

Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Kathrin Corinna Stansen
aus Siegen

Jülich 2005

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

Referent: Prof. Dr. H.Sahm

Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2005

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	2
III. MATERIAL UND METHODEN	10
1. Bakterienstämme und Plasmide	10
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Nährmedien	14
2.3 Kultivierung der Bakterien	15
2.4 Stammhaltung	15
2.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika	16
2.6 Induktion der Glutamatausscheidung	16
2.7 Temperatur-induzierte Glutamatausscheidung im Chemostat	17
2.8 Ausscheidung von L-Glutamat nach osmotischem Schock.....	18
3. Molekulargenetische Methoden	18
3.1 Isolierung genomischer DNA	18
3.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
3.3 Isolierung von RNA.....	19
3.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	19
3.5 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA	19
3.6 Polymerasekettenreaktion	20
3.7 Konstruktion von Integrations- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	21
3.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
3.8.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung von DNA	22
3.8.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese	23
3.9 Transformation von Bakterien	23
3.9.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
3.9.2 Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	23
3.10 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen	24
4. reverse Transkriptase-PCR.....	25

5. Biochemische Methoden.....	26
5.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten	26
5.1.1 Herstellung von Enzymrohextrakten	26
5.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
5.1.3 Bestimmung der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase -Aktivität (EC 1.1.2.3)	26
5.2 Bestimmung von Metaboliten	27
5.2.1 Silikonölzentrifugation	27
5.2.2 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed phase</i> HPLC	28
5.2.3 Bestimmung von Glucose	29
5.2.4 Bestimmung von L-Lactat	29
6. Bestimmung von Zellgrößen mittels Durchflusscytometrie	30
7. DNA-Chip-Technologie.....	30
7.1 Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -DNA-Chips.....	31
7.2 Nachbehandlung von DNA-Chips	32
7.3 Synthese fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden	32
7.3.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	32
7.3.2 Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA	33
7.4 DNA-Chip-Hybridisierung	33
7.5 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	33
7.6 Normierung und statistische Analyse von Chip-Daten	34
7.7 Archivierung von DNA-Chip-Daten	35
7.8 Hierarchische Clusteranalyse	35
IV. ERGEBNISSE	36
1. Einfluss von L-Glutamat auf das Wachstum und die Genexpression von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	36
2. Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mittels DNA-Chip-Analysen.....	37
2.1 Einfluss von Stimuli auf Wachstum und Glutamatausscheidung.....	37
2.1.1 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel	39
2.1.2 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Ethambutol	40

2.1.3	Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Penicillin G	47
2.1.4	Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Tween40	48
2.2	Identifizierung von Transkriptommustern	50
3.	Charakterisierung der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung von <i>C. glutamicum</i> 2262.....	53
3.1	Kontinuierliche Fermentation von <i>C. glutamicum</i> 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP	53
3.2	Vergleichende Transkriptomanalyse des L-Glutamat-produzierenden Stammes <i>C. glutamicum</i> 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP	57
3.3	Konstruktion einer <i>NCgl2816</i> -Inaktivierungsmutante in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	60
3.4	Überexpression von <i>NCgl2817</i> in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>C. glutamicum</i> 13032:: <i>NCgl2816</i>	62
3.5	Vergleichende Transkriptomanalyse nach Wachstum von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 auf L-Lactat und Pyruvat.....	65
3.6	Untersuchungen zur Transkription von <i>NCgl2816</i> und <i>lldD</i>	68
4.	Untersuchungen zum Einfluss von Membranproteinen auf die Ausscheidung von L-Glutamat.....	69
4.1	Einfluss der Disruption von Genen, die während der Glutamatausscheidung differentiell exprimiert wurden.....	69
4.2	Einfluss der <i>NCgl2566</i> -Deletion auf die Ausscheidung von L-Glutamat	74
4.3	Vergleichende Genomanalysen der Stämme <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. efficiens</i> und <i>C. glutamicum</i>	76
5.	Untersuchungen zum Einfluss der Osmolalität des Mediums auf die Glutamatausscheidung von <i>C. glutamicum</i> 13032.....	80
V.	DISKUSSION.....	82
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	95
VII.	ANHANG	109

ABKÜRZUNGEN

∅	Durchmesser / Mittelwert
Ω	Ohm (Widerstand)
λ	Lambda / Wellenlänge
ε	Extinktionskoeffizient
λ _{EM max}	Wellenlänge maximaler Emission
λ _{EX max}	Wellenlänge maximaler Extinktion
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶) / Wachstumsrate (h ⁻¹)
A	Adenin / Ampere
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Farad (elektrische Kapazität)
FMN	Flavinadeninmononukleotid
<i>g</i>	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazidin-N'-2-ethansulfonsäure
HK	Hexokinase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
k	Kilo (10 ³)
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	molar (mol/l)

m	milli- (10^{-3}) / meter
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 einer Wellenlänge von x nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec ^R	Spectinomycin-Resistenz
T	Thymin
t	Tonne
TAE	Tris-Acetat/EDAT-Puffer
TC	<i>transport classification</i>
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniumethan
U	<i>Unit</i> ; Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt (Spannung)
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	Watt (Leistung)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

I. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* werden jährlich 1,5 Millionen Tonnen L-Glutamat produziert. Dennoch konnte bislang weder ein L-Glutamat-Exporter identifiziert werden, noch ist genau verstanden, warum die Exkretion von L-Glutamat immer erst nach Induktion durch verschiedenste Auslöser erfolgt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit fünf Methoden der Glutamatausscheidung etabliert und die genomweiten Genexpressionsmuster unter diesen Induktionsbedingungen quantifiziert.

Durch die Auslöser der Glutamatausscheidung Ethambutol und Tween40 wurden 74 bzw. 137 Gene differentiell exprimiert, durch Biotin-Mangel und Penicillin aber nur 19 bzw. 18 Gene. Überraschenderweise zeigte sich kein Expressionsmuster, welches unabhängig von der Art der Induktion stets bei der Ausscheidung von L-Glutamat auftritt. Ebenso überraschend war, dass trotz stark verändertem Zentralstoffwechsel während der Ausscheidung von L-Glutamat keine veränderte Expression von Genen z.B. der Enzyme des Pentosephosphatwegs oder der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase auftritt, was eher auf eine Regulation der Stoffflüsse auf Protein-, bzw. Aktivitätsebene schließen lässt.

Es gab jedoch spezifische und teilweise sogar extreme Expressionsveränderungen. So führten Ethambutol und Tween40 zu einem bis zu 31-fach erhöhten mRNA-Spiegel von *mepA*, das vermutlich für eine Metalloendopeptidase kodiert, und zu einem zweifach reduzierten mRNA-Spiegel von *accBC*, welches für die α -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase kodiert. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Beeinflussung der Zellwandstruktur unter diesen Induktionsbedingungen. Auch das für einen mechanosensitiven Kanal der Osmoregulation kodierende *yggB* wurde durch Ethambutol und Tween40 bis zu vierfach verstärkt exprimiert. Durch zusätzliche Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Art der Induktion hyperosmotischer Schock die Exkretion drastisch reduziert, während hypoosmotischer Stress die Ausscheidung steigert. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass der noch zu identifizierende L-Glutamat-Exporter durch die Membranspannung in seiner Aktivität beeinflusst wird, worüber auch ein Zusammenhang mit der Zellwand als bekannter Wirkort der verschiedenen Auslöser der Glutamatausscheidung hergestellt werden könnte.

Die genomweiten Expressionsanalysen ergaben, dass 13 Gene, die für putative Transporter und Membranproteine kodieren, nach Induktion der Glutamatausscheidung verstärkt exprimiert werden. Durch Inaktivierung konnte für die meisten dieser Gene gezeigt werden, dass sie weder die Ausscheidung von L-Glutamat noch das Wachstum beeinflussen. Diese Gene sind somit als nicht-essentiell zu betrachten. Die Inaktivierung des Gens *NCgl0944* führte zu einer deutlichen Reduktion der L-Glutamat-Exkretion nach Induktion durch Biotin-Mangel, Ethambutol und Penicillin. Eine weitere Mutante, in der das Gen *NCgl2566* deletiert war, exkretierte dagegen nach Induktion durch Tween40 kaum noch L-Glutamat. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass diese zwei Transporter direkt oder indirekt in die Glutamatausscheidung involviert sind.

Während der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung wurden die zwei benachbart liegenden Gene *NCgl2816* und *NCgl2817* verstärkt exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Gene durch L-Lactat induziert werden und als Operon vorliegen. Enzymtests zeigten, dass *NCgl2817* für eine L-Lactat-Dehydrogenase kodiert. Das Enzym oxidiert L-Lactat Quinon-abhängig zu Pyruvat und weist einen K_m -Wert von 0,5 mM für das einzige Substrat L-Lactat auf. Die Analyse einer Inaktivierungsmutante ergab, dass dieses *lldD* genannte Gen die Verwertung von L-Lactat essentiell ist, wogegen das kotranskribierte Gen sehr wahrscheinlich die L-Lactat-Aufnahme katalysiert.

II. EINLEITUNG

Corynebacterium glutamicum

1908 identifizierte Kikunae Ikeda, Professor der Tokio Universität und späterer Gründer der Firma Ajinomoto, Mononatrium-Glutamat als die Hauptgeschmackskomponente der traditionell in der japanischen Küche verwendeten Alge *kon-bu* (*Laminaria japonica*) (Ikeda, 2002). Der von Ikeda als *umami* bezeichnete Geschmack von Mononatrium-Glutamat gilt in der japanischen Kultur neben süß, salzig, sauer und bitter als fünfte Geschmacksqualität. Mononatrium-Glutamat ist heute einer der weltweit gebräuchlichsten Geschmacksverstärker mit einer jährlichen Produktion von etwa 1,5 Millionen Tonnen (Hermann, 2003).

Als Mononatrium-Glutamat 1909 von der Firma Ajinomoto erstmals auf den Markt gebracht wurde, erfolgte die Produktion noch durch saure Hydrolyse von Weizen, Soja und anderen pflanzlichen Proteinquellen. Da das Verfahren zu dieser Zeit jedoch äußerst unökonomisch war und die steigende Nachfrage nicht decken konnte, suchte man nach adäquaten Alternativen. Für die Herstellung von L-Glutamat konnte ein Biotin-auxotrophes Bakterium isoliert werden, das bis zu 10 mg/ml Glutamat akkumulierte (Kinoshita *et al.*, 1957; Udaka, 1960). Dieses Gram-positive Bodenbakterium, *Corynebacterium glutamicum*, ist unbeweglich, nicht sporulierend, Katalase-positiv, zeigt keine Säurefestigkeit in der Ziehl-Neelsen-Färbung und zeichnet sich durch eine unregelmäßige, stäbchen- bis keulenförmige Morphologie aus (*κορυμβή* für griechisch Keule) (Abe *et al.*, 1967). Wie Shiio *et al.* (1962) feststellen konnten, lässt sich die Glutamatausscheidung bei *C. glutamicum* durch Biotin-Mangel induzieren.

