXII-Minimalmedium mit Glukose und 36 μ M Eisen (die Spurensalze wurden nach dem Autoklavieren zugegeben) ergab keine Unterschiede. Daher wurden beide Stämme in CgXII-Glukose-Minimalmedium unter Eisenlimitation (1 μ M) und unter Eisenüberschuss (100 μ M) kultiviert und der Wachstumsverlauf aufgezeichnet (Abbildung 24).

Anhand des Wachstumsverlaufs ist zu erkennen, dass beide Stämme mit 100 μ M FeSO₄ keine Unterschiede im Wachstum zeigten und zu einer End-OD₆₀₀ von etwa 60 wuchsen. Bei einer Konzentration von 1 μ M FeSO₄ dagegen zeigte die Mutante ab einer OD₆₀₀ von etwa 7 ein langsames Wachstum als der Wildtyp und erreichte nur eine End-OD von 20, der Wildtyp dagegen von 40. Nach sechs Stunden wurde die Hälfte der in Abbildung 24 gezeigten Kulturen geerntet, die Gesamt-RNA präpariert und zur vergleichenden Transkriptomanalyse eingesetzt (vgl. 3.2), um nähere Hinweise zu bekommen, welchen Einfluss der Transkriptionsregulator NCgl0943 in *C. glutamicum* hat.

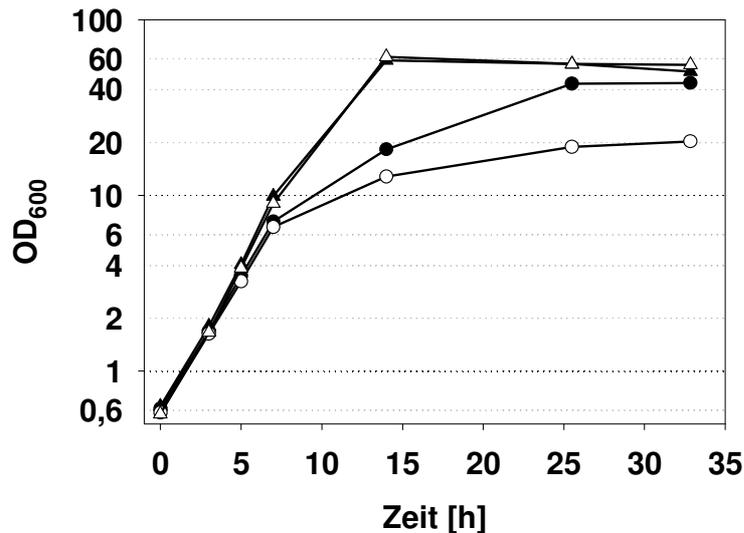


Abbildung 24: Wachstumsvergleich von Wildtyp (▲,●) und $\Delta NCgl0943$ -Mutante (△,○) auf CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose und 1 μM FeSO_4 (●,○) oder 100 μM FeSO_4 (▲,△).

3.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von Wildtyp und $\Delta NCgl0943$ -Mutante bei verschiedenen Eisenkonzentrationen

Beim Transkriptom-Vergleich von Wildtyp und $\Delta NCgl0943$ -Mutante nach Wachstum in Anwesenheit von 100 μM FeSO_4 zeigten nur wenige Gene unterschiedliche mRNA-Level. Am Auffälligsten traten die Schlüssel-Gene des Glyoxylat-Zyklus *aceA* (kodiert die Isocitrat-Lyase) und *aceB* (kodiert die Malat-Synthase) mit einem in der Mutante 3-fach höheren Level in Erscheinung. Keines der beim Vergleich von Wildtyp und $\Delta acnR$ -Mutante (vgl. 2.4.2; Experimentenreihe: A, C und D) auffälligen Gene für Eisen-enthaltende Proteine oder Eisenmangel-Proteine trat in Erscheinung. Dies war auch beim Vergleich von Wildtyp und $\Delta acnR$ nach Wachstum in Anwesenheit von 100 bzw. 500 μM FeSO_4 der Fall (vgl. 2.4.2; Experimentenreihe: B). Der Transkriptom-Vergleich von $\Delta NCgl0943$ -Mutante und Wildtyp nach Wachstum unter Eisenlimitierung (1 μM FeSO_4) zeigte hingegen ein völlig anderes Expressionsmuster. Nahezu alle Gene, die in der Mutante einen mehr als zweifach erhöhten mRNA-Level zeigten, kodieren für Eisen-enthaltende Proteine wie Aconitase, Succinat-Dehydrogenase, Nitrat-Reduktase, Katalase, Isopropylmalat-Dehydratase und Catechol-1,2-dioxygenase (vgl. 2.4.2). Die Eisenmangel-Gene zeigten dagegen gleiche mRNA-Level. Da beide Stämme unter Eisenmangel kultiviert wurden, macht eine erhöhte Expression von Genen für Eisen-enthaltende Proteine in der Mutante physiologisch wenig Sinn. Daher liegt die Vermutung nahe,

dass es sich bei NCgl0943 um einen Repressor handelt, der bei Eisen-Mangel die Expression dieser Gene unterdrückt. Neben den Genen für Eisen-haltige Proteine waren auch die Gene *aceA* und *aceB* in der Δ NCgl0943-Mutante wieder etwa 3-fach erhöht. Neben den Genen mit erhöhtem mRNA-Level in der Mutante gab es auch viele mit im Vergleich zum Wildtyp erniedrigtem mRNA-Level. Allerdings handelte es sich dabei meist um unbekannte bzw. nicht mit Eisen im Zusammenhang stehende Proteine.

4. Einfluss von *acn*-Deletion und *acn*-Überexpression in *C. glutamicum*

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Aconitase-Aktivität in *C. glutamicum* durch Deletion oder Überexpression von *acnR* gesteigert bzw. verringert werden kann. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob es auch möglich ist, die Aktivität der Aconitase und damit den Fluss durch den TCA-Zyklus ganz auszuschalten.

4.1. Konstruktion und Charakterisierung einer Δ *acn*-Mutante

Da *C. glutamicum* nur ein einziges Aconitase-Gen enthält, wurde erwartet, dass seine Deletion zu einer Glutamat-Auxotrophie führt. Daher wurde bei der Konstruktion der *acn*-Deletionsmutante das Medium mit Glutamat supplementiert (Craig *et al.*, 1997).

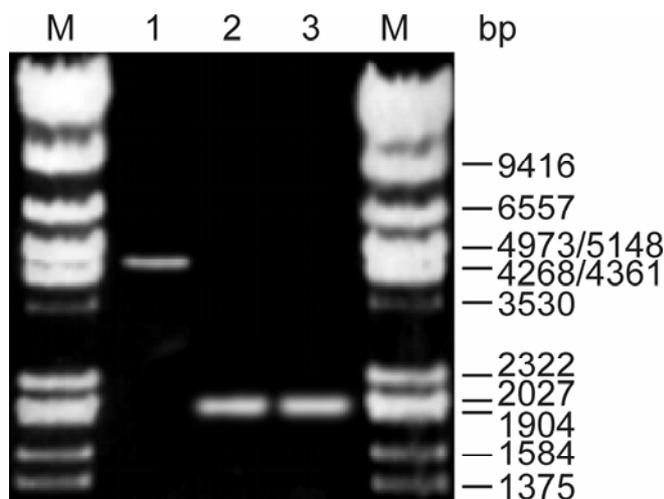


Abbildung 25: Agarosegel mit den Produkten der Kolonie-PCR von vier Kan^SSac^R-Klonen, die bei der Konstruktion einer Δ *acn*-Deletionsmutante erhalten wurden. Der in Spur 1 analysierte Klon zeigt das Wildtyp-Fragment (4831 bp). Die in den Spuren 2 - 4 analysierten Klone zeigen die gewünschte Deletion (2074 bp-Fragment).

Die erfolgreiche Konstruktion der Deletion zeigt sich anhand der Kolonie-PCR von Kan^S-Sac^R-Klonen, bei der neben Wildtyp-Fragmenten (4831 bp) auch solche mit einer Größe von 2074 bp auftraten, die bei Deletion des *acn*-Gens erwartet wurden (Abbildung 25).

4.2. Einfluss auf Wachstum und Aconitase-Aktivität

Um die erwartete Glutamat-Auxotrophie und das Wachstumverhalten der Δacn -Mutante zu testen, wurde der Stamm mehrfach mit verschiedenen Glutamat-Konzentrationen in CGXII-Medium mit 222 mM Glukose kultiviert. Repräsentative Wachstumskurven sind in Abbildung 26 dargestellt.

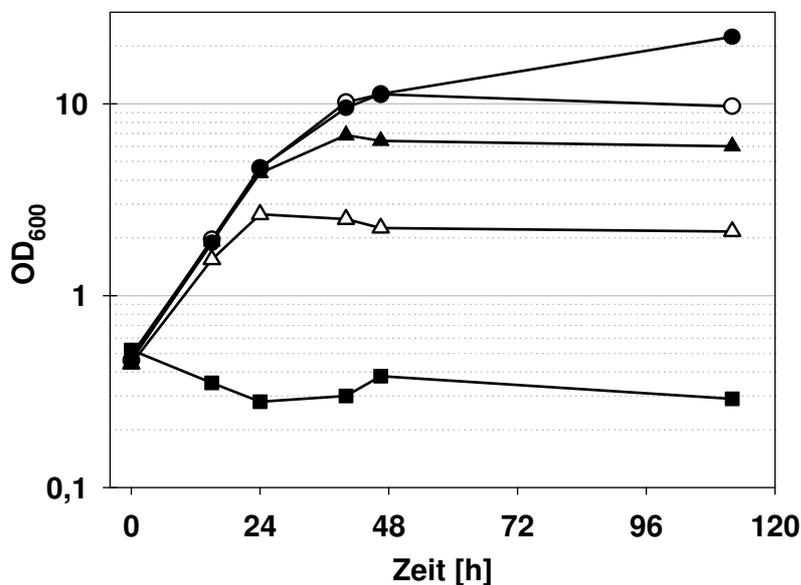


Abbildung 26: Wachstum von *C. glutamicum* 13032 Δacn in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose und verschiedenen Glutamat-Konzentrationen: 0 mM (■); 5 mM (△); 20 mM (▲); 40 mM (○); 100 mM (●).

Anhand der Wachstumsverläufe ist deutlich zu erkennen, dass ohne Glutamat kein Wachstum möglich ist und die Kultur abstirbt. Mit steigenden Glutamat-Konzentrationen steigt auch die erreichte maximale optische Dichte bis zu einer OD₆₀₀ von 21 bei 100 mM Glutamat an. Die maximale Wachstumsrate, die ab 20 mM Glutamat erreicht wird, ist gegenüber dem Wildtyp etwa 4-fach auf $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ reduziert. Für weitere Experimente wurde die Deletionsmutante mit einer Konzentration von 30 mM Glutamat supplementiert. Die Aconitase-Aktivitäten wurden außer in der Deletionsmutante auch in anderen Stämmen bestimmt. Zum einen wurde das *acn*-Gen mit dem Vektor pEKEx2 unter Kontrolle des *tac*-Promotors

und unter Verwendung der Ribosomenbindungsstelle (RBS) des T710-Gens im Wildtyp überexprimiert und zum anderen wurde mit diesem Plasmid (pEKEx2-*acn*) die *acn*-Deletionsmutante komplementiert.

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Es ist erkennbar, dass die Δacn -Mutante noch eine Restaktivität von ca. 5 % der Wildtyp-Aktivität besitzt. Da diese Restaktivität jedoch unabhängig von der eingesetzten Menge an Rohextrakt war, handelt es sich dabei vermutlich nicht um eine Enzym-katalysierte Aktivität.

Tabelle 11: Aconitase-Aktivitäten verschiedener *C. glutamicum*-Stämme. Alle Stämme wurden in CgXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Bei Plasmid-tragenden Stämmen wurde dem Medium 50 µg/ml Kanamycin und bei der *acn*-Deletionsmutante 30 mM L-Glutamat zugesetzt. Die Induktion des *acn*-Gens im Plasmid pEKEx2-*acn* erfolgte mit 1 mM IPTG.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Aconitase-Aktivität (U/mg _{Protein})
13032 Δacn	0,014 ± 0,002
13032/pEKEx2 +IPTG	0,23 ± 0,01
13032/pEKEx2- <i>acn</i> -IPTG	0,44
13032/pEKEx2- <i>acn</i> +IPTG	4,33 ± 0,23
13032 Δacn /pEKEx2- <i>acn</i> -IPTG	0,19
13032 Δacn /pEKEx2- <i>acn</i> +IPTG	2,44 ± 0,37

Das Ergebnis bestätigt somit die Genom-basierte Annahme, dass *C. glutamicum* nur ein einziges Aconitase-Gen besitzt. Die Überexpression des *acn*-Gens führte zu einer fast 20-fachen Steigerung der Aktivität, wenn die Expression mit 1 mM IPTG induziert wurde. Ohne Induktion war die Aktivität gegenüber dem Wildtyp 2-fach erhöht. Die Komplementation der *acn*-Deletionsmutante mit dem Plasmid pEKEx2-*acn* war erfolgreich, da der resultierende Stamm nicht mehr Glutamat-auxotroph war. Bei Kultivierung mit 1 mM IPTG erreichte der komplementierte Stamm die 10-fache Aconitase-Aktivität des Wildtyps. Das deutlich schlechtere Wachstum konnte durch die Komplementation jedoch überraschenderweise nicht aufgehoben werden.

4.3. Vergleichende Transkriptomanalyse

Um den Einfluss der Aconitase auf Transkriptomebene zu untersuchen, wurden zwei Serien von DNA-Chip-Experimenten durchgeführt. Zum einen wurde die *acn*-

Deletionsmutante mit dem Wildtyp verglichen und zum anderen der *acn*-überexprimierende Stamm (13032/pEKEx2-*acn*) mit dem entsprechenden Wildtyp (13032/pEKEx2).

4.3.1. Transkriptomvergleich von Δacn -Mutante und Wildtyp

Beim Vergleich der mRNA-Level von *acn*-Deletionsmutante und Wildtyp (Tabelle 12) fiel auf, dass sich die sechs Experimente zum Teil sehr stark voneinander unterscheiden. In zwei Experimenten gab es eine Vielzahl (75 % aller auswertbaren) von Genen mit erhöhtem RNA-Level in der Mutante vermutlich aufgrund der schlechten Markierung der Wildtyp-cDNA mit Cy3. In zwei anderen Experimenten zeigten die Plasmide pEKEx2 und pXMJ19, die ebenfalls auf dem DNA-Chip vorhanden waren, erhöhte Level in der Mutante. Da keiner der beiden verglichenen Stämme ein Plasmid enthalten sollte, ist es wahrscheinlich, dass die Stämme oder die entsprechenden RNA-Präparationen mit plasmidtragenden Stämmen vertauscht wurden. Aus diesem Grund wurden die beiden Experimente nicht in die Zusammenfassung mit einbezogen und die Auswahlkriterien aufgrund der schwachen Markierung der Wildtyp-cDNA mit Cy3 in zwei Experimenten auf dreifache Veränderung des mRNA-Spiegels erhöht.

Anhand der Zusammenstellung von Tabelle 12 wird deutlich, dass lediglich drei Gene in der Δacn -Mutante einen deutlich verringerten mRNA-Level zeigen, nämlich das *acn*-Gen, das Gen für eine Fettsäure-Synthetase und das Gen einer Zuckerphosphat-Transferase. Im Gegensatz dazu zeigten viele Gene einen erhöhten mRNA-Level in der Mutante, was zum Teil auf zwei der vier Experimente zurückzuführen ist (s.o.). In der Mutante zeigten sowohl das Phosphotransacetylase-Gen *pta* (*NCgl2657*) als auch das Isocitrat-Lyase-Gen *aceA* (*NCgl2248*) deutlich erhöhte mRNA-Level von 11 bzw. 12 (Δacn /WT). Sowohl *aceA* als auch das zweite spezifische Gen des Glyoxylat-Zyklus, das Malat-Synthase-Gen *aceB* (*NCgl2247*), waren in nur einem bzw. keinem der Experimente auswertbar. Ursache dafür ist das PCR-Produkt auf den DNA-Chips, welches in diesen und auch vielen anderen Experimenten zu schwachen Hybridisierungssignalen führt.

Eigentlich entsprach das *aceA*-Gen nicht den Auswahlkriterien. Jedoch zeigte auch der mRNA-Level von ORF3093 (liegt zwischen *NCgl2248* und *NCgl2247*) ein erhöhtes mRNA-Verhältnis. ORF3093 ist in gleicher Richtung wie das *aceA*-Gen

orientiert. Das PCR-Produkt zu ORF3093 auf dem DNA-Chip ist nur 24 bp vom Translationsstart der *aceA*-Gens entfernt. Zudem liegen die Transkriptionsstarts von *aceA* und *aceB* in der kodierenden Sequenz von ORF3093. Der Transkriptionsstart von *aceA* liegt 112 bp stromaufwärts vom Translationsstart. Der Transkriptionsstart von *aceB* hingegen liegt 466 bp stromaufwärts vom Translationsstart entfernt (Gerstmeir *et al.*, 2004). Es ist also eindeutig, dass sowohl das Transkript zu *aceA* als auch zu *aceB* sich mit der Sequenz von ORF3093 überlappen und es so zu einer Hybridisierung der cDNA`s von *aceA* und *aceB* mit dem PCR-Produkt von ORF3093 kommt. Daher entspricht das mRNA-Verhältnis von ORF3093 in etwa dem mRNA-Verhältnis der beiden Gene *aceA* und *aceB*.

Tabelle 12: Gene mit signifikant erhöhten (≥ 3) oder erniedrigten ($\leq 0,33$) RNA-Verhältnissen¹ beim Transkriptomvergleich von Δacn -Mutante und Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase (OD600 = 4 - 6). Es wurden nur solche Gene berücksichtigt, für die sicher messbare (Signal / Rausch-Verhältnis ≥ 3) und signifikante ($p < 0,05 = *$ and $p < 0,005 = **$) Werte bestimmt wurden.

<i>C. g.</i> 13032 Δacn
<i>C. g.</i> 13032 Wildtyp

NCgl ²	ORF ³	Gene - annotierte Funktionen	Mittel	n	p
1482	5003	<i>acn</i> - Aconitase	0,03	4	**
0802	1388	Fettsäure-Synthase	0,30	2	*
2553	3735	put. Zuckerphosphat-Transferase-Untereinheit	0,31	2	*
1142	1786	<i>narG</i> - Nitratreduktase, α -Untereinheit	3,02	2	*
1921	2100	<i>chID</i> - put. Magnesium-Chelatase-Untereinheit	3,08	2	*
0800	1384	hypothetisches Protein	3,15	3	*
0454	956	put. 3-Demethyl-Ubichinon 3-Methyltransferase	3,18	2	*
1756	3673	hypothetisches Protein	3,35	2	**
1021	1644	Transposase	3,37	4	**
1250-1251	2754	hypothetisches Protein	3,42	3	**
2249	3091	put. Thiamin-Biosynthese Protein	3,78	4	**
1064	1690	put. Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase	3,81	2	*
2252-2253	3085	hypothetisches Protein	3,87	3	**
1923	2102	put. Uroporphyrin-III-C-Methyltransferase	3,89	2	*
2656	121	<i>ack</i> - Acetat-Kinase	4,35	1	
2709	189	put. Alkohol-Dehydrogenase	4,53	2	*
2246	3095	hypothetisches Protein	5,06	3	*
2248-2247	3093	(Malat-Synthase / Isocitrat-Lyase)	5,07	4	**
2657	122	<i>pta</i> - Phosphotransacetylase	11,02	4	**
2248	3092	<i>aceA</i> - Isocitrat-Lyase	(11,94)	1	

¹ hierbei handelt es sich um die Mittelwerte des Quotienten der Mediane

² NCBI-Annotation (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=232>)

³ Biomax-Annotation (nicht öffentlich zugänglich)

Der mRNA-Level des Acetat-Kinase-Gens *ack* war ebenfalls nur in einem der vier Experimente auswertbar. In diesem war der mRNA-Level aber deutlich erhöht (4,4). Die von Phosphotransacetylase, Acetat-Kinase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase katalysierten Reaktionen stehen im Zusammenhang mit Acetyl-CoA. Aufgrund der Deletion des *acn*-Gens ist es wahrscheinlich, dass es zu einem Anstau an Acetyl-CoA in der Zelle kommt, der möglicherweise die verstärkte Expression von *pta*, *ackA*, *aceA* und *aceB* auslöst.

4.3.2. Transkriptom-Vergleich von *acn*-Überexprimierer und Wildtyp

In Tabelle 13 (Gesamtliste im Anhang Tabelle 15) sind die Gene des Vergleichs von 13032/pEKEx2-*acn* und 13032/pEKEx2 zusammengefasst, welche signifikant veränderte mRNA-Verhältnisse zeigten. Die Daten stammen aus sechs DNA-Chip-Experimenten mit der RNA aus drei unabhängigen Kultivierungen in CGXII-Minimalmedium mit 222 mM Glukose, 50 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG.

Tabelle 13: Gene mit signifikant erhöhten (≥ 3) oder erniedrigten ($\leq 0,33$) RNA-Verhältnissen¹ beim Transkriptomvergleich von 13032/pEKEx2-*acn* und 13032/pEKEx2 in der exponentiellen Wachstumsphase (OD600 = 4 - 6). Es wurden nur solche Gene berücksichtigt, für die sicher messbare (Signal / Rausch-Verhältnis ≥ 3) und signifikante ($p < 0,05 = *$ and $p < 0,005 = **$) Werte bestimmt wurden.

C. g. 13032/pEKEx2-*acn*

C. g. 13032/pEKEx2

NCgl ²	ORF ³	Gene - annotierte Funktionen	Mittel	n	p
0752	1313	Membranprotein	0,11	3	**
2657	122	<i>pta</i> - Phosphotransacetylase	0,34	6	**
0774	1347	put. Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	3,00	5	**
0381	3543	put. Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein	3,45	3	*
0639	1173	put. Eisen-reguliertes Lipoprotein	3,66	5	**
1646	3347	put. sekretierte Hydrolase	3,83	6	**
0482	3549	put. Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase	3,90	6	**
2970	3458	put. Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	4,35	6	**
0773	1346	put. Siderophor-interagierendes Protein	4,60	6	**
1482	2425	<i>acn</i> - Aconitase	5,70	6	**
1482	5003	<i>acn</i> - Aconitase, zweites <i>acn</i> -PCR-Produkt auf Chip	28,41	6	**

¹ hierbei handelt es sich um die Mittelwerte des Quotienten der Mediane

² NCBI-Annotation (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=232>)

³ Biomax-Annotation (nicht öffentlich zugänglich)

Im Gegensatz zum Vergleich von Δacn -Mutante und Wildtyp zeigten dabei alle sechs Experimente vergleichbare Ergebnisse. Wie erwartet war der *acn*-mRNA-Level

in dem Stamm mit dem *acn*-Expressionsplasmid deutlich erhöht. Auffällig ist allerdings, dass die beiden *acn*-Sonden auf dem verwendeten DNA-Chip zu stark unterschiedlichen Werten führten (5,7 vs. 28,4). Zwei mögliche Erklärungen hierfür sind eine erhöhte Konzentration des zweiten *acn*-Genproduktes auf dem Chip und die Tatsache, dass das zweite *acn*-Genprodukt das komplette *acn*-Gen von 2,83 kb umfasst und das erste dagegen nur 0,47 kb. Bei den meisten Genen, die einen erhöhten mRNA-Level im Überexprimierer zeigten, handelt es sich um Eisenmangel-Gene, die schon aus dem Transkriptomvergleich von $\Delta acnR$ -Mutante und Wildtyp (vgl. 2.4.2) bekannt waren. Da die Aconitase-Aktivität im *acn*-Überexprimierer 13032/pEKEEx2-*acn* 19-fach höher war (4,33 U/mg_{Protein}) als im Vergleichsstamm 13032/pEKEEx2 (0,23 U/mg_{Protein}), liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Aconitase-Synthese zu Eisenmangel und zur Induktion der Eisenmangel-Antwort führte. Dafür spricht auch die Tatsache, dass viele Gene für Eisen-haltige Proteine einen etwa 2-fach verringerten mRNA-Level zeigten (siehe Tabelle 15 im Anhang). Einen deutlich verringerten mRNA-Level im *acn*-Überexprimierer zeigten das Phosphotransacetylase-Gen *pta* sowie das *NCgl0752*-Gen für ein Membranprotein mit unbekannter Funktion. Der veränderte *pta*-mRNA-Level deckt sich mit den Ergebnissen des Vergleichs von Δacn -Mutante und Wildtyp. Beim Stamm mit erhöhter *acn*-Expression (dort Wildtyp, hier Überexprimierer) ist die Expression des *pta*-Gens reduziert. Die Glyoxylat-Zyklus-Gene *aceA* und *aceB* zeigten hingegen keine Veränderung in ihrer Expression.

V. DISKUSSION

1. Einfluss der Valin-Bildung auf die globale Genexpression

Durch genomumfassende Expressionsanalysen von verschiedenen Valin-produzierenden *C. glutamicum*-Stämmen sollten Gene identifiziert werden, die aufgrund der Valin-Bildung signifikant verändert sind. Der Vergleich der Stämme 13032/pJC1*ilvBNCD* mit 13032/pJC1 und VAL1 mit 13032 Δ *panBC* Δ *ilvA*/pJC1 in der frühen exponentiellen Phase zeigte, dass neben den Valin-Biosynthese-Genen, welche plasmidkodiert überexprimiert wurden, nur fünf weitere Gene einen veränderten mRNA-Level aufwiesen. Einen reduzierten mRNA-Level in dem Valin-Produzenten 13032/pJC1*ilvBNCD* zeigten die Gene für ein putatives Ribose-Transport-Protein (*rbsC*), eine ATP-abhängige DNA-Helikase (*recG*) sowie das Eisenspeicher-Protein Ferritin (*ftn*). In selbigem Stamm wies eine putative Integrase (*NCgl1816*) einen erhöhten mRNA-Level auf. Das Gen *NCgl0137*, das für einen putativen Transporter kodiert, zeigte nur beim Vergleich des Stammpaares mit den Deletionen von *ilvA* und *panBC* ein erhöhtes mRNA-Verhältnis im Stamm VAL1. Der Einfluss dieses putativen Transporters auf die Valin-Bildung wurde durch Deletion und Überexpression von *NCgl0137* in verschiedenen Stamm-Hintergründen untersucht. Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen, so dass das *NCgl0137*-Protein für die Valin-Bildung keine Bedeutung besitzt. Ob das Protein eine Funktion beim Transport von Isoleucin und Pantothenat spielt, wurde nicht getestet.