Aufbau der Plasmamembran und Zellwand von *C. glutamicum*

Die Gattung *Corynebacterium* wird taxonomisch der Familie der *Corynebacteriaceae* in der Unterordnung der *Corynebacterianae* zugeordnet. In Anlehnung an die bekanntesten Repräsentanten dieser Unterordnung, die zu den Familien *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* und *Nocardiaceae* zählen, wird diese Gruppe von Bakterien auch kollektiv unter der Bezeichnung CMN-Bakterien zusammengefasst (Stackebrandt *et al.*, 1997). *Corynebacterianae* zeichnen sich durch einzigartige Zellwandkomponenten aus, die diesen Bakterien ihre charakteristische Zellwandarchitektur verleihen (Daffé & Draper, 1998; Eggeling & Sahm, 2001; Marienfeld *et al.*, 1997; Puech *et al.*, 2001; Sutcliffe, 1997). Das vermutlich wichtigste Merkmal dieses Taxons ist das Vorhandensein von Mycolsäuren (Barksdale *et al.*, 1981; Goodfellow, 1992). Diese Fettsäurederivate bilden eine Lipiddoppelschicht, die der Zelle eine zweite, äußere Umhüllung verleiht (Minnikin *et al.*, 1987) und eine

zusätzliche Permeationsbarriere darstellt (Brennan & Nikaido, 1995; Dubnau *et al.*, 2000; George *et al.*, 1995; Puech *et al.*, 2000).

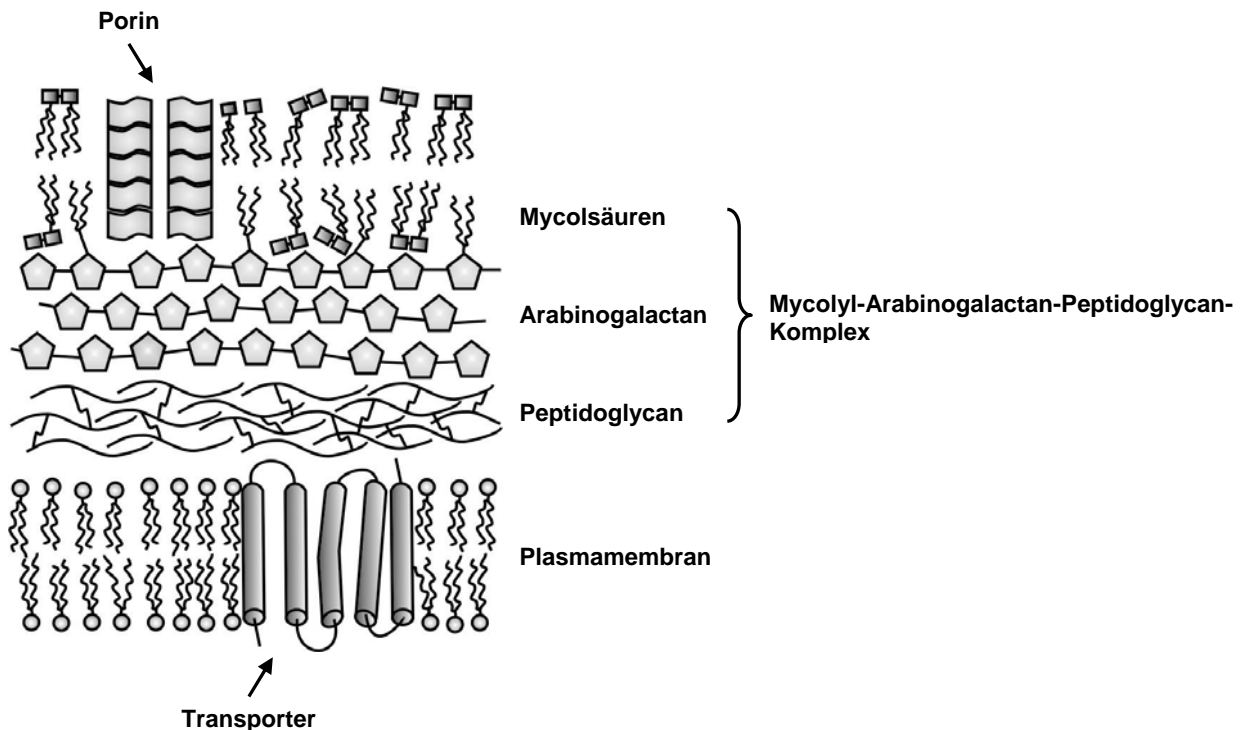


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Zellwand in *Corynebacteriaceae* (Radmacher, 2004).

Der Aufbau der Plasmamembran und Zellwand der *Corynebacteriaceae* ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die Grundstruktur der corynebakteriellen Plasmamembran unterscheidet sich nicht von den Plasmamembranen anderer Bakterien. Polare Lipide bilden zusammen mit Proteinen eine Lipiddoppelschicht (Abb. 1). In *C. glutamicum* sind Palmitat (16:0) und Oleat (18:1) die dominierenden Fettsäuren (Minnikin *et al.*, 1987). 80% der membranständigen Phospholipide enthalten Phosphatidylglycerol, gefolgt von Diphosphatidylglycerol (Cardiolipin), Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositoldimannosiden (Hoischen & Krämer, 1990; Nampoothiri *et al.*, 2002; Puech *et al.*, 2001). Zusätzlich weist *C. glutamicum* komplexe Glycolipide wie Lipomannan und wahrscheinlich auch geringe Anteile von Lipoarabinomannan auf (Gibson *et al.*, 2003; Puech *et al.*, 2001).

Das Peptidoglycan (Abb. 1) setzt sich aus alternierenden β -1,4-N-Acetyl-Glucosamin- und N-Acetyl-Muraminsäureresten zusammen, wobei die Carboxylgruppen der Muraminsäure mit dem Tetrapeptid L-Alanyl-D-isoglutaminyL-meso-diaminopimelyl-D-alanin verknüpft sind (Schleifer & Kandler, 1972). Bei *Corynebacteriaceae* ist das Peptidoglycan über einen Rhamnose-Rest mit dem Heteropolysaccharid Arabinogalactan verestert. Das Arabinogalactan von *C. glutamicum* und *Mycobacterium tuberculosis* ist sehr ähnlich aufgebaut und besteht hauptsächlich aus D-Arabinofuranosyl- und D-Galactosyl-Resten. Alternierende

β -1 \rightarrow 5- und β -1 \rightarrow 6-verknüpfte Galactofuranosyl-Einheiten bilden ein lineares Rückgrat, von dem zusätzliche Arabinose-Seitenketten ausgehen (Brennan & Nikaido, 1995). Die terminalen Arabinose-Reste des Arabinogalactans sind zum Teil mit Mycolsäuren (α -Alkyl- β -hydroxy-Fettsäuren) verestert (Abb. 1), so dass ein kovalent verknüpfter Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex entsteht. Darüber hinaus sind auch freie Mycol-säuren in Form von Trehalosemonomycolat und Trehalosedimycolat vorhanden (Puech *et al.*, 2001). Es ist davon auszugehen, dass sie zusammen mit den kovalent an Arabinogalactan gebundenen Mycolsäuren die äußere, zweite Lipidschicht der *Corynebacteriaceae* bilden (Puech *et al.*, 2001).

Export von Aminosäuren in *C. glutamicum*

Sowohl in der Plasmamembran als auch in der Mycolylschicht der *Corynebacteriaceae* finden sich Proteine zur Translokation einer Vielzahl von Verbindungen (Abb. 2). Anhand des sequenzierten Genoms von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Kalinowski *et al.*, 2003) konnten bereits über 250 offene Leserahmen identifiziert werden, deren abgeleitete Proteinsequenzen Homologie zu bekannten Transportsystemen aufweisen (Busch & Saier, 2002; Saier, 2000).

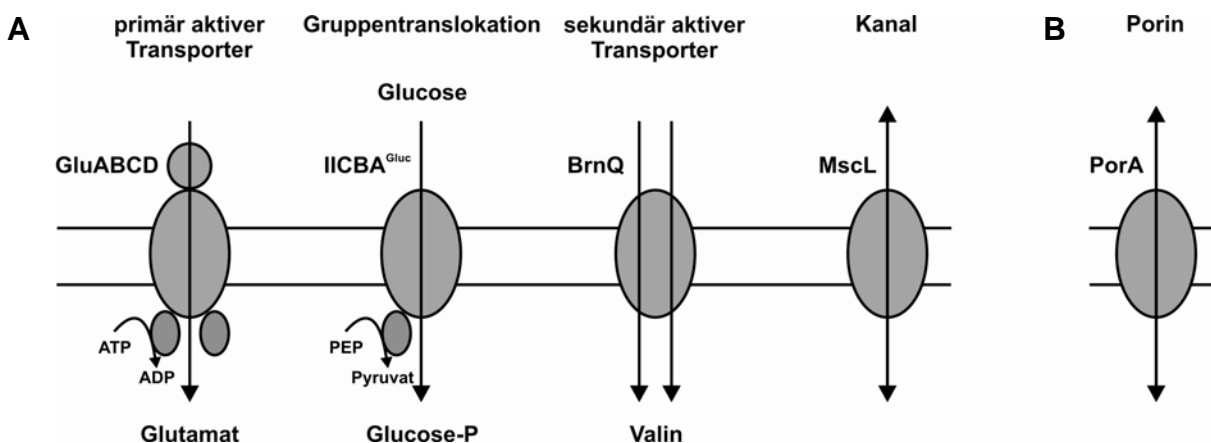


Abbildung 2: Transporter-Typen der Plasmamembran (A) und in der äußeren Mycolylschicht (B) der *Corynebacteriaceae*. Repräsentativ dargestellt werden bekannte Transporter-Typen in *C. glutamicum*. In der Plasmamembran sind (1) das L-Glutamat-Aufnahmesystem GluABCD (Kronmeyer *et al.*, 1995), (2) das Glucose-Phosphotransferase-System (PTS), IICBA^{Glu} (Malin *et al.*, 1991), (3) das BrnQ-Efflux-System für verzweigt-kettige Aminosäuren (Ebbighausen *et al.*, 1989) und (4) der an der Osmoregulation beteiligte MscL-Kanal (Nottebrock *et al.*, 2003) lokalisiert. In der äußeren Mycolylschicht liegt das Porin PorA (Lichtinger *et al.*, 2001).