Da die externe L-Valin-Konzentration zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung für die oben diskutierten Transkriptom-Vergleiche maximal 2 mM betrug, wurde eine zweite Serie von genomumfassenden Expressionsanalysen durchgeführt. Dabei erfolgte die Isolierung der RNA beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die beiden Stämme 13032 Δ *panBC* Δ *ilvA*/pJC1*ilvBNCD* und 13032 Δ *panBC* Δ *ilvA*/pJC1 jedoch eine sehr unterschiedliche Wachstumsrate ($\Delta\mu \geq 0,1 \text{ h}^{-1}$). Aufgrund von früheren Expressionsanalysen ist bekannt, dass größere Wachstumsdifferenzen (Unterschiede in der Wachstumsrate von mehr als $0,1 \text{ h}^{-1}$ oder Unterschiede in der optischen Dichte von mehr als OD 5) eine Bestimmung von spezifischen Expressionsveränderungen die nicht auf Wachstumseffekten beruhen, nahezu ausgeschlossen sind. Daher wurden nur die beiden Stämme 13032/pJC1*ilvBNCD* und 13032/pJC1 miteinander verglichen. Zum Zeitpunkt der

RNA-Isolierung lag die gebildete Menge an Valin im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* bei ca. 20 mM, während sie im Stamm 13032/pJC1 ≤ 1 mM betrug. Auch hier zeigten die plasmidkodiert überexprimierten Gene der Valin-Biosynthese die erwarteten erhöhten mRNA-Level im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD*. Im Gegensatz zum ersten Vergleich (zu Beginn der exponentiellen Phase) zeigte jedoch eine Vielzahl an Genen einen veränderten mRNA-Level. Unter diesen waren auch die Gene des TCA-Zyklus und der ATP-Synthase, die im Nicht-Produzenten 13032/pJC1 eine 2- bis 3-fach höhere mRNA-Konzentration zeigten. Da die Synthese von L-Valin von zwei Molekülen Pyruvat ausgeht, könnte es aufgrund der höheren Valin-Bildung im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* zu einem verringerten Fluss durch den TCA-Zyklus kommen, da nicht mehr so viel Pyruvat für die oxidative Decarboxylierung zur Verfügung steht. Da jedoch auch einige Gene der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weges eine 2- bis 3-fach erhöhte mRNA-Konzentration im Stamm 13032/pJC1 aufwiesen, scheint der gesamte Stofffluss im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* gegenüber 13032/pJC1 reduziert zu sein. Eine mögliche Begründung hierfür ist, dass zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung der Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD* schon die Umstellung des Stoffwechsels auf die stationäre Phase vollzogen hat, während der Stamm 13032/pJC1 noch exponentiell wächst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen für die Transkriptom-Vergleiche von Valin-Produzenten und Nicht-Valin-Produzenten keine potentiellen Zielgene zur Verbesserung der L-Valin-Bildung identifiziert wurden. Aufgrund des erhöhten Flusses von Pyruvat in Richtung Valin-Biosynthese hätte man eventuell Änderungen der Expression der Gene für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex und/oder der Gene *brnFE* für den Valin-Export erwartet, die jedoch nicht auftraten. Möglicherweise waren die externen Valin-Konzentrationen in den Kulturüberständen zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung zu gering (maximal 20 mM im Stamm 13032/pJC1*ilvBNCD*), um bereits signifikante Genexpressionsänderungen auszulösen. Alternativ könnte es aber auch in den verglichenen Stämmen keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression unabhängig von der externen Valin-Konzentration geben. Vielleicht wäre es bei zukünftigen Vergleichen dieser Art sinnvoll, die Kultivierungen nicht im Schüttelkolben sondern im Fermenter unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen, um besser definierte Wachstumsbedingungen, höhere Valin-Titer und eventuell höhere spezifische Valin-Produktionsraten zu erreichen. Die RNA sollte

dann auch zu einem späteren Zeitpunkt der Fermentation analysiert werden. Außerdem sollten Proteom-, Stofffluss- und Metabolom-Analysen ergänzt werden, um ein umfassenderes Bild zu erhalten, das sich nicht nur auf die mRNA-Spiegel beschränkt.

2. Charakterisierung von AcnR und Einfluss auf die *acn*-Expression

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Regulation der Aconitase führten zur Identifizierung des ersten Regulators eines Gens des TCA-Zyklus in *C. glutamicum*. Das AcnR-Protein, dessen Gen direkt stromabwärts des Aconitase-Gens (*acn*) liegt, wurde als Repressor der *acn*-Expression charakterisiert, da die Deletion von *acnR* zu einem fünffachen Anstieg des *acn*-mRNA-Levels und der Aconitase-Aktivität führte. Die Interaktion zwischen AcnR und dem *acn*-Promotor konnte dabei sowohl durch Gelretardations-Experimente als auch durch DNase I-Footprints mit dem gereinigten AcnR-Protein nachgewiesen werden. Hierbei wurde auf dem kodierenden Strang die Region von -11- bis -28 relativ zum ersten Transkriptionsstartpunkt als AcnR-Bindestelle identifiziert. AcnR blockiert somit vermutlich die Bindungsstelle der RNA-Polymerase. Die durch AcnR vor DNase I-Verdau geschützten Bereiche auf dem nicht-kodierenden Strang umfassten nur drei Basen (Position -18 bis -20). Da dies sowohl für AcnR mit einem N-terminalen StrepTag als auch für AcnR mit einem C-terminalen StrepTag der Fall war, sind sterische Behinderungen der AcnR-DNA-Interaktion durch den Strep-Tag unwahrscheinlich. Die fast nur einseitige Bindung von AcnR an die DNA könnte daher spezifisch sein und könnte durch Kristallisationsversuche von AcnR untersucht werden. Bei TetR (Hillen *et al.*, 1984), EthR (Engohang-Ndong *et al.*, 2004) und QacR (Grkovic *et al.*, 1998) hingegen wurden jeweils beide DNA-Stränge gleichermaßen vor DNase I-Abbau geschützt.

Beim Vergleich der experimentell bestimmten Sequenz der AcnR-Bindestelle im *acn*-Promotorbereich (CAGAACGCTTGTACTG) mit den Promotor-Regionen der *acn*-Gene weiterer Spezies der Gattungen *Corynebacterium* und *Mycobacterium* wurde eine putative 16 bp-lange Konsensus-Sequenz (CAGNACnnnnGTACTG) mit einer unvollständigen invertierten Wiederholung identifiziert, die in allen Spezies vorkommt, wobei die Abstände zum Startcodon variieren. Da auch alle Spezies mit Ausnahme von *M. leprae* ein intaktes *acnR*-Ortholog besitzen, liegt die Vermutung

nahe, dass der für *C. glutamicum* etablierte AcnR-Regulationsmechanismus auch für andere Corynebakterien und Mycobakterien gilt.

Die Untersuchung des *C. glutamicum*-Genoms offenbarte, dass das o.g. Sequenzmotiv nur dreimal im gesamten Genom vorhanden ist. Zum einen befindet es sich innerhalb des *acn*-Promotors und zum anderen innerhalb der kodierenden Bereiche der Gene für das ribosomale Protein L31 (*NCgl0837*) und eines Proteins mit unbekannter Funktion (*NCgl2128*). Dies unterstützt das durch vergleichende Transkriptomanalyse von $\Delta acnR$ -Mutante und Wildtyp gewonnenen Resultat, dass *acn* das einzige Ziel-Gen von AcnR in *C. glutamicum* ist. Bei diesen Untersuchungen zeigte nur das *acn*-Gen einen reproduzierbaren mehr als dreifach erhöhten mRNA-Level in der $\Delta acnR$ -Mutante.

AcnR gehört aufgrund eines für TetR-Typ-Regulatoren typischen Helix-Turn-Helix-Motivs (DNA-Bindemotiv) in der N-terminalen Hälfte (siehe Abbildung 7) zur Familie dieser Regulatoren. Die Analyse der gereinigten AcnR-Derivate durch Gelfiltration ergab, dass AcnR ein Dimer bildet. Diese Dimerisierung basiert vermutlich auf der Interaktion der C-terminalen Domänen und ist für die Bindung an DNA wahrscheinlich essentiell, da AcnR-Derivate mit fehlender C-terminaler Domäne keinen Effekt auf die Aconitase-Aktivität besaßen. Vermutlich bindet je eines der AcnR-Monomere an eine Hälfte des „inverted repeat“ in dem 18 bp-langen AcnR-Operator. Auch für andere Vertreter der TetR-Familie wurde gezeigt, dass sie als Dimere an die DNA binden z.B. TetR an einen 15 bp langen Operator (Hinrichs *et al.*, 1994). Im Fall von QacR binden zwei Dimere an einen 36 bp umfassenden Operator (Grkovic *et al.*, 2001). EthR, ein Repressor aus Mycobakterien, bildet hingegen ein Oktamer um den Operator und weist eine 55 bp große Bindestelle auf (Engohang-Ndong *et al.*, 2004). Für AmtR aus *C. glutamicum*, einen globalen Repressor der Stickstoff-Regulation, ist ebenfalls ein 16 bp langes Bindemotiv beschrieben (Jakoby *et al.*, 2000).

Die plasmidkodierte Überexpression des *acnR*-Gens unter Kontrolle des *tac*-Promotors führte bei Kultivierung auf CgXII-Minimalmedium mit Glukose zu einer zweifachen Reduzierung der Aconitase-Aktivität. Frühere Experimente zur Überexpression anderer Gene mit dem Vektor pEKEx2 unter den gleichen Kultivierungsbedingungen ergaben meist eine mehr als 10-fache Überexpression (z.B. *acn* 20-fach). Eine mögliche Erklärung für die nur zweifache Reduzierung der Aconitase-Aktivität bei *acnR*-Überexpression bietet die Annahme, dass es durch die

verringerte Aktivität der Aconitase zum Anstieg der Konzentration eines Metaboliten in der Zelle kommt. Dieser könnte dafür verantwortlich sein, dass der AcnR-Operator-Komplex dissoziiert und somit einer erhöhten Repression von *acn* entgegenwirkt. Ein solcher Mechanismus würde sicherstellen, dass die Aktivität der Aconitase nie komplett durch AcnR reprimiert wird, da dies für die Zelle schädlich wäre. Zur Identifizierung solch eines Metaboliten wurden Gelretardationsexperimente mit AcnR, der *acn*-Promotorregion und verschiedenen Metaboliten des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus durchgeführt. Hierbei zeigte Glyoxylat in Konzentrationen von 50 mM bis 25 nM eine Aufhebung der Retardation durch AcnR. Da dieser Effekt aber auch auf eine Inaktivierung des Proteins durch Reaktion der Aldehyd-Gruppe mit primären Aminen hervorgerufen werden könnte, wurden weitere Substanzen mit einer Aldehyd-Gruppe untersucht. Auch Glyoxal, Acetaldehyd und Glykolaldehyd sorgten in Konzentrationen von 50 mM für eine Aufhebung der Retardation. Eine Konzentrationsreihe von Glykolaldehyd (von 50 mM bis 25 nM) zeigte das gleiche Verhalten wie Glyoxylat bei diesen Retardationsexperimenten. Dies deutet darauf hin, dass die Effekte der vier Substanzen auf der Reaktivität der Aldehyd-Gruppen beruhen und nicht auf einer spezifischen, nicht-kovalenten Bindung an AcnR. Die Frage nach dem Liganden, der die Repressor-Aktivität von AcnR steuert, bleibt also noch ungeklärt. Zur Identifizierung eines Effektors könnte man proteinfreie Extrakte chromatographisch (z.B. nach Ladung oder Hydrophobizität) auftrennen und überprüfen, welche Fraktionen die Retardation hemmen. Die Substanzen in diesen Fraktionen könnten dann z.B. durch NMR oder Massenspektrometrie identifiziert werden.

Für andere TetR-Typ-Regulatoren konnte gezeigt werden, dass verschiedenste niedermolekulare Substanzen als Effektoren fungieren können. Bei TetR sind es Tetracycline (Hinrichs *et al.*, 1994), bei QacR, einem Repressor der „Multidrug“-Exportpumpe QacA aus *Staphylococcus aureus*, eine Vielzahl lipophiler Substanzen aus vier verschiedenen chemischen Klassen: monovalente Farbstoffe wie Ethidiumbromid, Biguanidine, Diamidine oder quaternäre Ammoniumverbindungen (Grkovic *et al.*, 1998). Wahrscheinlich handelt es sich bei den Effektoren vieler anderer TetR-Typ-Regulatoren auch um Antibiotika, da viele dieser Regulatoren in Verbindung mit Antibiotika-Resistenzen (z.B. TetR; CamR (Aramaki *et al.*, 1993), TcmR (Guilfoile & Hutchinson, 1992) und SmeT (Guilfoile & Hutchinson, 1992)) stehen. Andere hingegen sind an der Regulation der Biofilm-Bildung beteiligt (IcaR,

(Conlon *et al.*, 2002)) oder aktivieren Sigma-Faktoren (*rpoS*) in der stationären Phase (PsrA, (Kojic *et al.*, 2002)). Auch in *C. glutamicum* wurden bereits zwei TetR-Typ-Regulatoren charakterisiert. AmtR ist an der Stickstoff-Regulation beteiligt (Jakoby *et al.*, 2000) und McbR an der Regulation des Stoffwechsels zur Synthese von schwefelhaltigen Aminosäuren (Rey *et al.*, 2003). Ein TetR-Typ-Regulator, der an der *acn*-Expression beteiligt ist, war bisher jedoch unbekannt.

3. Einfluss von Eisen auf die *acn*-Expression

DNA-Chip-Experimente mit $\Delta acnR$ -Mutante und Wildtyp unter verschiedenen Eisenkonzentrationen zeigten, dass der *acn*-mRNA-Level unter Eisenüberschuss höher als unter Eisenmangel ist. Eine Regulation der Aconitase durch die Eisenverfügbarkeit wurde auch bei *M. tuberculosis* beobachtet (Wong *et al.*, 1999). Neben dem *acn*-Gen zeigten noch andere Gene (*sdhAB*, *narIH*, *kata*, *leuD* und weitere), die für Eisen-enthaltende Proteine kodieren, einen erhöhten mRNA-Level unter Eisenüberschuss. Zudem zeigte neben den Eisen-Aufnahmesystemen ein putativer Transkriptionsregulator der AraC/XylS-Familie (*NCgl0943*) ein verringertes mRNA-Verhältnis unter Eisenüberschuss. DNA-Chip-Experimente mit einer *NCgl0943*-Deletionsmutante und dem Wildtyp unter Eisenüberschuss und unter Eisenmangel deuten daraufhin, dass es sich bei *NCgl0943* um einen Repressor von Eisen-enthaltenden Proteinen unter Eisenmangel-Bedingungen handeln könnte. Eine Beteiligung an der Regulation der Eisen-Aufnahmesysteme zeigte sich bei diesen Experimenten nicht, da sowohl unter Eisenmangel als auch Eisenüberschuss keine Expressionsveränderungen im Wildtyp oder *NCgl0943*-Deletionsmutante auftraten. Die Tatsache, dass die *NCgl0943*-Deletionsmutante bei Wachstum unter Eisenmangel einen Wachstumsdefekt (OD 20) gegenüber dem Wildtyp (OD 40) zeigt, unterstützt die Annahme der Beteiligung von *NCgl0943* am Eisenstoffwechsel nur unter Eisenmangel-Bedingungen. Ob und inwieweit *NCgl0943* im Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel von *C. glutamicum* steht, müssen Wiederholungen und weitere Experimente wie z.B. der Nachweis der Bindung von *NCgl0943* an die Promoterbereiche der am Eisen-Stoffwechsel beteiligten Gene zeigen.