Während die Aufnahme von Soluten in vielerlei Hinsicht sehr gut untersucht ist, trifft dies weit seltener auf den Export zu. In einigen Fällen ist bekannt, dass dem Export eine ebenso essentielle Funktion zukommen kann wie dem Import. So muss beispielsweise das während

der Milchsäuregärung in *Lactococcus lactis* entstehende Gärungsprodukt L-Lactat aktiv ausgeschieden werden (Poolman *et al.*, 1991). Andere Exporter ermöglichen dagegen das Wachstum in Anwesenheit toxischer Verbindungen und spielen eine wichtige Rolle in der Antibiotikaresistenz bei Bakterien (Putman *et al.*, 2000), wie etwa das kürzlich aus *Escherichia coli* isolierte AcrAB-TolC-System, welches toxische β -Lactam-Antibiotika aus der Zelle hinaus transportiert (Murakami *et al.*, 2002). Weit weniger verstanden ist hingegen der Export von so lebenswichtigen Substanzen wie Zuckern und Aminosäuren.

Da *C. glutamicum* jedoch als Aminosäure-Produzent bekannt ist, besteht gerade an der Identifizierung der Vorgänge während des Exports von Aminosäuren und der daran beteiligten Gene ein großes Interesse. Für die Aminosäuren L-Glutamat (Hoischen & Krämer, 1989), L-Lysin (Bröer & Krämer, 1991), L-Isoleucin (Zittrich & Krämer, 1994) und L-Threonin (Palmieri *et al.*, 1996) konnten in *C. glutamicum* bereits aktive Transportprozesse nachgewiesen werden. Im Fall der hydrophoben, verzweigt-kettigen Aminosäuren (Zittrich & Krämer, 1994) und L-Threonin (Palmieri *et al.*, 1996) spielt außerdem Diffusion eine wichtige Rolle, für L-Tyrosin und L-Phenylalanin scheint sie sogar der einzige Mechanismus zur Exkretion zu sein (Burkovski & Krämer, 2002).

Im Zuge der Untersuchungen zur Aminosäureproduktion von *C. glutamicum* wurden inzwischen die Aminosäure-Exporter BrnFE (verzweigt-kettige Aminosäuren), LysE (L-Lysin) und ThrE (L-Threonin) molekular identifiziert und charakterisiert (Kennerknecht *et al.*, 2002; Simic *et al.*, 2002; Vrljic *et al.*, 1996). LysE war das erste aus Bakterien isolierte Aminosäure-Exportsystem und repräsentiert eine neue Superfamilie von Translokatoren, die entsprechend als LysE-Superfamilie bezeichnet wird. Das 25 kDa große, membranständige Protein LysE aus *C. glutamicum* katalysiert den Export von L-Lysin und L-Arginin (Vrljic *et al.*, 1996). Seine Regulation erfolgt sowohl auf Transkriptions- (Bellmann *et al.*, 2001), als auch auf Aktivitätsebene (Bröer & Krämer, 1991). Physiologisch betrachtet dient LysE dem Export überschüssigen L-Lysins zur Vermeidung toxischer intrazellulärer Konzentrationen von *C. glutamicum*, etwa bei der Nutzung von Dipeptiden, da L-Lysin nicht katabolisiert werden kann. Neben dem beschriebenen Exporter existiert außerdem ein System zur Aufnahme von L-Lysin (LysI) (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991), welches L-Lysin im Austausch gegen L-Alanin, L-Valin oder L-Leucin aufnimmt (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu L-Glutamat, das bereits vom Wildtyp-Stamm gebildet wird, erfolgt die L-Lysin-Bildung allerdings erst nach einer genetischen Veränderung des Organismus (z.B. Schruppf *et al.* (1992)).

Überflusmetabolismus und Export von L-Glutamat

Während sowohl die Aufnahme als auch die Exkretion von L-Lysin gut untersucht sind, konnte hinsichtlich L-Glutamat bisher nur die Aufnahme eingehend charakterisiert werden. Aufgrund der Ladung von L-Glutamat erfolgt die Diffusion durch die Cytoplasmamembran nur sehr langsam und spielt mit einer Rate erster Ordnung von höchstens $0,001 \text{ min}^{-1}$ unter physiologischen Bedingungen keine Rolle (Krämer *et al.*, 1994). Die Translokation dieser Aminosäure muss daher hauptsächlich aktiv erfolgen. In *C. glutamicum* sind zwei L-Glutamat-Aufnahmesysteme molekular und biochemisch bereits gut charakterisiert: Ein hoch-aktives ABC-Transportersystem (GluABCD) mit einer V_{\max} von $16 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg TG}^{-1}$ (Krämer & Lambert, 1990; Kronemeyer *et al.*, 1995) sowie ein sekundär aktives Carrierprotein (GltS) mit einer V_{\max} von etwa $15 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg TG}^{-1}$ (Burkovski *et al.*, 1996; Trötschel *et al.*, 2003).

Der primär aktive ABC-Transporter ist unter L-Glutamat-Exkretionsbedingungen mit Glucose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle inaktiv, da er durch Katabolit-Repression kontrolliert wird (Kronemeyer *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *gluABCD*-Operons keinen Einfluss auf die Ausscheidung von L-Glutamat hat (Kronemeyer *et al.*, 1995). Eine Beteiligung an der Wiederaufnahme ausgeschiedenen Produkts kann somit ebenso ausgeschlossen werden wie auch die Exkretion von L-Glutamat durch Inversion dieses Aufnahmesystems gemäß der Hypothese von Clement *et al.* (1984). Dem GluABCD-Transporter kommt vielmehr eine essentielle Rolle während des Wachstums von *C. glutamicum* auf L-Glutamat als Energie- und Stickstoffquelle zu (Krämer & Lambert, 1990; Kronemeyer *et al.*, 1995). Die Charakterisierung des Natrium-abhängigen, sekundär aktiven Systems GltS zeigte dagegen einen schwachen, aber signifikanten Einfluss auf die Ausscheidung von L-Glutamat. Während eine Deletion von *gltS* die Produktionsrate erhöhte, sank sie bei entsprechender Überexpression (Trötschel *et al.*, 2003). Offensichtlich katalysiert GltS die Wiederaufnahme von L-Glutamat und verursacht auf diese Weise einen Substratzyklus, wobei unklar ist, auf welche Weise dieser Importer reguliert wird.

Interessanterweise muss die Ausscheidung von L-Glutamat bei *C. glutamicum* immer induziert werden, z.B. durch Zugabe von Antibiotika, Chemotherapeutika, Lokalanästhetika und Detergentien oder durch Biotin-Mangel (Duperray *et al.*, 1992; Lambert *et al.*, 1995; Lapujade *et al.*, 1999; Nunheimer *et al.*, 1970; Radmacher, 2004; Shiio *et al.*, 1962; Takinami *et al.*, 1968). Einige *C. glutamicum*-Stämme produzieren L-Glutamat auch nach Induktion durch einen Temperaturschock. Bereits 1978 isolierten Momose und Takagi (Momose & Takagi, 1978) eine Mutante, die nach einer Erhöhung der Temperatur von 30 auf 40°C bei Fermentation in Biotin-reichem Medium 20 g/l L-Glutamat ausschied. 1989 beschrieben Sun *et al.* eine temperatursensitive *C. crenatum*-Mutante, die bis zu 60 g/l L-Glutamat bildete.

Inzwischen wurde ein *C. glutamicum*-Stamm (*C. glutamicum* 2262) beschrieben, der nach Erhöhung der Temperatur von 33 auf 39°C hohe L-Glutamat-Titer von 85 g/l im Medium produzierte.

Die gegenwärtige Hypothese zur Ausscheidung von L-Glutamat bei *C. glutamicum* geht [1] von einem aktiven Export durch die Cytoplasmamembran, [2] einer Modulation des Export-Carriers durch die Lipidumgebung und möglicherweise [3] einer erleichterten Translokation von L-Glutamat durch die Mycolsäureschicht aus (Eggeling & Sahm, 2001). Es gibt jedoch kein schlüssiges Modell, welches die Glutamatausscheidung und die Vielzahl der Induktionsbedingungen auf molekularer Ebene erklären kann. Ein Exportsystem konnte bisher nicht identifiziert werden. Alle biochemischen Daten zum Mechanismus der Translokation von L-Glutamat weisen jedoch auf eine Ausscheidung über ein aktives, spezifisches L-Glutamat-Exportsystem hin, da die Translokation Aminosäure-spezifisch und unabhängig vom Membranpotential ist, gegen ein chemisches Konzentrationsgefälle erfolgen kann und mit dem Energiehaushalt der Zelle korreliert (Gutmann *et al.*, 1992; Gutmann, 1993; Hoischen & Krämer, 1990).

Die bisherigen Untersuchungen deuten außerdem darauf hin, dass die Glutamatausscheidung von *C. glutamicum* erst als Folge einer veränderten Zusammensetzung der Plasmamembran eintritt (Eggeling *et al.*, 2001). So konnte z.B. gezeigt werden, dass unter Biotin-Mangel Lipidgehalt und Zusammensetzung der Membran verändert sind (Hoischen & Krämer, 1990). Außerdem wurde nach gezielter Expression von Genen der Phospholipidsynthese (*gpsA*, *plsC*, *cdsA*, *pgsA2* und *cls*) eine Korrelation zwischen der Lipidzusammensetzung der Zelle und der Ausscheidung von L-Glutamat beobachtet (Nampoothiri *et al.*, 2002). Da Phospholipide in *C. glutamicum* generell nur in der Plasmamembran auftreten, wäre eine Modulation der Exporter-Aktivität durch seine Lipidumgebung denkbar. In der Tat gibt es aus anderen Bakterien Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung der Plasmamembran die kinetischen Eigenschaften von Exportern beeinflusst (Aboulwafa & Saier, 2002). Beispielsweise konnte für die Phenylalanin-Permease PheP aus *E. coli* gezeigt werden, dass ihre Konformation und Aktivität von der Phospholipidzusammensetzung der Membran abhängt (Zhang *et al.*, 2003b). Untersuchungen zur Lactose-Permease LacY aus *E. coli* weisen darauf hin, dass selbst die Orientierung einzelner Domänen von der Lipidumgebung moduliert werden kann (Wang *et al.*, 2002). Veränderungen der Membranzusammensetzung beeinflussen genauso wie Turgoränderungen die Membranspannung (Cantor, 1999; Martinac *et al.*, 1990; Sheetz & Singer, 1974). Ein gut untersuchtes Beispiel für ein Transportsystem, dessen Aktivierung durch Erhöhung der Membranspannung erfolgt, ist der an der Osmoregulation beteiligte mechanosensitive Kanal MscL aus *E. coli* (Sukharev *et al.*,

1994). Die Beobachtung, dass die Ausscheidung von L-Glutamat bei *C. glutamicum* nach Induktion durch Lokalanästhetika durch Veränderungen des osmotischen Gradienten beeinflusst werden kann (Lambert *et al.*, 1995), könnte darauf hindeuten, dass die Aktivität des Exporters über die Membranspannung reguliert wird.

Auch der als zusätzliche Stoffbarriere dienende Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex könnte bei der Aminosäureexkretion von *C. glutamicum* eine Rolle spielen. Hinweise darauf geben zum Beispiel Untersuchungen zur Ethambutol-induzierten Glutamatausscheidung bei *C. glutamicum* (Radmacher, 2004; Radmacher & Stansen *et al.* 2005). Ethambutol, dessen antituberkuläre Aktivität bereits 1961 beschrieben wurde (Thomas *et al.*, 1961), greift vermutlich durch Interaktion mit Arabinosyltransferasen in die Arabinogalactan-Synthese und somit in die Zellwandstruktur ein (Belanger *et al.*, 1996; Mikusova *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Eingriff in die Expression von Genen der Mycolsäure-, Arabinogalactan- und Peptidoglycan-Synthese mit einer veränderten Glutamatausscheidung korreliert (Eggeling *et al.*, 2001; Hirasawa *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 1997; Nampootheri *et al.*, 2002; Radmacher *et al.*, 2004; Radmacher & Stansen *et al.*, 2005). Möglicherweise wird durch die Destabilisierung des Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes die Translokation von L-Glutamat über die Zellwand erleichtert (Eggeling & Sahm, 2001).

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass die Ausscheidung von L-Glutamat mit Veränderungen des Zentralstoffwechsels einhergeht (Delaunay *et al.*, 1999; Delaunay *et al.*, 2004; Hoischen & Krämer, 1990; Marx *et al.*, 1997; Peters-Wendisch *et al.*, 2001; Shiio *et al.*, 1963; Takinami *et al.*, 1968). Der hierbei entstehende Überflussmetabolismus (Kimura, 2003) begünstigt die Ausscheidung der Aminosäure. Die Reaktionen mit besonderer Relevanz für die Biosynthese von L-Glutamat sind in Abbildung 3 skizziert. Für die Synthese von L-Glutamat spielt die Umsetzung von α -Ketoglutarat eine entscheidende Rolle, da an diesem metabolischen Verzweigungspunkt die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) mit dem α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex um das gemeinsame Substrat konkurriert. Die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die Aminierung von α -Ketoglutarat zu L-Glutamat. Wie gezeigt werden konnte, ist ihre Aktivität für die Produktion und Exkretion von L-Glutamat allerdings nicht grundsätzlich essentiell (Börmann-El Kholy *et al.*, 1993; Labarre *et al.*, 1993). Sie kann durch Kopplung der Glutamin-Synthetase und der Glutamat-Synthase substituiert werden (Ertan, 1992a; Ertan, 1992b), deren Aktivitäten jedoch wesentlich geringer sind (Börmann-El Kholy *et al.*, 1993; Ertan, 1992a; Sung *et al.*, 1984). Überexpression der Glutamat-Dehydrogenase führt zu einem deutlichen Anstieg des zellinternen L-Glutamat-Pools in *C. glutamicum* bei unveränderter L-Glutamat-Exportrate. Die Vermutung liegt nahe, dass in diesem Fall das Export-System der limitierende Faktor ist (Börmann-El Kholy *et al.*, 1993; Labarre *et al.*, 1993).

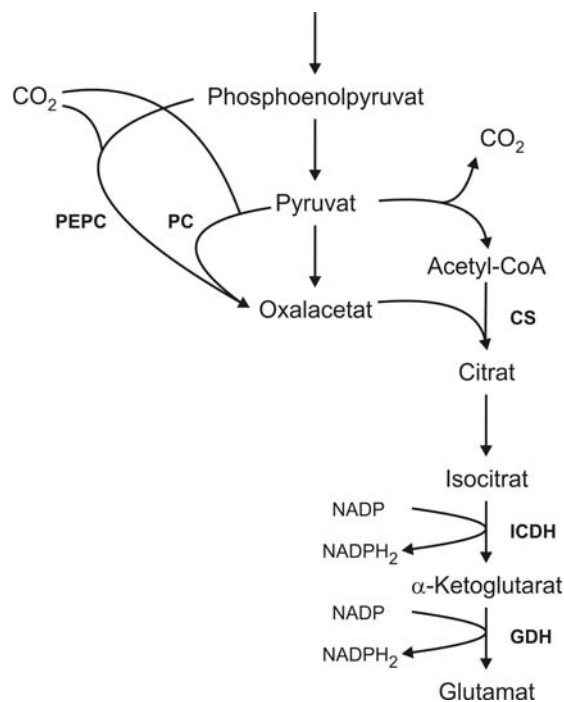


Abbildung 3: Syntheseweg von Glutamat in *C. glutamicum*. (PEPC: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PC: Pyruvat-Carboxylase, CS: Citrat-Synthase, ICDH: Isocitrat-Dehydrogenase, GDH: Glutamat-Dehydrogenase).

¹³C-NMR-Analysen zum metabolischen Fluss in *C. glutamicum* zeigten, dass unter L-Glutamat-Exkretionsbedingungen eine verringerte Umwandlung von α -Ketoglutarat zu Oxalacetat erfolgt (Marx *et al.*, 1997), die mit einer reduzierten Aktivität des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes korreliert (Delaunay *et al.*, 1999; Hoischen & Krämer, 1990; Shio *et al.*, 1963; Takinami *et al.*, 1968). Ob der Fluss von α -Ketoglutarat in Richtung L-Glutamat oder Oxalacetat geht, hängt somit maßgeblich von der Aktivität des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes ab.

Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Ausscheidung von L-Glutamat bei *C. glutamicum* zu charakterisieren. Dazu sollten durch globale DNA-Chip-Analysen Genexpressionsmuster in *C. glutamicum* identifiziert werden, die für verschiedene Auslöser der Glutamatausscheidung charakteristisch sind. Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung, ob es ein Genexpressionsmuster gibt, das unabhängig von der Art der Induktion bei der Glutamatausscheidung auftritt und die Vielzahl der Induktionsbedingungen auf molekularer Ebene erklären könnte. Von besonderem Interesse war ebenso die Identifizierung von Genen, die unter Exkretionsbedingungen signifikant verändert waren und direkt oder indirekt an der Produktion oder dem Export der Aminosäure beteiligt sein könnten. Potentielle Zielgene sollten identifiziert und ihre Rolle bei der Ausscheidung von L-Glutamat analysiert werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind unter Angabe ihrer Eigenschaften in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide befinden sich im Anhang.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ <i>thi-1 endA1 hsdR17(r, m) supE44 ΔlacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtypisolat	Abe <i>et al.</i> , 1967
2262	Temperatur-sensitiver Stamm der Firma Orsan-Amylum SA.	Orsan-Amylum SA., bereitgestellt durch J.L. Goergen (INPL, Nancy, Frankreich)
2262-NP	Temperatur-insensitives 2262-Isolat (<i>non-producing strain</i> 2262-NP)	Uy <i>et al.</i> , 2003
ATCC13032 Δ <i>NCgl1249</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion von <i>NCgl1249</i> (Biomax 2756)	diese Arbeit
ATCC13032 Δ <i>NCgl2566</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion von <i>NCgl2566</i> (Biomax 3752)	Fellmann, 2005
ATCC13032 Δ <i>NCgl2567</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion von <i>NCgl2567</i> (Biomax 3753)	Fellmann, 2005
ATCC13032 Δ <i>NCgl2713</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion von <i>NCgl2713</i> (Biomax 193)	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0007</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0007</i> (Biomax 3301) durch pK18 <i>mob</i> nach 477 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0394</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0394</i> (Biomax 875) durch pK18 <i>mob</i> nach 1079 bp	diese Arbeit

Tabelle 1 (ff): Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
ATCC13032:: <i>NCgl0599</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0599</i> (Biomax 1124) durch pK18 <i>mob</i> nach 1022 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0816</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0816</i> (Biomax 1401) durch pK18 <i>mob</i> nach 834 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0821</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0821</i> (Biomax 1406) durch pK18 <i>mob</i> nach 1009 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0944</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0944</i> (Biomax 1559) durch pK18 <i>mob</i> nach 624 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0963</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0963</i> (Biomax 1583) durch pK18 <i>mob</i> nach 766 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl0986</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl0986</i> (Biomax 1605) durch pK18 <i>mob</i> nach 972 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl1026</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl1026</i> (Biomax 1649) durch pK18 <i>mob</i> nach 759 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl1174</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl1174</i> (Biomax 1822) durch pK18 <i>mob</i> nach 534 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl1221</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl1221</i> (Biomax 2794) durch pK18 <i>mob</i> nach 1035 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl1978</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl1978</i> (Biomax 2170) durch pK18 <i>mob</i> nach 623 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2032</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2032</i> (Biomax 2239) durch pK18 <i>mob</i> nach 693 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2232</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2232</i> (Biomax 3112) durch pK18 <i>mob</i> nach 709 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2303</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2303</i> (Biomax 3707) durch pK18 <i>mob</i> nach 699 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2348</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2348</i> (Biomax 2962) durch pK18 <i>mob</i> nach 689 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2351</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2351</i> (Biomax 2968) durch pK18 <i>mob</i> nach 711 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2411</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2411</i> (Biomax 3507) durch pK18 <i>mob</i> nach 459 bp	diese Arbeit

Tabelle 1 (ff): Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
ATCC13032:: <i>NCgl2524</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2524</i> (Biomax 2824) durch pK18 <i>mob</i> nach 852 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2816</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2816</i> (Biomax 312) durch pK18 <i>mob</i> nach 695 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2828</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2828</i> (Biomax 329) durch pK18 <i>mob</i> nach 826 bp	diese Arbeit
ATCC13032:: <i>NCgl2839</i>	Wildtyp mit Disruption von <i>NCgl2839</i> (Biomax 341) durch pK18 <i>mob</i> nach 840 bp	diese Arbeit