Sicher ist jedoch, dass *NCgl0943* keine Sequenzidentitäten zu IdeR aus *M. tuberculosis*, DtxR aus *C. diphtheriae* oder Fur aus *E. coli* hat. IdeR („iron

dependent regulator“) gehört zur Familie der DtxR-Regulatoren und wurde in *M. tuberculosis* (Schmitt *et al.*, 1995) sowie anderen Mycobakterien identifiziert (Doukhan *et al.*, 1995). Er kontrolliert die Transkription der Gene, die zur Eisen-Speicherung und Eisen-Aufnahme nötig sind (Gold *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass IdeR für *M. tuberculosis* essentiell ist (Rodriguez *et al.*, 2002). Die Regulation der Aconitase in *M. tuberculosis* scheint jedoch unabhängig von IdeR zu sein, da zum einen kein IdeR-Bindemotiv für das Aconitase-Gen identifiziert wurde (Gold *et al.*, 2001) und da zum anderen globale Expressionsanalysen mit unterschiedlichen Eisenkonzentration zu keiner Veränderung des *acn*-mRNA-Niveaus führten (Rodriguez *et al.*, 2002).

DtxR („diphtheria toxin repressor“) ist ein durch Eisen aktivierter globaler Transkriptionsregulator, der die Transkription verschiedener Eisen-abhängiger Gene in *C. diphtheriae* reprimiert (Kunkle & Schmitt, 2003; Oram *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass DtxR sowohl an den Promotor der *tox*-Gene (Tao & Murphy, 1992) als auch verschiedener anderer Gene (*irp1 - 6* und *hmuO*) bindet, die für Siderophor-Transportsysteme (Irp1 und 6), eine Häm-Oxygenase (HmuO), hypothetische Proteine (Irp2, 4 und 6) und einen AraC-Typ-Transkriptionsregulator (Irp3) kodieren (Schmitt & Holmes, 1994; Schmitt, 1997; Lee *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 2002). Dieser AraC-Typ-Transkriptionsregulator aus *C. diphtheriae* (DIP0922) zeigt auf Proteinebene eine Identität von 54 % zu NCgl0943 aus *C. glutamicum* und könnte demnach die gleiche Funktion in beiden Bakterien haben. Auch in *C. glutamicum* wurde ein Gen, welches auf DNA-Ebene zu 73 % und auf Proteinebene zu 72 % identisch zu *dtxR* aus *C. diphtheriae* ist, identifiziert (Oram *et al.*, 2004). Hierbei handelt es sich um das Gen *NCgl1845*, zu dem auch IdeR eine Identität auf Proteinebene von 58 % zeigt. Dies verwundert nicht, da IdeR und DtxR der gleichen Familie von Regulatoren zugeordnet werden.

Fur („ferric-uptake regulator“) kontrolliert in *E. coli* und vielen anderen Bakterien die Eisen-abhängige Expression vieler Gene. In *E. coli* werden mehr als 90 Gene durch Fur reguliert unter anderem auch das *acnA*-Gen der Aconitase A (Hantke, 2001; Hantke & Braun, 2000). Bei Fur handelt es sich um einen Repressor, der z.B. in Anwesenheit von Eisen reprimiert, nicht aber in Abwesenheit von Eisen. Einige der durch Fur regulierten Gene werden wahrscheinlich indirekt über RyhB (Masse & Gottesman, 2002) durch Fur induziert z.B. *acnA* (Gruer & Guest, 1994) oder *fumA* (aerobe Fumarase, (Park & Gunsalus, 1995)). Viele dieser Proteine besitzen ein Fe-

S-Cluster als Co-Faktor. Fur steuert gezielt die Expression von Eisen-enthaltenden Proteinen, je nachdem wie viel Eisen verfügbar ist (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Masse & Gottesman, 2002). Ein *fur*-Homolog in *C. glutamicum* stellt *NCgl2200* dar. Ein Teil der dem Fur zugeschriebenen Funktionen (Regulation von Eisen-haltigen Proteinen) könnte der Funktion von *NCgl0943* zugeschrieben werden.

Zusammenfassend wird klar, dass die Eisen-Regulation in *C. glutamicum* wahrscheinlich sehr komplex ist und mehrere Transkriptionsregulatoren umfasst, i.e. *NCgl0943* sowie die Proteine, die hohe Identität zu den globalen Eisenregulatoren *DtxR/IdeR* und *Fur* zeigen. Da das *NCgl0943*-Homolog in *C. diphtheriae* unter Kontrolle von *DtxR* steht, ist die Aufklärung des *NCgl0943*-Regulons in *C. glutamicum* wahrscheinlich auch für *C. diphtheriae* relevant. Damit einhergehend wäre natürlich die Aufklärung der Funktion von *DtxR* in *C. glutamicum* von großem Interesse.

Bei den DNA-Chip-Experimenten mit der *NCgl0943*-Deletionsmutante und dem Wildtyp fiel auf, dass die Schlüssel-Gene des Glyoxylat-Zyklus (*aceA*, Isocitrat-Lyase und *aceB*, Malat-Synthase) sowohl bei Eisenüberschuss als auch bei Eisenmangel eine dreifach höhere mRNA-Konzentration in der Mutante hatten. Dabei scheint es sich also nicht um eine Eisen-abhängige Regulation zu handeln. Die Frage, welche Gene von *NCgl0943* direkt oder indirekt reguliert werden, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

4. Funktion und Regulation der Aconitase in *C. glutamicum*

Ähnlich wie in *E. coli* und *B. subtilis* bestehen Hinweise darauf, dass auch die *acn*-Expression in *C. glutamicum* durch mehrere Regulatoren kontrolliert wird. Anhand von Tabelle 8 wird deutlich, dass die Aconitase-Aktivitäten der $\Delta acnR$ -Mutante auf Kohlenstoffquellen wie Acetat, Citrat oder Propionat um 1,5- bis 2,3-fach höher sind als auf Glukose. Bei Kultivierung von *C. glutamicum* auf Acetat im Vergleich zu Glukose gehört das Aconitase-Gen zu einer Vielzahl von Genen, deren Expression durch Acetat stimuliert wird (Gerstmeir *et al.*, 2003). Mittlerweile wurde RamB als negativer Transkriptionsregulator der Gene des Acetat-Stoffwechsels identifiziert und die Bindestelle von RamB vor dem *pta-ack*-Operon (Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase) charakterisiert. In der stromaufwärts vom *acn*-Startcodon liegenden DNA-Region wurden an den Positionen -492 bis -480 (+ Strang) und -456 bis -444

(- Strang) relativ zum *acn*-Startcodon zwei putative RamB-Bindungsstellen identifiziert (Gerstmeir *et al.*, 2004). Somit stellt RamB einen zweiten möglichen Regulator der *acn*-Expression in *C. glutamicum* dar. Bei der Suche nach weiteren Transkriptionsregulatoren von *acn* mittels DNA-Affinitätschromatographie konnte RamB jedoch nicht identifiziert werden. Eine Regulation von *acn* durch RamB ist also bisher rein hypothetisch. Anstatt RamB konnte jedoch ein anderer Regulator isoliert werden, i.e. RamA. Eine *ramA*-Deletionsmutante kann nicht mehr auf Acetat als alleiniger C-Quelle wachsen. Daher ist RamA höchstwahrscheinlich ein Transkriptionsaktivator (B. Eikmanns, persönliche Mitteilung). Da eine Anreicherung von RamA durch DNA-Affinitätschromatographie mit der *acn*-Promotor-Region nur aus Acetat-gewachsenen Zellen möglich war, fungiert RamA möglicherweise als Aktivator der *acn*-Expression bei Wachstum auf Acetat. Da auch andere Gene wie *ack*, *pta*, *aceA* und *aceB*, die am Acetat-Stoffwechsel beteiligt sind, auf Transkriptionsebene reguliert werden (Reinscheid *et al.*, 1994a; Reinscheid *et al.*, 1994b; Gerstmeir *et al.*, 2003), wäre auch hier eine Aktivierung durch RamA vorstellbar, zumal bisher nur RamB als gemeinsamer Repressor dieser Gene identifiziert wurde (Gerstmeir *et al.*, 2004).

Interessanterweise zeigte bei den vergleichenden Transkriptomanalysen von 13032 Δ *acn* mit Wildtyp und 13032/pEKEx2-*acn* mit 13032/pEKEx2 sowohl das *pta*-Gen als auch zum Teil das *ack*-Gen (nur in einem von acht Experimenten auswertbar) jeweils in dem Stamm eine erhöhte mRNA-Konzentration, in dem eine geringere *acn*-Expression vorherrschte, i.e. 13032 Δ *acn* und 13032/pEKEx2. Eine direkte Regulation dieser Gene durch die Aconitase ist zwar nicht ausgeschlossen, jedoch könnte es sich eher, bedingt durch den möglichen Anstau von Acetyl-CoA, um einen sekundären Effekt handeln. Die Überexpression von *acn* könnte wiederum zu einem Mangel an Acetyl-CoA führen, weswegen in diesem Stamm das *pta*-Gen eine verringerte mRNA-Konzentration aufweist. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liefern keine Hinweise auf eine regulatorische Funktion der Aconitase, wie sie in anderen Bakterien beschrieben wurde. Die Transkriptomvergleiche von Δ *acn*-Mutante mit Wildtyp und *acn*-Überexpmierer und Wildtyp deuten nicht darauf hin, dass die Aconitase die Expression der Gene für Eisen-Aufnahmesysteme, Eisenspeicherung oder Eisen-enthaltende Proteine reguliert. Die Deletion von *acn* hatte keinen Effekt auf die am Eisenstoffwechsel beteiligten Gene. Die Überexpression von *acn* hingegen führt wieder zum gleichen Bild, welches auch bei

der $\Delta acnR$ -Mutante beobachtet wurde, nämlich erhöhte mRNA-Level der Gene für Eisen-Aufnahmesysteme und verringerte mRNA-Level der Gene für Eisen-haltige Proteine. Da die Überexpression von *acn* sehr stark ist (28-fach erhöhter mRNA-Level und ca. 20-fach erhöhte Aconitase-Aktivität), ist es wahrscheinlich, dass der Stamm 13032/pEKEx2-*acn* bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Kultivierung wieder unter Eisenmangel leidet.

Ein Ergebnis, das bisher nicht erklärt werden kann, ist das Wachstumsverhalten der *acn*-Deletionsmutante. Trotz ausreichender Supplementation mit Glutamat hat die Mutante eine vierfach niedrigere Wachstumsrate als der Wildtyp. Dies könnte einerseits an einem Anstau von Metaboliten (z.B. Citrat) und einer evtl. damit verbundenen Ansäuerung (Craig *et al.*, 1997) liegen (wurde aber bisher noch nicht getestet) oder aber an einer regulatorischen Funktion der Aconitase, die in der Mutante ausbleibt. Auch durch Komplementation der Mutante durch pEKEx2-*acn* konnte der Wachstumsdefekt nicht aufgehoben werden. Dies überrascht, da die Aconitase-Aktivität in diesem Stamm (Δacn /pEKEx2-*acn*) ca. 10-fach höher war als im Wildtyp. Ein negativer Effekt des Vorhandenseins von zuviel Aconitase ist dabei ausgeschlossen, da die Überexpression im Wildtyp-Hintergrund keinen negativen Einfluss auf das Wachstum hat. Eine mögliche Erklärung liefert eventuell die transkriptionelle Organisation des *acn*-Gens. Dass *acn* und *acnR* co-transkribiert werden, wurde schon gezeigt (Abbildung 9). In gleicher Orientierung liegt direkt stromabwärts des *acnR*-Gens ein Gen für eine putative GMP-Synthase (Abbildung 6). Wenn alle drei Gene ein Transkript bilden würden und die putative GMP-Synthase eine wichtige Funktion in *C. glutamicum* hätte, wäre dies eine mögliche Erklärung für das schlechte Wachstum einer *acn*-Deletionsmutante. Durch die Deletion der putativen GMP-Synthase im Wildtyp oder durch Überexpression des Gens für die GMP-Synthase im Δacn -Stammhintergrund ließe sich der Einfluss auf das Wachstum gut untersuchen. Im Falle der Deletion sollte ebenfalls ein schlechtes Wachstum zu beobachten sein, während im zweiten Fall der negative Wachstumseffekt der *acn*-Deletionsmutante komplementiert werden sollte.

Mit den gewonnenen Ergebnissen zu AcnR (Kapitel 2), der Identifizierung eines weiteren Regulators bei Wachstum auf Acetat und des Einflusses von Eisen und NCgl0943 auf die *acn*-Expression (Kapitel 3) ergibt sich ein umfangreiches Regulationsnetzwerk für die Aconitase von *C. glutamicum* (Abbildung 27). Um die

Regulation der Aconitase in *C. glutamicum* noch besser zu verstehen, wäre es wichtig den Effektor (Liganden) von AcnR zu identifizieren. Des Weiteren sollte auch der Einfluss von RamA und RamB bei Kultivierungen mit Acetat auf die *acn*-Expression bestimmt werden. Die Annahme, dass NCgl0943 unter Eisenmangel die *acn*-Expression reprimiert, muss verifiziert werden und das NCgl0943-Regulon in *C. glutamicum* bestimmt werden.

Zudem bieten die in dieser Arbeit konstruierten Stämme (13032 Δ *acnR*, 13032 Δ *acn*, 13032/pEKEx2-*acnR* und 13032/pEKEx2-*acn*) nun die Möglichkeit den Einfluss verschiedener *acn*-Expressionen bzw. Aconitase-Aktivitäten auf die Aminosäure-Bildung in *C. glutamicum* zu untersuchen.