Tabelle 2: Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker/Eigenschaften	Referenz
pK19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor, <i>Kan^R</i> , <i>sacB</i> , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18 <i>mob</i>	Integrationsvektor, <i>Kan^R</i> , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pEKEx3	Expressionsvektor, <i>Spec^R</i> , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i>	Radmacher, 2004
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>NCgl2713</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>NCgl2713</i> -Sequenz; deletiert ist ein internes 828 bp Fragment	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>NCgl1249</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>NCgl1249</i> -Sequenz, deletiert ist ein internes 252 bp Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobNCgl0007</i> _{int}	pK18 <i>mob</i> mit einem internen 332 bp Fragment von <i>NCgl0007</i> (Biomax 3301)	diese Arbeit
pK18 <i>mobNCgl0394</i> _{int}	pK18 <i>mob</i> mit einem internen 495 bp Fragment von <i>NCgl0394</i> (Biomax 875)	diese Arbeit
pK18 <i>mobNCgl0599</i> _{int}	pK18 <i>mob</i> mit einem internen 644 bp Fragment von <i>NCgl0599</i> (Biomax 1124)	diese Arbeit
pK18 <i>mobNCgl0816</i> _{int}	pK18 <i>mob</i> mit einem internen 474 bp Fragment von <i>NCgl0816</i> (Biomax 1401)	diese Arbeit
pK18 <i>mobNCgl0821</i> _{int}	pK18 <i>mob</i> mit einem internen 485 bp Fragment von <i>NCgl0821</i> (Biomax 1406)	diese Arbeit
pK18 <i>mobNCgl0944</i> _{int}	pK18 <i>mob</i> mit einem internen 426 bp Fragment von <i>NCgl0944</i> (Biomax 1559)	diese Arbeit

Tabelle 2 (ff): Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker/Eigenschaften	Referenz
pK18mobNCgl0963 _{int}	pK18mob mit einem internen 509 bp Fragment von NCgl0963 (Biomax 1583)	diese Arbeit
pK18mobNCgl0986 _{int}	pK18mob mit einem internen 540 bp Fragment von NCgl0986 (Biomax 1605)	diese Arbeit
pK18mobNCgl1026 _{int}	pK18mob mit einem internen 449 bp Fragment von NCgl1026 (Biomax 1649)	diese Arbeit
pK18mobNCgl1174 _{int}	pK18mob mit einem internen 342 bp Fragment von NCgl1174 (Biomax 1822)	diese Arbeit
pK18mobNCgl1221 _{int}	pK18mob mit einem internen 610 bp Fragment von NCgl1221 (Biomax 2794)	diese Arbeit
pK18mobNCgl1978 _{int}	pK18mob mit einem internen 373 bp Fragment von NCgl1978 (Biomax 2170)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2032 _{int}	pK18mob mit einem internen 439 bp Fragment von NCgl2032 (Biomax 2239)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2232 _{int}	pK18mob mit einem internen 468 bp Fragment von NCgl2232 (Biomax 3112)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2303 _{int}	pK18mob mit einem internen 400 bp Fragment von NCgl2303 (Biomax 3707)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2348 _{int}	pK18mob mit einem internen 458 bp Fragment von NCgl2348 (Biomax 2962)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2351 _{int}	pK18mob mit einem internen 295 bp Fragment von NCgl2351 (Biomax 2968)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2411 _{int}	pK18mob mit einem internen 349 bp Fragment von NCgl2411 (Biomax 3507)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2524 _{int}	pK18mob mit einem internen 464 bp Fragment von NCgl2524 (Biomax 2824)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2816 _{int}	pK18mob mit einem internen 468 bp Fragment von NCgl2816 (Biomax 312)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2828 _{int}	pK18mob mit einem internen 369 bp Fragment von NCgl2828 (Biomax 329)	diese Arbeit
pK18mobNCgl2839 _{int}	pK18mob mit einem internen 472 bp Fragment von NCgl2839 (Biomax 341)	diese Arbeit

Tabelle 2 (ff): Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker/Eigenschaften	Referenz
pEKEx3- <i>lldD</i>	pEKEx3 mit <i>lldD</i> -Gen (NCgl2817)	diese Arbeit

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg), verwendet. Die Bestandteile für komplexe Nährmedien stammten von den Difco-Laboratories (Detroit, MI, USA).

2.2 Nährmedien

Nährmedien für *E. coli*

Zur Kultivierung der *E. coli* Stämme wurde ausschließlich *Luria-Bertani*-(LB)-Vollmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen zur Aufnahme von DNA durch Hitzeschock erfolgte mit SOB-Medium (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in LB-Medium überführt. Auch die Stammhaltung erfolgte in LB-Medium. Zur Selektion rekombinanter Stämme wurden dem Medium gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt.

Nährmedien für *C. glutamicum*

Zur Stammhaltung und DNA-Isolierung wurde LB-Medium verwendet. Als Vollmedium für Vorkulturen wurde BHI-Komplexmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) oder CGIII-Medium (Menkel *et al.*, 1989) eingesetzt. Für Kultivierungen zur Quantifizierung der Aminosäureproduktion wurde das Minimalmedium CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 5% (w/v) Glucose und 30 mg/l Protokatechusäure benutzt. Dieses Medium besitzt durch den Zusatz von 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) sehr gute Puffereigenschaften im pH-Bereich um 7,0. Die Herstellung kompetenter Zellen zur Aufnahme von DNA durch Elektroporation erfolgte unter Verwendung von BHIS-Vollmedium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbit) (Tauch *et al.*, 2002). Dieses wurde außerdem zur Regeneration nach der Elektroporation eingesetzt. Die Selektion rekombinanter Stämme erfolgte durch Zugabe von Antibiotika.

Medienzusätze

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden dem Medium Antibiotika in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Kanamycin	25 µg/ml (unmittelbar nach der Transformation)
	50 µg/ml (zur Vermeidung des Plasmidverlustes)
Spectinomycin	100 µg/ml

Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme erfolgte mit:

Kanamycin	15 µg/ml (unmittelbar nach der Elektroporation)
	25 µg/ml (zur Selektion auf Integration eines Vektors ins Genom)
Spectinomycin	250 µg/ml

Die Selektion auf Exzision der Vektoren pK19*mobsacB*Δ*NCgl2713* und pK19*mobsacB*-Δ*NCgl1249* aus dem Genom erfolgte auf LB-Medium mit 10% (w/v) Saccharose (Schäfer *et al.*, 1994). Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 1,8% (w/v) Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) zugegeben.

2.3 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese enthielten jeweils 50 ml Medium. Für Kultivierungen zur Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurden 50 ml Vollmedium verwendet, im kleineren Maßstab hingegen wurden 5 ml Vollmedium im Reagenzglas eingesetzt. Kulturen in Reagenzgläsern wurden bei 170 Upm, alle übrigen Kulturen bei 120 Upm inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug 37°C für *E. coli*, 30°C für *C. glutamicum* ATCC 13032 und 33°C für *C. glutamicum* 2262.

2.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 75% (v/v) einer Komplexmedium-Übernachtskultur und 25% (v/v) sterilem Glycerin bestanden (Sambrook *et al.*, 1989). Diese Dauerkulturen wurden bei -20°C oder -70°C gelagert und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet. Im Fall von *E. coli* wurden diese Stammhaltungsplatten für 18 h bei 37°C bzw. im Fall von *C. glutamicum* für 48 h bei 30°C inkubiert, dann bei 4°C gelagert und nach spätestens 14 Tagen erneuert.

2.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika für *C. glutamicum* ATCC 13032-Stämme erfolgte mit Hilfe des *Etest*-Systems der Firma AB BIODISK (Solna, Schweden), welches die visuelle Bestimmung von Resistenz-Phänotypen auf Agarplatten ermöglicht. Der *Etest* besteht aus einem Plastikstreifen mit vordefiniertem Konzentrationsgradienten eines Antibiotikums, der auf eine beimpfte Agarplatte aufgelegt wird. In Abhängigkeit von der Resistenz des getesteten Stammes bildet sich nach Inkubation bei 30°C für 18h ein Hemmhof, dessen Größe mit der jeweiligen minimalen Hemmkonzentration korreliert. Durch eine auf dem Streifen aufgedruckte Skala kann die Konzentration direkt abgelesen werden.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurden Zellen über Nacht in 5 ml Komplexmedium vorkultiviert (30°C, 170 Upm), dann in 5 ml frisches Komplexmedium mit einer OD₆₀₀ von 0,5 übertragen und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 4,0 inkubiert (30°C, 170 Upm). 100 µl dieser Kultur wurden auf Komplexmedium ausplattiert. Anschließend wurde ein *Etest*-Streifen auf die Petrischale aufgelegt und die minimale Hemmkonzentration des jeweiligen Antibiotikums nach Inkubation für 18 Stunden bei 30°C bestimmt.

2.6 Induktion der Glutamatausscheidung

Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurden Zellen über Nacht auf Komplexmedium vorkultiviert und dann in CGXII-Minimalmedium übertragen. Dazu wurde jeweils ein Aliquot der Vorkultur steril entnommen, 5 min bei 4400 g und 4°C abzentrifugiert, mit 30 ml steriler 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und in Minimalmedium überführt.

Induktion durch Zugabe von Ethambutol

Die Hauptkultur wurde in 50 ml frischem CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 5% (w/v) Glucose, 30 mg/l Protokatechusäure, 200 µg/l Biotin und 500 mg/l Ethambutol (Sigma, Taufkirchen) bei einer OD₆₀₀ von 1,0 beimpft.

Induktion durch Zugabe von Penicillin G oder Tween40

Die Hauptkultur wurde in 50 ml frischem CGXII mit 5% (w/v) Glucose, 30 mg/l Protokatechusäure und 200 µg/l Biotin bei einer OD₆₀₀ von 1,0 beimpft. Die Zugabe von Penicillin G (750 U/l; Sigma, Taufkirchen) oder Tween40 (2 g/l; Sigma, Taufkirchen) erfolgte nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 5,0 - 6,5.

Induktion durch Biotin-Mangel

Zunächst wurde eine Vorkultur in 50 ml CGXII mit 5% (w/v) Glucose, 30 mg/l Protokatechusäure und 2,5 µg/l Biotin (Biotin-Vorlimitierung) bei einer OD₆₀₀ von 0,5 beimpft und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde ein Aliquot dieser Kultur steril entnommen, 5 min bei 4400 g und 4°C abzentrifugiert, mit 30 ml steriler 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und dann in frisches CGXII überführt. Die Hauptkultur wurde in 50 ml frischem CGXII mit 5% (w/v) Glucose, 30 mg/l Protokatechusäure und 1 µg/l Biotin (Biotin-Mangel) bei einer OD₆₀₀ von 1,0 angeimpft.

2.7 Temperatur-induzierte Glutamatausscheidung im Chemostat

Die Induktion der Glutamatausscheidung durch Temperaturschock wurde im Chemostat durchgeführt. Die Zusammensetzung des Kulturmediums basierte auf dem MCGC-Medium (Von der Osten *et al.*, 1989), jedoch unter Austausch von Citrat gegen Deferoxamin. Um Präzipitate während des Autoklavierens zu vermeiden, wurde das Medium in zwei getrennten Ansätzen sterilisiert.

Medium A	15 g/l Glucose, 6 g/l Na ₂ HPO ₄ , 12 g/l KH ₂ PO ₄ , 4 g/l NaCl, 16 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 4 mg/l Biotin, 40 mg/l Thiamin, 6 mg/l Deferoxamin, 4 g/l Glycinbetain
Medium B	15 g/l Glucose, 168 mg/l CaCl ₂ , 0,8 g/l MgSO ₄ , 80 mg/l FeSO ₄ ×7H ₂ O, 8 mg/l FeCl ₃ , 2 mg/l ZnSO ₄ ×7H ₂ O, 0,8 mg/l CuCl ₂ ×H ₂ O, 8 mg/l MnSO ₄ ×H ₂ O, 0,4 mg/l (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O, 0,8 mg/l Na ₂ B ₄ O ₇ ×10H ₂ O

Salze und Glucose wurden autoklaviert, während Vitamine und CaCl₂ nach Sterilfiltration (0,22 µm) zugegeben wurden. Die Vereinigung beider Medien erfolgte in einem sterilen Bioreaktor durch Mischen äquivalenter Volumina der Medien A und B. Als Antischaummittel wurde Polypropylenglycol (1,3 g/l) eingesetzt.

Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurden die Zellen zunächst über Nacht in MCGC-Medium (supplementiert mit 3,8 g/l NaHPO₄, 0,39 mg/l Harnstoff und 34 g/l Glucose) kultiviert. Anschließend wurden 1,5 l modifizierten MCGC-Mediums in einem 3 l-Bioreaktor (APPLIKON, Niederlande) mit 50 ml dieser Kultur beimpft und bei 33°C und 1200 Upm inkubiert. Der pH-Wert wurde mit 12N NH₃ konstant auf 7,6 eingestellt. Nachdem die Glucose für das Wachstum verbraucht war, wurde kontinuierlich (Durchflussrate Ø 0,05 h⁻¹) mit modifiziertem MCGC-Medium supplementiert und gleichzeitig durch Erhöhung der Temperatur von 33°C auf 39°C ein Temperaturschock durchgeführt. Die Kohlenstoff-Verfügbarkeit verblieb während der kontinuierlichen Kultivierung limitierend.

2.8 Ausscheidung von L-Glutamat nach osmotischem Schock

Zur Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel, Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40 wurden Zellen analog zu Abschnitt 2.6 über Nacht kultiviert. Parallel dazu erfolgte eine Kultivierung in CGXII unter nicht-induzierenden Bedingungen. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot steril entnommen, 5 min bei 4400 g und 4°C abzentrifugiert, zweimal in kaltem CGXII gewaschen und dann unter Beibehaltung der Exkretionsbedingungen (a) isoton (1,119 osmol/kg) in frischem CGXII, (b) hypoton (0,597 osmol/kg) in 50 % (v/v) CGXII, (c) hyperton (2,168 osmol/kg) in CGXII mit 750 mM NaCl und (d) hyperton (2,158 osmol/kg) in CGXII mit 25% (w/v) Sorbit bei einer OD₆₀₀ von 6,0 beimpft.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA von *C. glutamicum* wurde nach Eikmanns *et al.* (1994) isoliert. Nach Aufschluss der Zellen (Lysozym- und SDS-Behandlung) und enzymatischer Proteolyse wurden noch verbliebene Peptide sowie die Proteinase K durch Aussalzen mit NaCl entfernt. Nach Zentrifugation (30 min, 5000 g) wurde die genomische DNA durch Ethanol-fällung aus dem Überstand isoliert und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA) gelöst.

3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und Silikatadsorption unter Verwendung des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5) eluiert. Die Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA mit höherer Reinheit, die zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde, erfolgte mit Hilfe des *QIAfilter Plasmid Purification Kits* (QIAGEN, Hilden). Die Präparation der Plasmid-DNA wurde hierbei ebenfalls nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* nach denselben Protokollen war aufgrund der besonders stabilen Zellwand zur effektiven Lyse der Bakterienzellen eine vorhergehende Behandlung der Zellen mit Lysozym (15 mg/ml) erforderlich.

3.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA für globale Genexpressionsanalysen bei *C. glutamicum* erfolgte über einen mechanischen Zellaufschluss mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen, Hilden) (Lange *et al.*, 2003), welches auf der Bindung von RNA an eine Silikatmatrix beruht. Dazu wurden 25 ml der Kultur zusammen mit 15 g Eis (vorgekühlt auf -20°C) abzentrifugiert (5 min, 3500 g, 4°C) (Wendisch *et al.*, 2001). Die Zellen wurden in 350 μl RLT-Puffer (Qiagen) resuspendiert und 30 sec lang mit 0,5 g Zirkonium-/Silica-Perlen (\varnothing 0,1 mm, Roth, Karlsruhe) in einem Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (2 min, 16000 g) wurde der Überstand zur RNA-Isolierung mit dem *RNeasy Mini Kit* und DNase I-Behandlung auf der Säule nach Herstellerangaben verwendet. Die Qualität der RNA wurde durch denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) überprüft.

3.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch (Specord S 100 B, Carl Zeiss, Jena) durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet, so dass eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ bei doppelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ bei RNA entspricht (Sambrook *et al.*, 1989). Die Reinheit wurde mittels der Quotienten E_{260}/E_{280} (Protein-Verunreinigung) und E_{260}/E_{230} (Kohlenhydrat-Verunreinigungen) kontrolliert. Die Werte dieser Quotienten sollten zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989).

3.5 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA

Alle Techniken zur Restriktion, Präzipitation sowie Behandlung mit dem Klenow-Fragment oder alkalischer Phosphatase wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Für einen analytischen Verdau wurde ein Reaktionsansatz von 10 μl gewählt. Es wurden dabei 0,5 μg DNA und 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym für eine vollständige Restriktion eingesetzt. Bei einer Restriktion im präparativen Maßstab umfasste der Ansatz 50 μl . Es wurden 1 - 2 μg DNA und 10 - 20 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Abhängigkeit ihrer Größe in 0,8 - 2%igen TAE-(40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,35% (v/v) Essigsäure, pH 8,0)-Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente für weitere Klonierungen benötigt, so wurde die DNA unter Verwendung des *MinElute Gel Extraction Kits* (QIAGEN, Hilden)

nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden und der Polymerase mit einem auf Silikagel-Membran basierendem Verfahren (*PCR-Purification Kit*, QIAGEN, Hilden) gereinigt und mit Tris-HCl pH 8,5 oder Wasser eluiert. Zur Modifikation überhängender 3'-Enden wurden diese mit Hilfe des großen Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg) zu glatten Enden abgebaut (Sambrook *et al.*, 1989). Um Religationen linearisierter Vektoren zu vermeiden, wurden diese mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) am 5'-Ende dephosphoryliert. Ligationen wurden mit Hilfe des *Rapid Ligation Kits* (Roche Diagnostics, Mannheim) für 10 - 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente sowohl der *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988; Tindall & Kunkel, 1988), als auch der analytischen Überprüfung von Insertions- und Deletionsmutanten. Dabei wurden jeweils zwei synthetische Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Als Matrize wurde üblicherweise chromosomale DNA von *C. glutamicum* verwendet. Zum Nachweis einer Insertionsmutation oder einer Deletion, die die Untersuchung von mehreren Klonen parallel erforderte, wurden je 5 µl *C. glutamicum*-Lysat als Matrize eingesetzt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Bakterienkolonien in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und anschließend für 10 min bei 94°C aufgeschlossen. Die Durchführung der PCR erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers Gene Amp PCR System 9700 (Perkin & Elmer). Zur Denaturierung der DNA wurde eine Temperatur von 95°C verwendet. Die *annealing*-Temperatur der eingesetzten Primer (Anhang) ergab sich aus der Basenzusammensetzung nach folgender Formel:

$$T_{annealing} = 2^{\circ}\text{C} (\text{pro AT-Paar}) + 4^{\circ}\text{C} (\text{pro GC-Paar}) - 4^{\circ} \quad (\text{Sambrook } et al., 1989).$$

Die Polymerisation der DNA erfolgte bei 72°C, wobei sich die Elongationszeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments richtete. Die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (QIAGEN, Hilden) ist in der Lage, etwa 1000 Basen pro Minute zu amplifizieren, so dass sich die Polymerisationszeit durch Multiplikation der Länge des erwarteten Fragments (in kb) mit 1 min errechnen ließ. Soweit nicht anders angegeben, wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Überprüfung von Insertions- und Deletionsmutanten erfolgte mit Hilfe der *Taq*-Polymerase (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Vervielfältigung fehlerfreier Gensequenzen, die für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde das

Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Dieses enthält neben der *Taq*-Polymerase auch die *Tgo*-Polymerase aus *Thermococcus gorgonarius*, welche durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität in der Lage ist, Sequenzfehler zu korrigieren (Barnes, 1994). Nach Beendigung der PCR-Reaktionen wurden 5 µl des Ansatzes entnommen und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Sofern die amplifizierten PCR-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, erfolgte anschließend eine Aufreinigung mit dem *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden).

3.7 Konstruktion von Integrations- und Deletionsmutanten von *C. glutamicum* ATCC 13032

Zur Herstellung von Deletionskonstrukten, die eine *in-frame* Deletion des Gens ermöglichen, wurde die *cross-over* PCR verwendet (Link *et al.*, 1997). Bei einer *in-frame* Deletion eines Gens ist die Beeinträchtigung der Expression stromabwärts liegender Gene minimal, so dass Sekundäreffekte ausgeschlossen werden können.

In zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten wurden die Deletionskonstrukte synthetisiert: Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR-Reaktionen etwa 500 bp große Fragmente generiert, welche den 5'-flankierenden Bereich inklusive der ersten 6 Kodons bzw. den 3'-flankierenden Bereich inklusive der letzten 12 Kodons des zu deletierenden Gens umfassten. Die inneren Primer enthielten jeweils eine 21 bp lange, komplementäre Sequenz an ihrem 5'-Ende. Die PCR wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Im zweiten Schritt erfolgte die Fusion der beiden Fragmente durch Hybridisierung der komplementären Sequenzen und die Amplifizierung als ein einziges Fragment durch die äußeren Primer. Dabei wurde jeweils 1 µl der Fragmente der ersten beiden PCR-Reaktionen in der PCR eingesetzt. Das erhaltene Fusionsprodukt wurde mit dem *MinElute Gelextraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt und seine überhängenden 3'-Enden mittels Klenow-Fragment (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg) zu glatten Enden abgebaut. Nach *Sma*I-Restriktion und Dephosphorylierung von pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) erfolgte die Ligation von Fusionsprodukt und linearisiertem Vektor. Anschließend wurden kompetente Zellen von *E. coli* DH5α mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert. Die Selektion auf eingebaute Inserts erfolgte in Form einer Blau-Weiß-Selektion durch *lacZ*α-Komplementation (Sambrook *et al.*, 1989). Nach Sequenzierung des Inserts durch die Firma AGOWA (Berlin) wurde der Deletionsvektor anschließend mittels Elektroporation in *C. glutamicum* eingebracht und einige Kolonien der so erhaltenen Integrianten in 5 ml LB kultiviert, eine Verdünnungsreihe angelegt und auf LB-Platten, die

10% (w/v) Saccharose enthielten, ausplattiert. Durch die von *sacB* kodierte Levan-Sucrase wird Saccharose zum toxischen Levan polymerisiert, das für *C. glutamicum* letal ist (Bramucci & Nagarajan, 1996; Schwarzer & Pühler, 1991). Bei Saccharose-resistenten Klonen sollte 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 mittels Kolonie-PCR überprüft, bei der Primer eingesetzt wurden, die im Chromosom außerhalb des deletierten Bereichs binden.