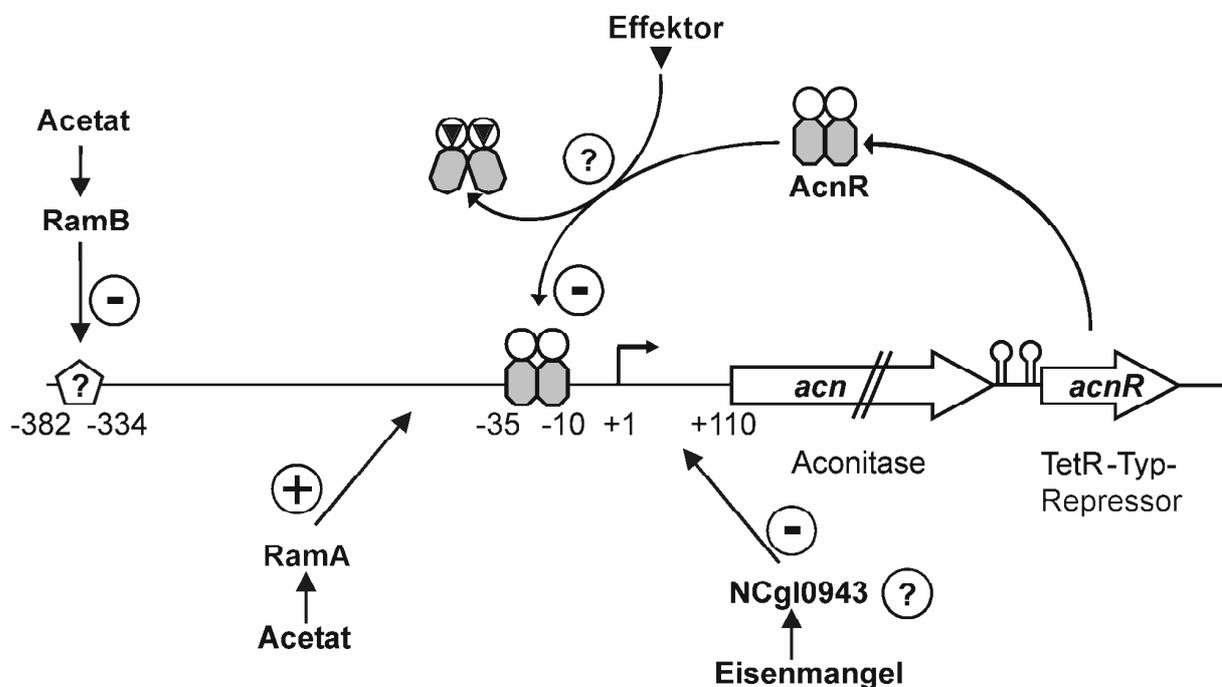


Abbildung 27: Modell zur komplexen Regulation der Aconitase in *C. glutamicum*.

Bei der Primer-Extension-Analyse des *acn*-Promotors konnten zwei Transkriptionsstarts 113 und 110 bp stromaufwärts des Startcodons identifiziert werden. Der erste ergab dabei ein deutlich schwächeres Signal als der zweite. Bei den Primer-Extension-Analysen nach Wachstum mit verschiedenen C-Quellen blieb das Verhältnis der beiden Primer-Extension-Produkte zueinander konstant. Jedoch könnte es sich z.B. bei Wachstum mit unterschiedlichen Eisenkonzentrationen verändern. Die Frage, ob es einen oder zwei *acn*-Promotoren gibt, ist also auch noch nicht endgültig geklärt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1999).** Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**, 1415-1428.
- Abe, S., Takayama, K.-I. & Kinoshita, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 279-301.
- Alen, C. & Sonenshein, A. L. (1999).** *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10412-10417.
- Aramaki, H., Yagi, N. & Suzuki, M. (1995).** Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng.* **8**, 1259-1266.
- Aramaki, H., Sagara, Y., Hosoi, M. & Horiuchi, T. (1993).** Evidence for autoregulation of *camR*, which encodes a repressor for the cytochrome P-450cam hydroxylase operon on the *Pseudomonas putida* CAM plasmid. *J. Bacteriol.* **175**, 7828-7833.
- Arfin, S. M., Long, A. D., Ito, E. T., Toller, L., Riehle, M. M., Paegle, E. S. & Hatfield, G. W. (2000).** Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 29672-29684.
- Bachmann, B. J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M. & Sonnhammer, E. L. (2002).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 276-280.
- Beach, R. L., Aogaichi, T. & Plaut, G. W. (1977).** Identification of D-threo-alpha-methylisocitrate as stereochemically specific substrate for bovine heart aconitase and inhibitor of TPN-linked isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **252**, 2702-2709.
- Beinert, H. & Kennedy, M. C. (1989).** 19th Sir Hans Krebs lecture. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanism of iron-sulfur enzymes. *Eur. J. Biochem.* **186**, 5-15.
- Beinert, H. & Kiley, P. J. (1999).** Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 152-157.
- Beinert, H., Kennedy, M. C. & Stout, C. D. (1996).** Aconitase as Iron Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* **96**, 2335-2374.
- Bergmeyer, H. U., Brent, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974).** Glukosetest. In *In: Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse II*, pp. 1241-1246: VCH Weinheim.

- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blank, L., Green, J. & Guest, J. R. (2002).** AcnC of *Escherichia coli* is a 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) that can use citrate and isocitrate as substrates. *Microbiology* **148**, 133-146.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bott, M. & Niebisch, A. (2003).** The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 129-153.
- Bradbury, A. J., Gruer, M. J., Rudd, K. E. & Guest, J. R. (1996).** The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142** (Pt 2), 389-400.
- Brock, M., Maerker, C., Schutz, A., Volker, U. & Buckel, W. (2002).** Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6184-6194.
- Claes, W. A., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2002).** Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J. Bacteriol.* **184**, 2728-2739.
- Clarke, T. E., Tari, L. W. & Vogel, H. J. (2001).** Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 7-30.
- Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R. M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J. R. & Barrell, B. G. (2001).** Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**, 1007-1011.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. & O'Gara, J. P. (2002).** *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **184**, 4400-4408.
- Cordes, C., Möckel, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **112**, 113-116.
- Cox, D. P. & Hanson, R. S. (1968).** Catabolite repression of aconitate hydratase in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **158**, 36-44.

- Craig, J. E., Ford, M. J., Blaydon, D. C. & Sonenshein, A. L. (1997).** A null mutation in the *Bacillus subtilis* aconitase gene causes a block in Spo0A-phosphate-dependent gene expression. *J. Bacteriol.* **179**, 7351-7359.
- Cremer, J., Eggeling, L. & Sahm, H. (1990).** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 478-480.
- Cunningham, L., Gruer, M. J. & Guest, J. R. (1997).** Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**, 3795-3805.
- Debabov, V. G. (2003).** The threonine story. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**, 113-136.
- Doukhan, L., Predich, M., Nair, G., Dussurget, O., Mandic-Mulec, I., Cole, S. T., Smith, D. R. & Smith, I. (1995).** Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene* **165**, 67-70.
- Eggeling, L. (2001).** Amino acids. In *Basic Biotechnology*, pp. 281-303. Edited by C. Ratledge & B. Kristiansen. London: Cambridge University Press.
- Eggeling, L. & Sahm, H. (2003).** New ubiquitous translocators: amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **180**, 155-160.
- Eikmanns, B. J. (1992).** Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **174**, 6076-6086.
- Eikmanns, B. J., Rittmann, D. & Sahm, H. (1995).** Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **177**, 774-782.
- Eikmanns, B. J., Follettie, M. T., Griot, M. U. & 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., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.
- Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Ludtke, K. U. & Sahm, H. (1994).** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**, 1817-1828.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. (1998).** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14863-14868.

Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M. & Schaffer, S. (2004). *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. *Mol. Microbiol.* **52**, 285-302.

Engohang-Ndong, J., Baillat, D., Aumercier, M., Bellefontaine, F., Besra, G. S., Locht, C. & Baulard, A. R. (2004). EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol. Microbiol.* **51**, 175-188.

Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997). Identification of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry Following In-Gel Digestion in Low-Salt, Nonvolatile Buffer and Simplified Peptide Recovery. *Anal. Biochem.* **250**, 153-156.

Gerstmeir, R., Cramer, A., Dangel, P., Schaffer, S. & Eikmanns, B. J. (2004). RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **186**, 2798-2809.

Gerstmeir, R., Wendisch, V. F., Schnicke, S., Ruan, H., Farwick, M., Reinscheid, D. & Eikmanns, B. J. (2003). Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 99-122.

Gold, B., Rodriguez, G. M., Marras, S. A., Pentecost, M. & Smith, I. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol. Microbiol.* **42**, 851-865.

Gourdon, P., Baucher, M. F., Lindley, N. D. & 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.

Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N. J., Paulsen, I. T. & Skurray, R. A. (1998). QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J. Biol. Chem.* **273**, 18665-18673.

Grkovic, S., Brown, M. H., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. & Skurray, R. A. (2001). The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J. Bacteriol.* **183**, 7102-7109.

Gruer, M. J. & Guest, J. R. (1994). Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* **140**, 2531-2541.

Gruer, M. J., Artymiuk, P. J. & Guest, J. R. (1997). The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 3-6.

Guilfoile, P. G. & Hutchinson, C. R. (1992). The *Streptomyces glaucescens* TcmR protein represses transcription of the divergently oriented *tcmR* and *tcmA* genes by binding to an intergenic operator region. *J. Bacteriol.* **174**, 3659-3666.

- Haile, D. J., Rouault, T. A., Tang, C. K., Chin, J., Harford, J. B. & Klausner, R. D. (1992).** Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7536-7540.
- Hanahan (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA-cloning*, pp. 109-135. Edited by G. D. M. Oxford/Washington DC: IRL-Press.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hantke, K. (2001).** Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172-177.
- Hantke, K. & Braun, V. (2000).** The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In *Bacterial Stress Responses*, pp. 275-288. Edited by G. a. H.-A. Storz, R. Washington, DC: ASM Press.
- Henson, C. P. & Cleland, W. W. (1967).** Purification and kinetic studies of beef liver cytoplasmic aconitase. *J. Biol. Chem.* **242**, 3833-3838.
- Hillen, W., Schollmeier, K. & Gatz, C. (1984).** Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon. II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the *tet* operon regulatory region. *J. Mol. Biol.* **172**, 185-201.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W. & Saenger, W. (1994).** Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* **264**, 418-420.
- Horswill, A. R. & Escalante-Semerena, J. C. (2001).** In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochemistry* **40**, 4703-4713.
- Ikeda, M. & Katsumata, R. (1999).** Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2497-2502.
- Ikeda, M. & Nakagawa, S. (2003).** The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 99-109.
- Ikeda, M., Okamoto, K. & Katsumata, R. (1999a).** 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., Kamada, N., Takano, Y. & Nakano, T. (1999b).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transketolase gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1806-1810.

- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1981).** Regulation of coenzyme A biosynthesis. *J. Bacteriol.* **148**, 926-932.
- Jakoby, M., Nolden, L., Meier-Wagner, J., Kramer, R. & Burkovski, A. (2000).** AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **37**, 964-977.
- Jetten, M. S., Gubler, M. E., Lee, S. H. & Sinskey, A. J. (1994).** Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2501-2507.
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. M. & Sonenshein, A. L. (2000).** CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **295**, 865-878.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfeufferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I. & Tauch, A. (2003).** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**, 5-25.
- Kase, H. & Nakayama, K. (1972).** Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1611-1621.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**, 5595-5603.
- Kennerknecht, N., Sahm, H., Yen, M. R., Patek, M., Saier Jr, M. H., Jr. & Eggeling, L. (2002).** Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J. Bacteriol.* **184**, 3947-3956.
- Kent, T. A., Emptage, M. H., Merkle, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. & Munck, E. (1985).** Mossbauer studies of aconitase. Substrate and inhibitor binding, reaction intermediates, and hyperfine interactions of reduced 3Fe and 4Fe clusters. *J. Biol. Chem.* **260**, 6871-6881.
- Khodursky, A. B., Bernstein, J. A., Peter, B. J., Rhodius, V., Wendisch, V. F. & Zimmer, D. P. (2003).** *Escherichia coli* spotted double-strand DNA microarrays: RNA extraction, labeling, hybridization, quality control, and data management. *Methods Mol. Biol.* **224**, 61-78.
- Kim, H. J., Roux, A. & Sonenshein, A. L. (2002).** Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Mol. Microbiol.* **45**, 179-190.
- Kim, H. J., Kim, S. I., Ratnayake-Lecamwasam, M., Tachikawa, K., Sonenshein, A. L. & Strauch, M. (2003a).** Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene. *J. Bacteriol.* **185**, 1672-1680.

- Kim, S. I., Jourlin-Castelli, C., Wellington, S. R. & Sonenshein, A. L. (2003b).** Mechanism of repression by *Bacillus subtilis* CcpC, a LysR family regulator. *J. Mol. Biol.* **334**, 609-624.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**, 193-205.
- Kirchner, O. & Tauch, A. (2003).** Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 287-299.
- Kojic, M., Aguilar, C. & Venturi, V. (2002).** TetR family member *psrA* directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J. Bacteriol.* **184**, 2324-2330.
- Kunkle, C. A. & Schmitt, M. P. (2003).** Analysis of the *Corynebacterium diphtheriae* DtxR regulon: identification of a putative siderophore synthesis and transport system that is similar to the *Yersinia* high-pathogenicity island-encoded yersiniabactin synthesis and uptake system. *J. Bacteriol.* **185**, 6826-6840.
- Kusumoto, I. (2001).** Industrial production of L-glutamine. *J. Nutr.* **131**, 2552S-2555S.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lange, C., Rittmann, D., Wendisch, V. F., Bott, M. & Sahm, H. (2003).** Global Expression Profiling and Physiological Characterization of *Corynebacterium glutamicum* Grown in the Presence of L-Valine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2521-2532.
- Lee, J. H., Wang, T., Ault, K., Liu, J., Schmitt, M. P. & Holmes, R. K. (1997).** Identification and characterization of three new promoter/operators from *Corynebacterium diphtheriae* that are regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *Infect. Immun.* **65**, 4273-4280.
- Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V. F. & Uden, G. (2002).** LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**, 521-532.
- Leuchtenberger, W. (1996).** Amino Acids - technical production and use. In *Biotechnology: Products of primary metabolism*, pp. 465-502. Edited by H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler & P. Stadler. Weinheim: Verlag Chemie.
- Leyval, D., Uy, D., Delaunay, S., Goergen, J. L. & Engasser, J. M. (2003).** Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 241-252.
- Liebl, W. (1991).** The genus *Corynebacterium*-nonmedical. In *The prokaryotes*, pp. 1157-1171. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.

- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. & Schleifer, K. H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**, 299-303.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**, 1667-1674.
- Link, A. J., Phillips, D. & 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.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002).** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4620-4625.
- Miller, E. M. & Nickoloff, J. A. (1995).** *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol. Biol.* **47**, 105-113.
- Möckel, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **174**, 8065-8072.
- Molenaar, D., van der Rest, M. E. & Petrovic, S. (1998).** Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* **254**, 395-403.
- Molenaar, D., van der Rest, M. E., Drysch, A. & Yucel, R. (2000).** Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **182**, 6884-6891.
- Morbach, S., Junger, C., Sahm, H. & Eggeling, L. (2000).** Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 501-507.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Netzer, R. (2003).** Untersuchungen zur Glykolyse und zum L-Serin Stoffwechsel in *Corynebacterium glutamicum*. In *IBT-1*, pp. 152. Jülich: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Oram, D. M., Avdalovic, A. & Holmes, R. K. (2002).** Construction and characterization of transposon insertion mutations in *Corynebacterium diphtheriae* that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR). *J. Bacteriol.* **184**, 5723-5732.
- Oram, D. M., Avdalovic, A. & Holmes, R. K. (2004).** Analysis of genes that encode DtxR-like transcriptional regulators in pathogenic and saprophytic corynebacterial species. *Infect. Immun.* **72**, 1885-1895.

Park, S. J. & Gunsalus, R. P. (1995). Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J. Bacteriol.* **177**, 6255-6262.

Park, S. Y., Kim, H. K., Yoo, S. K., Oh, T. K. & Lee, J. K. (2000). Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 209-215.

Peters-Wendisch, P. G., Schiel, B., Wendisch, V. F., Katsoulidis, E., Mockel, B., Sahm, H. & Eikmanns, B. J. (2001). Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 295-300.

Polen, T. (2002). Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. In *Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich*, pp. 101. Jülich: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Polen, T. & Wendisch, V. F. (2004). Genomewide expression analysis in amino Acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 215-232.

Polen, T., Rittmann, D., Wendisch, V. F. & Sahm, H. (2003). DNA Microarray Analyses of the Long-Term Adaptive Response of *Escherichia coli* to Acetate and Propionate. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1759-1774.

Prodromou, C., Haynes, M. J. & Guest, J. R. (1991). The aconitase of *Escherichia coli*: purification of the enzyme and molecular cloning and map location of the gene (*acn*). *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2505-2515.

Prodromou, C., Artymiuk, P. J. & Guest, J. R. (1992). The aconitase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 599-609.

Qian, Y., Lee, J. H. & Holmes, R. K. (2002). Identification of a DtxR-regulated operon that is essential for siderophore-dependent iron uptake in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **184**, 4846-4856.

Radmacher, E., Vaitsikova, A., Burger, U., Krumbach, K., Sahm, H. & Eggeling, L. (2002). Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2246-2250.

Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1994a). Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**, 3474-3483.

Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1994b). Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* **140** (Pt 11), 3099-3108.

- Rey, D. A., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2003).** The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **103**, 51-65.
- Rhodijs, V., Van Dyk, T. K., Gross, C. & LaRossa, R. A. (2002).** Impact of genomic technologies on studies of bacterial gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 599-624.
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Mockel, B., Petersen, S., Sahm, H. & Eikmanns, B. J. (2001).** Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 573-583.
- Rodriguez, G. M., Voskuil, M. I., Gold, B., Schoolnik, G. K. & Smith, I. (2002).** *ideR*, An essential gene in mycobacterium tuberculosis: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect. Immun.* **70**, 3371-3381.
- Rosenkrantz, M. S., Dingman, D. W. & Sonenshein, A. L. (1985).** *Bacillus subtilis citB* gene is regulated synergistically by glucose and glutamine. *J. Bacteriol.* **164**, 155-164.
- Sahm, H. & Eggeling, L. (1999).** D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1973-1979.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. & Krämer, R. (1995).** Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Reviews* **16**, 243-252.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. & Kramer, R. (1996).** Construction of L-lysine-, L-threonine-, and L-isoleucine-overproducing strains of *Corynebacterium glutamicum*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**, 25-39.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3 edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T. & Bott, M. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**, 4404-4422.

- Schmitt, M. P. (1997).** Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae hmuO* gene is regulated by iron and heme. *Infect. Immun.* **65**, 4634-4641.
- Schmitt, M. P. & Holmes, R. K. (1994).** Cloning, sequence, and footprint analysis of two promoter/operators from *Corynebacterium diphtheriae* that are regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *J. Bacteriol.* **176**, 1141-1149.
- Schmitt, M. P., Predich, M., Doukhan, L., Smith, I. & Holmes, R. K. (1995).** Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect. Immun.* **63**, 4284-4289.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 566-571.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. & Brennan, R. G. (2002).** Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *Embo J.* **21**, 1210-1218.
- Schwarzer, A. & Puhler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 84-87.
- Schwinde, J. W., Hertz, P. F., Sahm, H., Eikmanns, B. J. & Guyonvarch, A. (2001).** Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* **147**, 2223-2231.
- Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996).** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* **6**, 639-645.
- Shiio, I. & et al. (1959).** Glutamic acid formation from glucose by bacteria I. enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the Krebs cycle, and the glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* No. 2247. *J. Biochem.* **46**:1303-1311.
- Sindelar, G. (2003).** Globale Expressionsanalysen zur Charakterisierung der Lysin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum*. In *Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich*, pp. 150. Jülich: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Skerra, A. & Schmidt, T. G. (2000).** Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271-304.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.
- Studier, F. W. & 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.
- Tang, Y. & Guest, J. R. (1999).** Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology* **145**, 3069-3079.
- Tang, Y., Quail, M. A., Artymiuk, P. J., Guest, J. R. & Green, J. (2002).** *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology* **148**, 1027-1037.
- Tang, Y., Guest, J. R., Artymiuk, P. J., Read, R. C. & Green, J. (2004).** Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins. *Mol. Microbiol.* **51**, 1817-1826.
- Tao, X. & Murphy, J. R. (1992).** Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. *J. Biol. Chem.* **267**, 21761-21764.
- Tauch, A., Hermann, T., Burkovski, A., Kramer, R., Puhler, A. & Kalinowski, J. (1998).** Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *bmQ* gene product. *Arch. Microbiol.* **169**, 303-312.
- Textor, S., Wendisch, V. F., De Graaf, A. A., Muller, U., Linder, M. I., Linder, D. & Buckel, W. (1997).** Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch. Microbiol.* **168**, 428-436.
- Tsaneva, I. R. & Weiss, B. (1990).** *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**, 4197-4205.
- Uhrigshardt, H., Zoske, S. & Anemuller, S. (2002).** *Sulfolobus* aconitase, a regulator of iron metabolism? *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 685-687.
- Umbarger, H. E. (1996).** Biosynthesis of the branched-chain amino acids. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp. 442-457. Edited by F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington: ASM Press.
- Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O. & Matsui, H. (1996).** Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology* **142** (Pt 12), 3347-3354.
- van der Rest, M. E., Lange, C. & Molenaar, D. (1999).** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 541-545.

- Varghese, S., Tang, Y. & Imlay, J. A. (2003).** Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *J. Bacteriol.* **185**, 221-230.
- Viollier, P. H., Nguyen, K. T., Minas, W., Folcher, M., Dale, G. E. & Thompson, C. J. (2001).** Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **183**, 3193-3203.
- von der Osten, C. H., Barbas, C. F., 3rd, Wong, C. H. & Sinskey, A. J. (1989).** Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *fda* gene: structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-biphosphate aldolase to class I and class II aldolases. *Mol. Microbiol.* **3**, 1625-1637.
- Wada, M., Awano, N., Haisa, K., Takagi, H. & Nakamori, S. (2002).** Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 103-107.
- Wendisch, V. F. (2003).** Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J. Biotechnol.* **104**, 273-285.
- Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Sahm, H. & Eikmanns, B. J. (2000).** Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization 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. & 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.
- Wilhelm, C., Eggeling, I., Nassenstein, A., Jeben, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1989).** Limitations during hydroxybutyrate conversion to isoleucine with *Corynebacterium glutamicum*, as analysed by the formation of by products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 458-462.
- Williams, C. H., Stillman, T. J., Barynin, V. V., Sedelnikova, S. E., Tang, Y., Green, J., Guest, J. R. & Artymiuk, P. J. (2002).** *E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 447-452.
- Wilson, T. J., Bertrand, N., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Barber, C. E., Dow, J. M. & Daniels, M. J. (1998).** The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. *Mol. Microbiol.* **28**, 961-970.
- Wong, D. K., Lee, B. Y., Horwitz, M. A. & Gibson, B. W. (1999).** Identification of *fur*, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect. Immun.* **67**, 327-336.

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A. & Kustu, S. (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14674-14679.

VII. ANHANG

Tabelle 14: Gene mit signifikant erhöhtem oder erniedrigtem mRNA-Verhältnis beim Vergleich der Stämme 13032/pJC1*ilvBNCD* und 13032/pJC1 beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase. Zusammengefasst wurden Gene, für die sicher messbare (Signal / Rausch-Verhältnis ≥ 3) und signifikante (Quotient der Mediane signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (genomische DNA) durch Student's *t*-Test ($p < 0,05 = *$ and $p < 0,005 = **$)) RNA-Verhältnisse bestimmt wurden und die mindestens 2-fache Veränderungen aufwiesen. σ = Standardabweichung

NCgl	ORF	Gene - annotierte Funktionen	Mittel	σ	p
0794-0795	1376	put. <i>serC</i> - Phosphoserin-Aminotransferase	0,2	0,1	*
1252	2749	hypothetisches Protein	0,2	0,0	**
1965	2152	ThiF-Protein	0,2	0,2	*
2473	2890	Cystein-Synthase	0,2	0,1	**
0113	506	put. Hydroxymethyltransferase	0,3	0,1	*
0183	577	hypothetisches Protein	0,3	0,1	*
0346	803	put. UDP-N-Acetyl-Reductase	0,3	0,1	*
0426	921	put. Cytochrome <i>c</i> -Biosyntheseprotein - ResB	0,3	0,0	*
0626	1155	put. Kohlenstoffmangel-Protein	0,3	0,0	*
1163	1811	ATP-Synthase- α -Untereinheit	0,3	0,1	**
1164	1812	ATP-Synthase- γ -Untereinheit	0,3	0,1	*
1165	1813	ATP-Synthase- β -Untereinheit	0,3	0,1	**
1344	2625	Ornithin-Carbamoyl-Transferase	0,3	0,2	*
1482	2425	<i>acn</i> - Aconitase	0,3	0,2	*
2222	3126	Trehalose-Synthase	0,3	0,0	*
2377	3004	put. Zucker-ABC-Transporter, ATPase	0,3	0,1	*
2480	2881	Succinyl-CoA: Coenzym A-Transferase	0,3	0,1	**
2718	198	Nitrit-Reduktase	0,3	0,2	*
0009	3303	hypothetischer Transkriptionsregulator	0,4	0,2	*
0391	870	<i>cgtS4</i> - 2-Komponentensystem-Antwortregulator	0,4	0,1	**
0427	922	put. ResC	0,4	0,2	*
0446	948	put. Naphthoat-Synthase	0,4	0,0	*
0697	1245	Trehalose/Maltose-bindendes Protein	0,4	0,2	*
0795	1377	Citrat-Synthase	0,4	0,1	*
1084	1712	2-Ketoglutarat-Dehydrogenase-E1-Untereinheit	0,4	0,1	**
1408	64251	put. Hydroxyethylthiazol-Kinase	0,4	0,2	*
1502	2453	put. Eisentransportprotein, ATPase	0,4	0,2	*
1512	2470	Transketolase	0,4	0,1	**
1525	2486	Phosphoglycerat-Kinase	0,4	0,2	*
1550	2516	Aspartat-Carbamoyl-Transferase	0,4	0,2	*
1877	2042	put. Glutamat-ABC-Transporter, Permease	0,4	0,1	*
1915	2093	put. Oligopeptid-ABC-Transporter, Bindeprotein	0,4	0,2	*
1915	2092	put. Oligopeptid-ABC-Transporter, Bindeprotein	0,4	0,2	*
2045	2253	put. Maltooligosyl-trehalose-Trehalohydrolase	0,4	0,2	*
2374	2999	put. Zucker-ABC-Transporter, Permease	0,4	0,0	**
2673-2674	142	hypothetisches Protein	0,4	0,0	**
2714	194	hypothetisches Protein	0,4	0,3	*
0151	550	put. Metalloprotease	0,5	0,2	*
0191	588	hypothetisches Protein	0,5	0,2	*
0245	662	2-Isopropylmalat-Synthase	0,5	0,2	*