Integrationsmutanten wurden erzeugt, indem in den Vektor pK18*mob*, der in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist, ein internes Fragment des zu unterbrechenden Gens kloniert wurde (Schäfer *et al.*, 1994). Nach Einbringen des Plasmides via Elektroporation wurden durch Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Antibiotika-Resistenz Integrationsstämme isoliert und mittels PCR überprüft.

3.8 Agarose-Gelelektrophorese

3.8.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung von DNA

Für die Größenselektionierung von DNA-Fragmenten zur Identifizierung oder Reinigung wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Fragmentgröße wurde 0,8 - 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet, welcher auch als Laufpuffer diente. Die Elektrophorese der mit 6 x Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau in 40% (v/v) Glycerin) versetzten DNA-Probe wurde in einer horizontalen Gelapparatur Sub-Cell GT (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung wurden die Standards 100 bp DNA Ladder (GIBCO, Karlsruhe), Standard XVI (ROCHE, Mannheim) sowie *Bst*EII- oder *Hind*III-verdaute DNA des Phagen λ eingesetzt. Nach Auftrennung bei 75 - 100 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 bei einer Wellenlänge von 312 nm 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 *MinElute Gelextraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Methode beruht auf Freisetzung der DNA durch Aufschmelzen der Agarose und selektiver Bindung an eine Matrix, von der die Nukleinsäure anschließend isoliert werden kann.

3.8.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität isolierter RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Sambrook *et al.*, 1989). Hierbei wurde MOPS-Puffer (10 x MOPS-Puffer, Eppendorf, Hamburg) als Laufpuffer und zur Herstellung des Gels (0,25 g Agarose, 2,5 ml 10 x MOPS, 18,25 ml ddH₂O, 4,25 ml Formaldehyd) verwendet. Das eingesetzte Formaldehyd wurde mit Ionenaustauscher (AG 501-X8 (D) Resin 20-50mesh, Bio-Rad) entionisiert. 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 10 min bei 65°C und dann 5 min auf Eis inkubiert. Das Gel wurde nach Elektrophorese mit dem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) fotografiert.

3.9 Transformation von Bakterien

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

Zur Steigerung der Kompetenz von *E. coli* wurden Zellen mit Rubidiumchlorid behandelt (Hanahan, 1985). Dazu wurden die Zellen in 50 ml SOB-Medium kultiviert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,20 geerntet. Die weitere Durchführung erfolgte nach der Methode nach Hanahan (1985). Zur Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Durch eine anschließende 20-minütige Inkubation auf Eis sollte die Anlagerung der DNA an die Zellen erreicht werden. Ein kurzer Hitzeschock (60 sec, 42°C) diente der Unterstützung der DNA-Aufnahme in die Zellen. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration für 45 min bei 37°C in 500 µl LB-Medium inkubiert. Diese Inkubation ermöglichte sowohl die Regeneration der Zellen als auch die Ausprägung der Resistenz vor dem Ausplattieren auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten.

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

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch *et al.*, 2002). Hierzu wurden 50 ml BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbit) mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Vorkultur in 250 ml BHIS-Medium überimpft (2 l Kolben mit zwei seitlichen Schikanen) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,50 - 1,75 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen in zwei JA-14 Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (20 min,

6000 g, 4°C). Die Zellen wurden nachfolgend dreimal mit 20 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,5) und weitere zweimal mit 50 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen, anschließend in 1 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquote von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 100 µl Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt, luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Bio-Rad, München) überführt und mit 0,8 ml 10%igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER (Bio-Rad, München). Unmittelbar nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in ein steriles Reagenzröhrchen mit 4 ml BHIS-Medium überführt und 6 min bei 46°C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert vermutlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, so dass bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schäfer *et al.*, 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen zur Regeneration für 50 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellsuspension auf antibiotikahaltigem BHIS-Medium ausplattiert wurde.

3.10 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzierung klonierter DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs nach (Sanger *et al.*, 1977). Die nach der Aufreinigung durch das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) hochreine DNA wurde von der Firma AGOWA (Berlin) sequenziert.

Zur Analyse von Restriktionsschnittstellen und offenen Leserahmen wurde das Programm Clone Manager (Version 6; Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA) verwendet. Sequenzvergleiche von Polypeptiden wurde mit den Programmen ClustalW 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) und ClustalX (EMBL, Heidelberg) durchgeführt. Die Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit bearbeiteten Sequenzen erfolgte mittels der Programme BLASTX, BLASTN und BLASTP (Altschul *et al.*, 1997), mit den am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) zur Verfügung stehenden Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mit der Datenbank des *European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.embl-heidelberg.de>) und mit Hilfe von ERGO (Integrated Genomics, Chicago, USA).

4. reverse Transkriptase-PCR

DNase-Verdau

Gemäß Abschnitt 3.3 präparierte RNA wurde einem zweiten DNase I-Verdau unterzogen. Dazu wurden 100 µl Probe mit 10 µl 10× DNase-Puffer (1 M Natriumacetat, 50 mM MgSO₄, pH 5,0) und 30 U RNase freier DNase (Roche Diagnostics, Mannheim) für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 75°C.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Um hochreine und DNA-freie RNA zu erhalten, wurde die isolierte RNA durch eine zusätzliche Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (Sambrook *et al.*, 1989) und anschließend mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen absolutem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde für 3 h bei -20°C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert und das Pellet durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol (75%) gewaschen (5 min, 13000 g), anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet und die RNA in 60 µl RNase freiem Wasser aufgenommen.

LiCl-Fällung

Im Falle noch vorhandener DNA-Verunreinigungen wurde an die Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA eine LiCl-Fällung angeschlossen. Hierzu wurde die Probe in 600 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) gelöst, mit 200 µl 8 M LiCl versetzt und 3 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert, das Pellet durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol (75%) gewaschen (5 min, 13000 g) und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Resuspension der RNA erfolgte in 20 µl RNase-freiem Wasser.

cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte ausgehend von 350 ng Gesamt-RNA, welche durch reverse Transkription mit spezifischen Primern und reverser Transkriptase (*Omniscript Reverse Transkriptase*, Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde vor der Synthese für 5 min bei 65°C inkubiert und dann kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der vorbereitete Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden und reverser Transkriptase zugegeben. Die Synthese erfolgte für 1 h bei 37°C. Die synthetisierte cDNA wurde ohne weitere Aufreinigung als Matrize in der PCR (Abschnitt 3.6) eingesetzt.

5. Biochemische Methoden

5.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten

5.1.1 Herstellung von Enzymrohextrakten

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde *C. glutamicum* wie beschrieben kultiviert, 25 ml der Zellen in der frühen bis mittleren exponentiellen Phase entnommen und abzentrifugiert (5 min, 4400 g, 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) wurden die Zellen in 1 ml Puffer resuspendiert.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einem Eppendorfgesäß, welches zur Kühlung in Eiswasser eintauchte, mit einem Ultraschalldesintegrator (UP 200S, Dr. Hielscher GmbH, Teltow) durch 6 min Beschallung bei einer Amplitude von 55% und einem Pulsbereich von 50%. Nach der Ultraschallbehandlung wurden intakte Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (1 h, 13000 g, 4°C) abgetrennt und der Überstand als Enzymrohextrakt eingesetzt.

5.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen im Enzym-Rohextrakt wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit dem Bradford-Reagenz von Sigma (Taufkirchen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl Probe mit 1,5 ml Bradford-Reagenz versetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Extinktion der entstandenen Protein-Brilliantblau G-Komplexe photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin erstellt.

5.1.3 Bestimmung der Quinon-abhängigen

L-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (EC 1.1.2.3)

Die Bestimmung der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (L-LDH, EC 1.1.2.3) im Rohextrakt erfolgte in Anlehnung an Molinari & Lara (1960). Als künstlicher Elektronenakzeptor diente 2,6-Dichlorindophenol (DCPIP), ein Redoxfarbstoff, welcher in seiner oxidierten Form blau und im reduzierten Zustand farblos ist. Der Enzymtest beruhte auf der Reduktion des Farbstoffes durch die L-LDH, wobei die Extinktionsabnahme bei 600 nm und 30°C verfolgt wurde.

Reaktionsansatz

0,50 ml	0,2 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0
0,10 ml	0,5 mM DCPIP
0,02 ml	Rohextrakt (ggf. verdünnt)
0,28 ml	Aqua bidest.
0,10 ml	Substrat

Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von Substrat in folgenden Konzentrationen: L-Lactat 20 mM, D-Lactat 10 mM sowie D/L-Malat 20 mM. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase wurde der Extinktionskoeffizient für DCPIP bei 600 nm von $20 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ verwendet (Data for Biochemical Research, 1986).

5.2 Bestimmung von Metaboliten

5.2.1 Silikonölzentrifugation

Bei der Silikonölzentrifugation erfolgt die rasche Trennung von Zellen und Kulturmedium durch eine Silikonölschicht bei gleichzeitiger Inaktivierung des Stoffwechsels der Zellen durch Perchlorsäure (Klingenberg & Pfaff, 1977). Auf diese Weise wird ein möglicher Abbau der intrazellulären Metabolite verhindert.

Die für die Silikonölzentrifugation eingesetzten Beckman-Reaktionsgefäße (Beckman Instruments GmbH, München) wurden mit $30 \mu\text{l}$ 20%iger (v/v) Perchlorsäure und $65 \mu\text{l}$ Silikonöl der Dichte $1,04 \text{ g/cm}^3$ beladen. Um für spätere Analysen ausreichend Probenmaterial zu erhalten, wurden zur Probennahme je $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension in je drei Beckman-Reaktionsgefäße pipettiert. Durch Zentrifugation für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit (16000 g; Microfuge E, Beckman Instruments GmbH, München) wurden die Zellen in die Perchlorsäure überführt, während das zellfreie Medium aufgrund seiner geringeren Dichte über der Ölschicht verblieb. Die so erhaltenen Kulturüberstände wurden zur Quantifizierung der extrazellulären Aminosäurekonzentration mittels *reversed phase* HPLC (Abschnitt 5.5.2) direkt eingesetzt.