0326	775	put. dTDP-4-Dehydrorhamnose-Epimerase	0,5	0,2	*
0360	831	Succinat-Dehydrogenase - Flavoprotein-Untereinheit	0,5	0,2	*
0388	867	Acyl-CoA-Synthetase	0,5	0,0	**
0390	869	Phosphoglycerat-Mutase	0,5	0,1	*
0634	1167	Isocitrat-Dehydrogenase	0,5	0,1	**
0967	1587	Fumarase	0,5	0,1	*
1031	1654	put. Benzoat-Transportprotein	0,5	0,1	*
1341	2628	Glutamat-N-Acetyl-Transferase	0,5	0,0	*
1407	2549	Hypothetisches Protein	0,5	0,2	*
1466	2403	ATP/GTP-bindendes Protein	0,5	0,2	*
1524	2485	Triosephosphat-Isomerase	0,5	0,2	*
1876	2041	put. Glutamat-ABC-Transporter, Bindeprotein	0,5	0,2	*
2037	2244	put. Maltooligosyl-trehalose-Synthase	0,5	0,3	*
2453	2916	Phosphogluco-Mutase	0,5	0,2	*
2528	2820	put. Diaminopimelat-Dehydrogenase	0,5	0,1	**
2611	52	hypothetisches Protein	0,5	0,2	*
2655	119	Serin/Threonin-Proteinkinase	0,5	0,2	*
2663- 2664	130	hypothetisches Protein	0,5	0,0	*
2673	141	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase	0,5	0,1	*
0683	1229	hypothetisches Protein	2,0	0,2	*
1219	2799	<i>ilvD</i> - Dihydroxysäure-Dehydratase	2,0	0,8	*
1564	2533	put. Häm-Transport - Permease	2,1	0,4	**
1565	2534	put. Siderophor ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	2,1	0,5	**
2205	3145	GTP-bindendes Protein	2,1	0,2	*
1589	3267	hypothetisches Protein	2,2	1,1	*
2579	12	put. Carboanhydrase	2,2	0,3	*
2616	57	put. Rhodanese-Schwefel-Transferase	2,2	0,6	*
0691	1239	hypothetisches Protein	2,3	0,0	**
1388	2571	Transkriptionsregulator	2,3	1,3	*
1672	3387	hypothetisches Protein	2,3	0,2	*
1848	2006	hypothetisches Protein	2,3	0,3	**
0647	1183	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase	2,6	0,2	*
1447	2380	ATP-Phosphoribosyl-Transferase	2,6	0,3	*
0132	528	hypothetisches Protein	2,8	0,7	*
1816	1963	hypothetisches Protein	2,9	0,4	**
2631- 2632	88	hypothetisches Protein	3,5	0,7	*
1222	2793	<i>ilvB</i> - Acetohydroxysäure-Synthase	4,9	0,4	*
1223- 1224	2791	hypothetisches Protein	5,9	6,1	*
1223	2792	<i>ilvN</i> - Acetohydroxysäure-Synthase	7,1	3,7	**
2632	90	hypothetisches Protein	12,0	2,3	*

Tabelle 15: Ergänzung zu Tabelle 13.

NCgl	ORF	Gene - annotierte Funktionen	Mittel	n	p
0752	1313	Membranprotein	0,11	3	**
2657	122	<i>pta</i> - Phosphotransacetylase	0,34	6	**
1021	1644	Transposase	0,37	6	*
0514- 0515	1016	Acetyltransferase	0,43	6	**
0360	831	Succinat Dehydrogenase - Flavoprotein-Untereinheit	0,46	6	**
2319	66055	Catechol 1,2-Dioxygenase	0,46	6	**
2877	399	Transkriptionsregulator	0,46	6	**
0670	1211	Propionyl-CoA Carboxylase-Untereinheit (Biotin)	0,47	6	**
0697	1245	Trehalose/Maltose-Bindeprotein	0,49	6	**
1139	1783	Nitratreduktase, γ -Untereinheit	0,50	6	**
1021+ 2284+ 2392	3021	Transposase	0,51	6	*
2523	2825	<i>acnR</i>	0,51	6	*
0251	671	Katalase	0,52	6	**
0685	1231	hypothetisches Membran durchspannendes Protein	0,52	5	*
0677	1221	Propionyl-CoA Carboxylase β -Untereinheit	0,53	6	**
0361	832	Succinat Dehydrogenase - Fe-S-Untereinheit	0,54	6	**
0677	1222	Propionyl-CoA Carboxylase β -Untereinheit	0,54	4	**
1518+ 2461	2476	Transposase	0,54	6	**
1625	3618	hypothetisches cytosolisches Protein	0,54	6	**
2439	3472	<i>ftn</i> - Ferritin	0,54	6	**
2319	3723	Catechol 1,2-Dioxygenase	0,55	3	*
1703	3248	Methyltransferase	1,80	6	**
1200	1855	put. Siederophor interagierendes Protein	1,86	6	**
0382	3544	put. Häm-Transport assoziiertes Membranprotein	1,88	6	**
1647	3348	hypothetisches Protein	1,89	6	**
1289	2703	hypothetisches Protein	1,93	5	**
0484	3551	put. Siederophor ABC-Aufnahmesystem, Permease	2,04	3	*
1091	1719	hypothetisches Protein	2,11	6	**
0377	854	put. am Häm-Transport assoziiertes Membranprotein	2,13	5	**
0779	1352	put. Eisentransportprotein, ATPase	2,13	6	**
2434	3480	hypothetisches Protein	2,15	6	**
0481	3548	hypothetisches Protein	2,27	6	**
0483	3550	put. Siederophor ABC-Aufnahmesystem, Permease	2,47	6	**
2972	3460	hypothetisches Membran durchspannendes Protein	2,58	6	**
1250- 1251	2754	hypothetisches Protein	2,64	6	**
0637	1170	put. Eisentransportprotein, Permease	2,65	6	**
0516	1018	LSU Ribosomales Protein L6P	2,66	6	**
2001	2205	hypothetisches Protein	2,83	5	**
0776	1349	put. Eisentransportprotein, Bindeprotein	2,89	6	**
0774	1347	put. Siederophor ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	3,00	5	**
0381	3543	put. Häm-Transport assoziiertes Membranprotein	3,45	3	*
0639	1173	put. Eisenreguliertes Lipoprotein	3,66	5	**
1646	3347	put. abgesonderte Hydrolase	3,83	6	**
0482	3549	put. Siederophor ABC-Aufnahmesystem, ATPase	3,90	6	**
2970	3458	put. Siederophor ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	4,35	6	**
0773	1346	put. Siederophor interagierendes Protein	4,60	6	**
1482	2425	<i>acn</i> - Aconitase	5,70	6	**
1482	5003	eigenes <i>acn</i> -PCR-Produkt	28,41	6	**

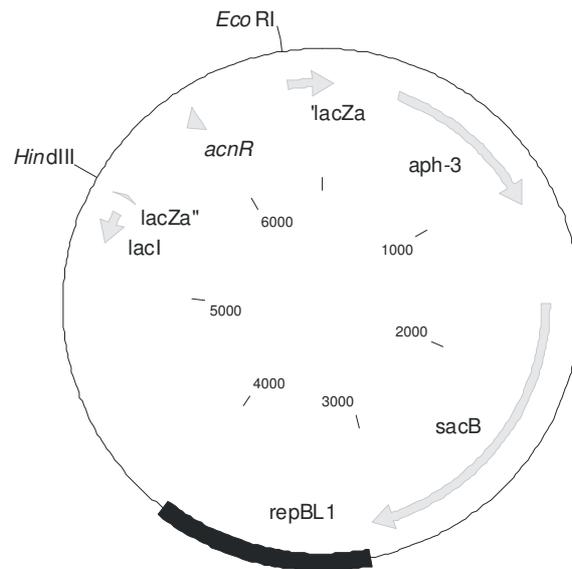


Abbildung 28: Plasmid pK19mobsacB- Δ acnR mit einem 0,94-kb-„Crossover“-PCR-Fragment (Primer tetR-A-for, tetR-B-rev, tetR-C-for und tetR-D-rev) in den *Eco*RI- und *Hind*III-Schnittstellen, das die *acnR*-flankierenden Bereiche umfasst. Für die „in-frame“-Deletion des *acnR*-Gens ins *C. glutamicum*-Genom.

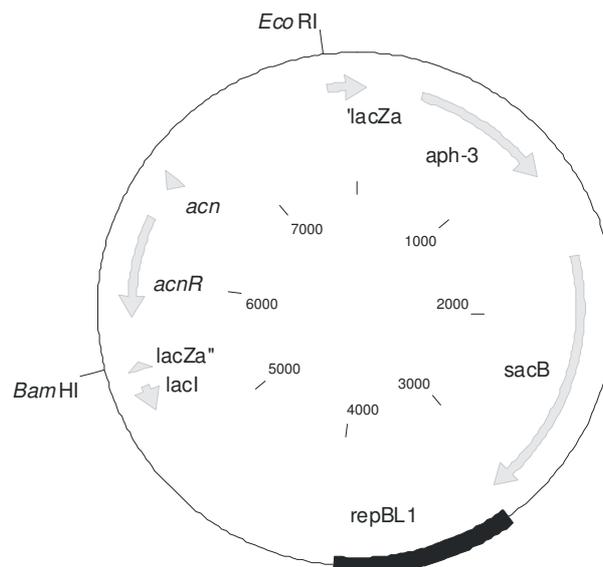


Abbildung 29: Plasmid pK19mobsacB- Δ acn mit einem mit einem 2,08-kb-„Crossover“-PCR-Fragment (Primer acn-A-for-2, acn-B-rev, acn-C-for und acn-D-rev-3) in den *Eco*RI- und *Bam*HI-Schnittstellen, das die *acn*-flankierenden Bereiche umfasst. Für die „in-frame“-Deletion des *acn*-Gens ins *C. glutamicum*-Genom.

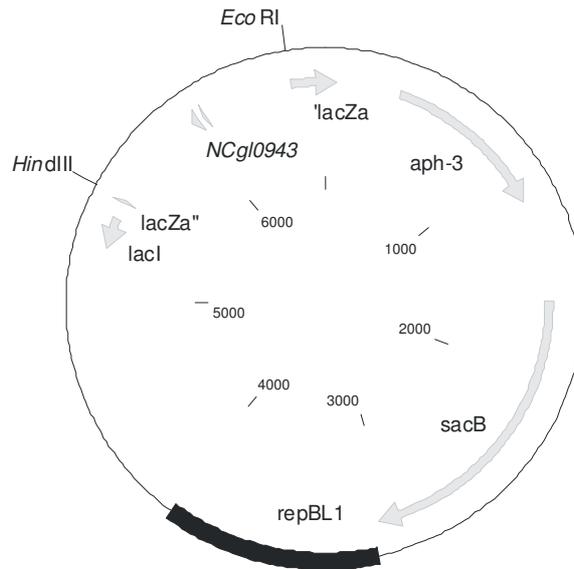


Abbildung 30: Plasmid pK19mobsacB-ΔNCgl0943 mit einem 0,98-kb-„Crossover“-PCR-Fragment (Primer 1558-A-for, 1558-B-rev, 1558-C-for und 1558-D-rev) in den *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen, das die *NCgl0943*-flankierenden Bereiche umfasst. Für die „in-frame“-Deletion des *NCgl0943*-Gens ins *C. glutamicum*-Genom.

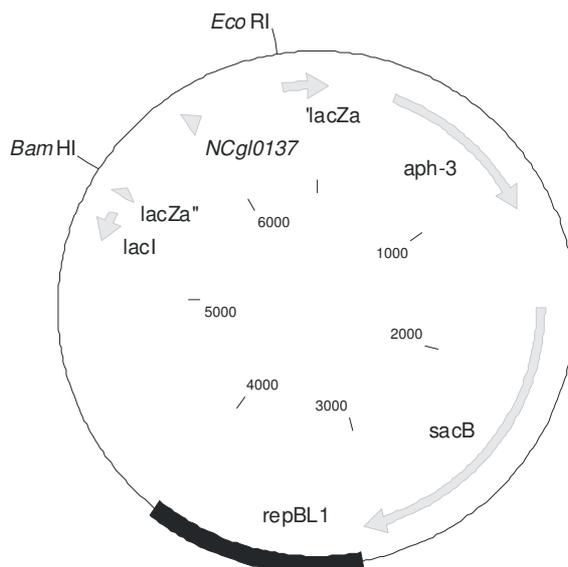


Abbildung 31: Plasmid pK19mobsacB-ΔNCgl0137 mit einem 0,89-kb-„Crossover“-PCR-Fragment (Primer 533-A-for, 533-B-rev, 533-C-for und 533-D-rev-2) in den *BamHI*- und *EcoRI*-Schnittstellen, das die *NCgl0137*-flankierenden Bereiche umfasst. Für die „in-frame“-Deletion des *NCgl0137*-Gens ins *C. glutamicum*-Genom.

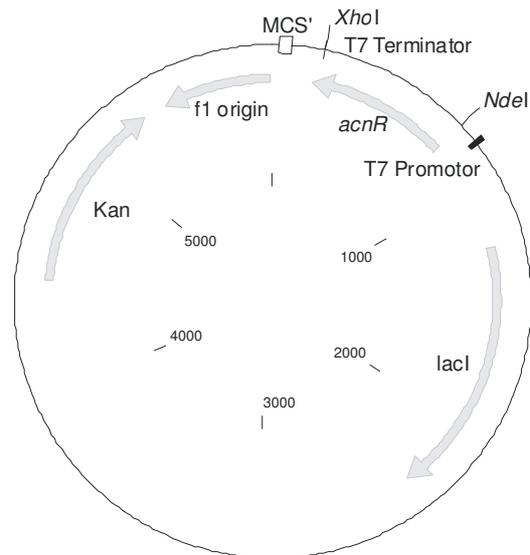


Abbildung 32: Plasmid pET24b-*acnR*-C mit einem 0,57-kb-*NdeI*-*XhoI*-Fragment (Primer *acnR*-FP-for und *acnR*-FP-24rev) mit dem *acnR*-Gen. Für die Überproduktion von AcnR mit C-terminalem Strep-Tag in *E. coli* BL21(DE3).

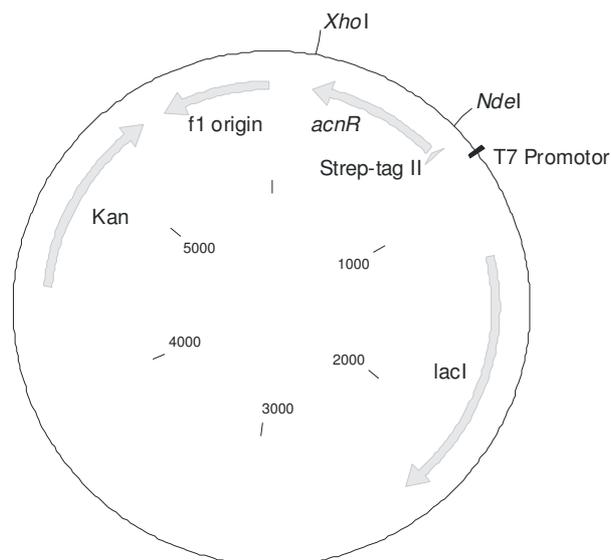


Abbildung 33: Plasmid pET28a-*acnR*-N mit einem 0,57-kb-*NdeI*-*XhoI*-Fragment (Primer *acnR*-FP-for und *acnR*-FP-28rev) mit dem *acnR*-Gen. Für die Überproduktion von AcnR mit N-terminalem Strep-Tag in *E. coli* BL21(DE3).

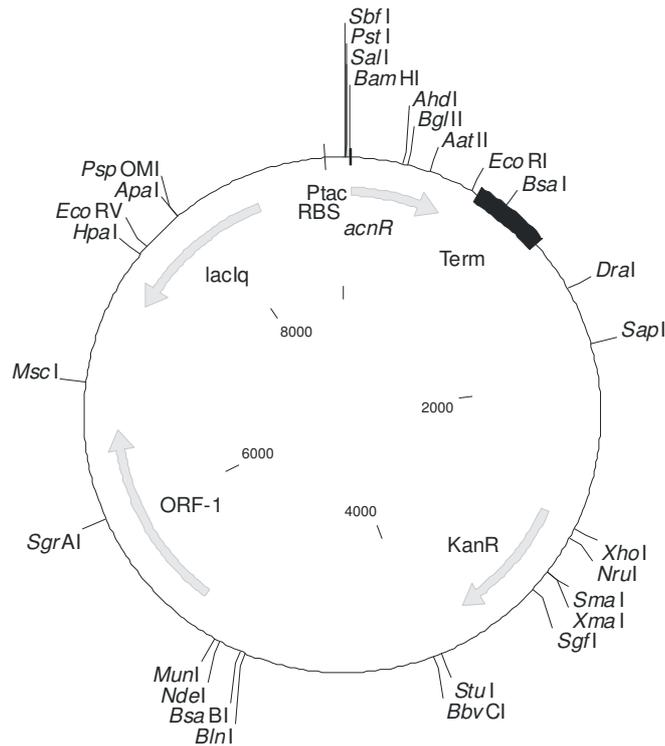


Abbildung 34: Plasmid pEKEx2-*acnR* (Primer *acnR*-for und *acnR*-rev) mit einem 0,7-kb-*Bam*HI-*Eco*RI-Fragment mit dem *acnR*-Gen. Für die Überexpression des *acnR*-Gens in *C. glutamicum* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und mit der Ribosomenbindungsstelle des T7-10-Gens.

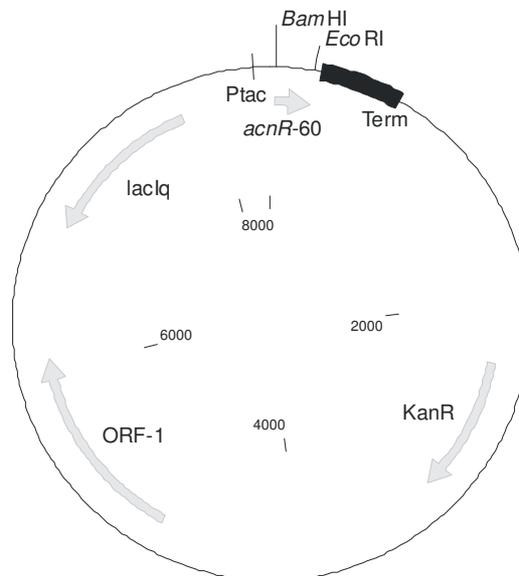


Abbildung 35: Plasmid pEKEx2-*acnR60* (Primer *acnR*-for und *acnR*-rev-60) mit einem 0,2-kb-*Bam*HI-*Eco*RI-Fragment mit einem verkürztem *acnR*-Gen. Für die Überexpression des C-terminal-verkürzten *acnR*-Gens (180 bp) in *C. glutamicum* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und mit der Ribosomenbindungsstelle des T7-10-Gens.

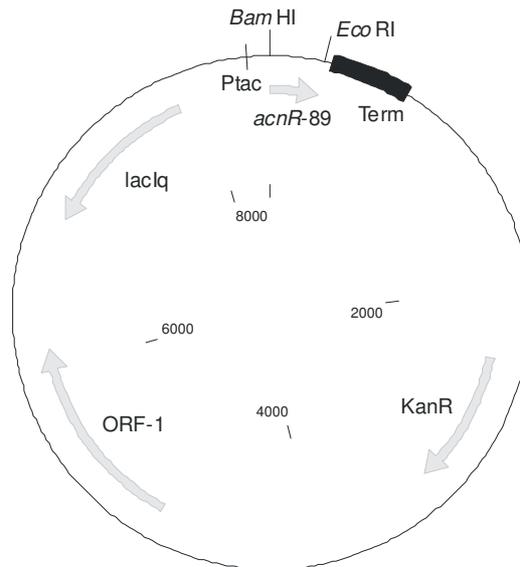


Abbildung 36: Plasmid pEKEx2-*acnR89* (Primer *acnR*-for und *acnR*-rev-89) mit einem 0,29-kb-*Bam*HI-*Eco*RI-Fragment mit einem verkürztem *acnR*-Gen. Für die Überexpression des C-terminal-verkürzten *acnR*-Gens (267 bp) in *C. glutamicum* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und mit der Ribosomenbindungsstelle des T7-10-Gens.

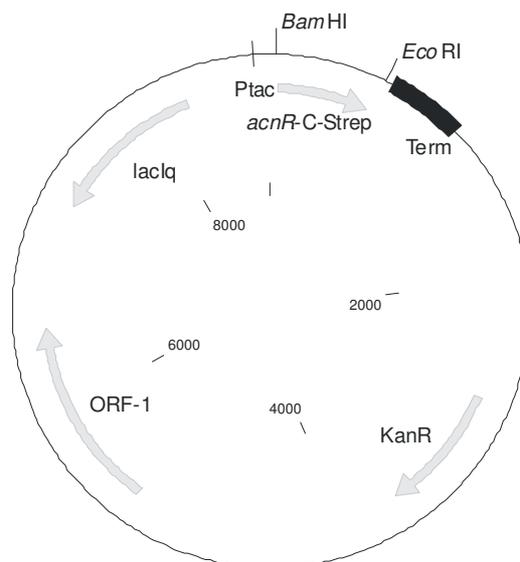


Abbildung 37: Plasmid pEKEx2-*acnR*-C-Strep (Primer *acnR*-for und *acnR*-strep-rev) mit einem 0,62-kb-*Bam*HI-*Eco*RI-Fragment mit dem *acnR*-Gen. Für die Überexpression eines *acnR*-Gens mit C-terminalem StrepTag II in *C. glutamicum* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und mit der Ribosomenbindungsstelle des T7-10-Gens.

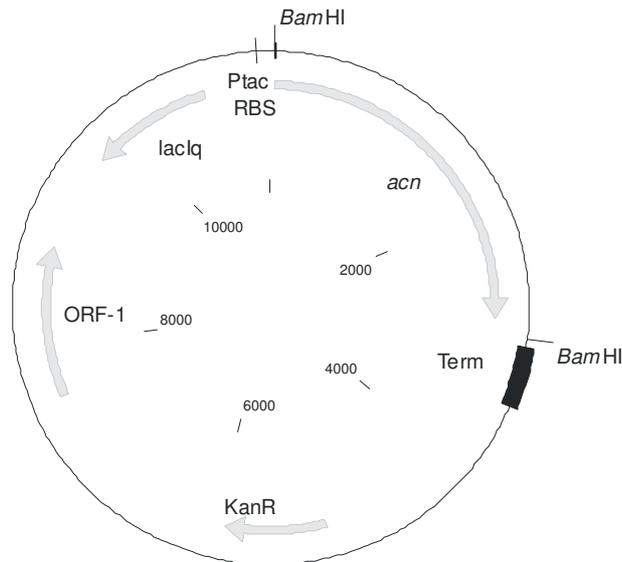


Abbildung 38: Plasmid pEKEx2-*acn* mit einem 2,97-kb-*Bam*HI-Fragment (Primer *acn*-for und *acn*-rev) mit dem *acn*-Gen. Für die Überexpression des *acn*-Gens in *C. glutamicum* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und mit der Ribosomenbindungsstelle des T7-10-Gens.

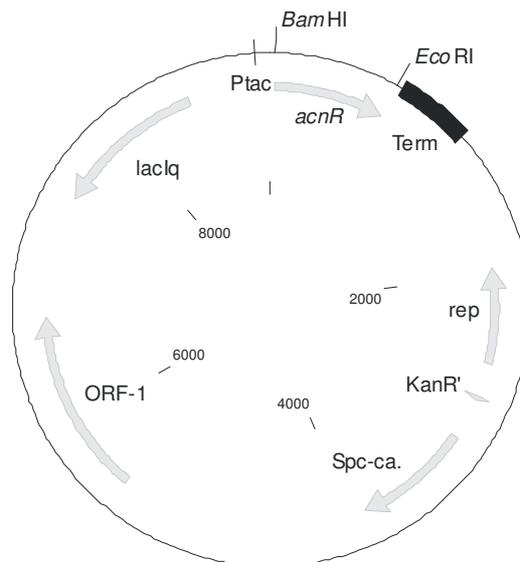


Abbildung 39: Plasmid pEKEx3-*acnR* mit einem 0,7-kb-*Bam*HI-*Eco*RI-Fragment (Primer *acnR*-for und *acnR*-rev) mit dem *acnR*-Gen. Für die Überexpression des *acnR*-Gens in *C. glutamicum* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und mit der Ribosomenbindungsstelle des T7-10-Gens.

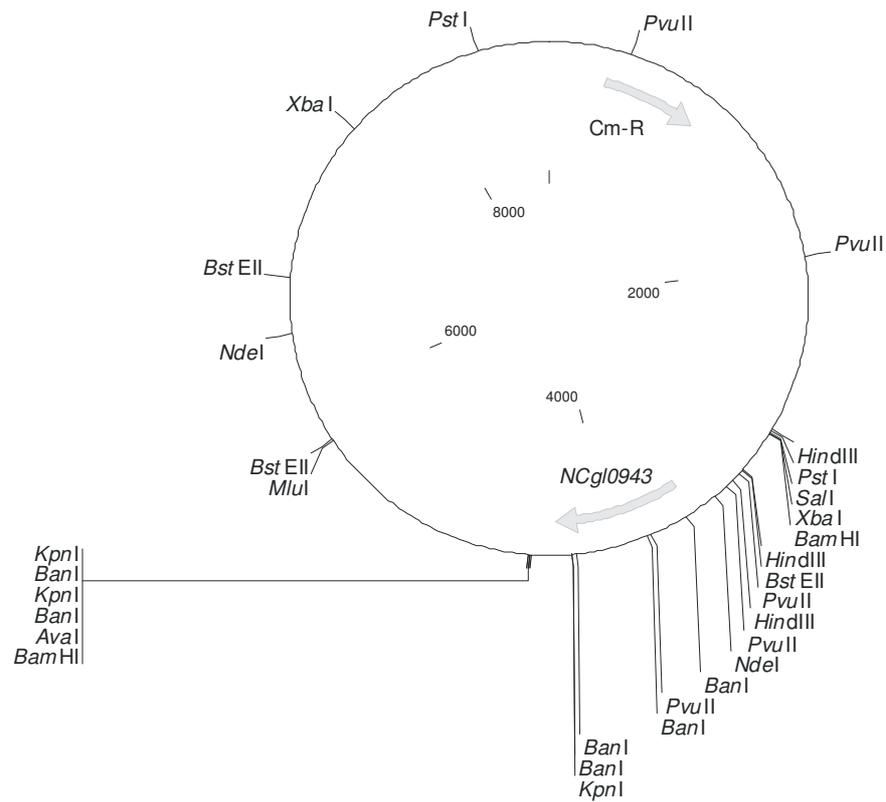


Abbildung 40: Plasmid pEC7-NCgl0137 mit einem 1,5-kb-BamHI-Fragment (Primer 533-for-2 und 533-rev-2) mit dem NCgl0137-Gen. Für die Überexpression des NCgl0137-Gens in *C. glutamicum*.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung, die anregenden Diskussionen und die mir stets gewährte Unterstützung.

Auch Herrn Dr. Volker F. Wendisch danke ich für die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Sahm bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am IBT-1 und seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Doris Rittmann möchte ich mich für die Genom-PCR von *C. glutamicum* bedanken, ohne die die Arbeit mit DNA-Chips nicht möglich gewesen wäre.

Tino, Georg und Christian danke ich für die Einführung in die von Ihnen am Institut etablierte DNA-Chip-Technik und Sabine für die Einweisung in vielerlei Methoden.

Christian danke ich für die produktive Zusammenarbeit im VALPAN-Projekt.

Andrea, Armin, Axel, Brita, Carsten, Christian, Christina, Corinna, Doris, Georg, Gosia, Jens, Kerstin, Marc, Martina, Melanie, Michael, Mirja, Oliver, Sabine, Sarah, Sonja, Steffen, Takeru, Tanja, Tino und Verena danke ich für die gemeinsame Zeit im Labor, im Büro und in der Freizeit.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Biotechnologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Meinen Freunden und Freundinnen auch außerhalb von Jülich gilt mein Dank für die vielen gemeinsamen Jahre und ihr Verständnis, dass ich nicht so oft bei ihnen sein konnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Oma und Esther, die mich während meines Studiums, Diplomarbeit und Doktorarbeit liebevoll unterstützt haben.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Jülich, den 29.10.2004

(Andreas Krug)