Um die intrazelluläre Aminosäurekonzentration bestimmen zu können, mussten die in Perchlorsäure vorliegenden Zellen zunächst durch eine Ultraschallbehandlung (5 min, Branson, Heusenstamm) aufgeschlossen werden (Hoischen & Krämer, 1989). Anschließend erfolgte eine Neutralisierung des Extraktes mit $25 \mu\text{l}$ 5 M KOH/1 M Triethanolamin. Durch Zentrifugation (5 min, 13000 g, 4°C) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Die so erhaltenen Überstände wurden wiederum zur Aminosäurequantifizierung mittels *reversed phase* HPLC

eingesetzt. Die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen erfolgte mit folgender Formel:

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

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

Die Formel berücksichtigt [1] bei der Aufarbeitung des Zellpellets durchgeführte Verdünnungsschritte ($C_{int, gem} \cdot 100$), [2] einen empirischen Korrekturfaktor, der den Fehler einbezieht, welcher durch die Aminosäurekonzentration im noch an den Zellen haftenden Medium bedingt ist ($c_{ex} \cdot 0,0599 \cdot OD_{600}$) und [3] das intrazelluläre Zellvolumen der eingesetzten Zellen ($0,04 \cdot OD_{600}$). Punkt [3] basiert darauf, dass eine OD_{600} von 1,0 einem Zellrockengewicht von 0,3 mg/ml entspricht (Gutmann, 1993) und das Zellvolumen in *C. glutamicum* 1,6 µl/mg TG beträgt (Zittrich & Krämer, 1994).

5.2.2 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels reversed phase HPLC

Zur Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt Proben entnommen, die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min, 5000 g, Raumtemperatur) und der Kulturüberstand zur Analyse eingesetzt.

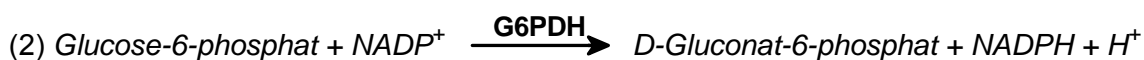
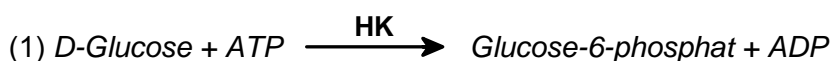
Die quantitative Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen wurde mittels *reversed phase* HPLC nach Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd durchgeführt (Lindroth & Mopper, 1979). Die Derivatisierung erfolgte dabei in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung, indem 1 µl der zu analysierenden Aminosäurelösung mit 20 µl *ortho*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce, Rockford, USA) gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die so entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones & Gilligan, 1983) wurden dann über ein kombiniertes System aus Vorsäule (40 × 4 mm, LiChrospher 100RP18EC-5 µm) und Hauptsäule (125 × 4 mm, LiChrospher 100RP18EC-5 µm; beide Säulen von CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit einem Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) bei 40°C aufgetrennt. Das polare Eluent war Natriumacetat (0,1 M, pH 7,2). Die Flussrate betrug

0,3 - 0,8 ml/min (modifiziert nach Lindroth & Mopper (1979)). Die Fluoreszenzdetektion der derivatisierten Aminosäuren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Für alle Analysen wurde ein HPLC-Gerät der Serie HP1100 (Agilent, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet. Die Systemsteuerung und Auswertung der Daten erfolgte mit der HP-Chem-Station Software (Agilent, Waldbronn). Die Aminosäurekonzentration der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als internen Standard berechnet.

5.2.3 Bestimmung von Glucose

Extrazelluläre Glucosekonzentrationen im Kulturüberstand wurden mittels *D-Glucose UV-Test* (Best. Nr. 716 251, R-BIOPHARM AG, Darmstadt) bestimmt. Von der jeweiligen Kultur wurden hierfür zum gewünschten Zeitpunkt Proben entnommen, die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min, 5000 g, Raumtemperatur) und der Kulturüberstand zur Analyse eingesetzt.

(1) D-Glucose wird in Gegenwart von Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) unter Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) zu D-Glucose-6-phosphat phosphoryliert. In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) erfolgt eine Oxidation von D-Glucose-6-phosphat zu D-Gluconat-6-phosphat (2). Die dabei gebildete NADPH-Menge ist stöchiometrisch zu der D-Glucose-Menge und kann aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt werden.



Die Messung der Extinktion erfolgte spektralphotometrisch im Absorptionsmaximum von NADPH bei 340 nm. Bei dieser Wellenlänge beträgt der Extinktionskoeffizient für NADPH 6,3 l/mmol·cm.

5.2.4 Bestimmung von L-Lactat

Zur Bestimmung extrazellulärer L-Lactat-Konzentrationen im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur Proben entnommen, die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min, 5000 g, Raumtemperatur) und der Kulturüberstand zur Analyse verwendet.

Die anschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des *D-Milchsäure (D-Lactat)/L-Milchsäure (L-Lactat) UV-Tests* (Best. Nr. 11 112 821 035, R-BIOPHARM AG, Darmstadt). Der Test beruht auf der Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat durch eine L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27) (1). Das Gleichgewicht der Reaktion (1) liegt auf der Seite von L-Lactat. Es kann durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe einer nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden (2). Die in der Reaktion (1) gebildete NADH-Menge ist der L-Lactat-Menge äquivalent und kann aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt werden.



Die Messung der Extinktion erfolgte spektralphotometrisch im Absorptionsmaximum von NADH bei 340 nm. Bei dieser Wellenlänge beträgt der Extinktionskoeffizient für NADH 6,3 l/mmol·cm.

6. Bestimmung von Zellgrößen mittels Durchflusscytometrie

Mit Hilfe des Durchflusscytometers kann zwischen Zellmorphotypen unterschieden werden. Die Differenzierung erfolgt hierbei aufgrund unterschiedlicher Lichtstreuung von Zellen verschiedener Größe oder Granularität.

Zur Bestimmung der Zellgrößen wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt Proben entnommen und diese in Puffer (3 g/l Na₂HPO₄, 6 g/l KH₂PO₄, 2 g/l NaCl, 8 g/l (NH₄)₂SO₄, pH 7,6) auf eine Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml verdünnt. Die anschließende Analyse erfolgte an einem BRYTE Cytometer (Bio-Rad, Frankreich). Der Probenfluss betrug 20 µl/min. Etwa 10000 Messpunkte wurden jeweils aufgezeichnet und die Resultate als Histogramme dargestellt (Uy *et al.*, 2003).

7. DNA-Chip-Technologie

In dieser Arbeit wurden DNA-Chips verwendet, die auf PCR-Produkten von *C. glutamicum*-Genen basierten (Lange *et al.*, 2003; Sindelar, 2003; Wendisch, 2003). Jeweils zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden wurden gleichzeitig auf 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 sowohl für globale Expressionsanalysen zur Untersuchung differentieller Genexpression wie auch für Genomhybridisierungen zum Vergleich der chromosomalen Kopienzahl von Genen eingesetzt. Die verwendete DNA-Chip-Technologie und das Robotersystem zur Herstellung der DNA-Chips beruhten auf dem an der Stanford-Universität entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996). Detaillierte Protokolle hierzu sind über <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html> im Internet verfügbar.

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

Zur Herstellung von DNA-Chips wurden PCR-Fragmente von *C. glutamicum*-Genen auf 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 Matrize amplifiziert. Größe und Menge der PCR-Produkte wurden via Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend 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 ethanolischer Natriumhydroxid-Lösung gereinigt, mit 17% (v/v) Poly-L-Lysin beschichtet, mit Wasser gewaschen und getrocknet (Polen, 2002; Zimmer *et al.*, 2000). Die PCR-Produkte wurden mittels eines computergesteuerten Robotersystems (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) an definierten Positionen auf die beschichteten Objektträger aufgebracht (Polen *et al.*, 2003). Um Alterungsprozesse zu verlangsamen, wurden die DNA-Chips anschließend in einem Exsikkator gelagert. Je nach Serie enthielten die DNA-Chips PCR-Produkte für bis zu 3530 der zunächst vorhergesagten 3567 offenen Leserahmen (Sindelar, 2003), so dass 2860 der aktuell angenommenen 2994 offenen Leserahmen von *C. glutamicum* (NCBI NC003450) und 284 weitere, putativ kodierende Sequenzen abgedeckt werden konnten (Kalinowski *et al.*, 2003; Wendisch, 2003). Zur Normierung und als Positivkontrolle wurde genomische *C. glutamicum*-DNA 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).

7.2 Nachbehandlung von DNA-Chips

Zur Absättigung freier ϵ -Aminogruppen des Poly-L-Lysins sowie zur Immobilisierung und Denaturierung der DNA wurden die DNA-Chips vor der Hybridisierung fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden chemisch und thermisch behandelt. Hierzu wurde die aufgebrachte DNA zunächst in einer Feuchtigkeitskammer über einer 1 x SSC-Lösung rehydratisiert und anschließend bei 100°C für 2 - 3 sec getrocknet, um gleichmäßigere und größere Hybridisierungssignale erzielen zu können. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (650 μ J; Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA) kovalent mit der Poly-L-Lysin-Beschichtung verknüpft (Polen, 2002; Shalon *et al.*, 1996). Freie ϵ -Aminogruppen von Poly-L-Lysin-Molekülen wurden durch Derivatisierung mit 180 mM Bernsteinsäureanhydrid blockiert, um eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonden 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 g) wurden die DNA-Chips bis zur Hybridisierung in einem Exsikkator gelagert.

7.3 Synthese fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden

7.3.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Zum Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden von äquivalenten Mengen (15 - 25 μ g) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) mit 500 ng Zufalls-Hexamerprimern (Invitrogen), wobei 3 nmol der fluoreszenzmarkierten dUTP-Analoga FluoroLink Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Ex max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 570 nm/grünfluoreszierend oder $\lambda_{\text{Ex max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 670 nm/rotfluoreszierend; Amersham Pharmacia, Freiburg) zugesetzt wurden (Khodursky *et al.*, 2003; Polen, 2002; Wendisch *et al.*, 2001). Nach Hydrolyse der RNA in 25 mM NaOH (10 min, 70°C) wurde die Sonde mit HCl neutralisiert und mit Hilfe von Microcon YM-30 Säulen (Millipore, Schwalbach) unter Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide eingeeengt (Khodursky *et al.*, 2003; Polen *et al.*, 2003; <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>). Die bei einem zweiten Reinigungsschritt mit den Microcon-Säulen vereinigten fluoreszenzmarkierten Sonden wurden direkt zur DNA-Chip-Hybridisierung eingesetzt.

7.3.2 Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA

Die Fluoreszenzmarkierung *EcoRV*-geschnittener genomischer DNA für die vergleichende Genomhybridisierung erfolgte modifiziert nach Feinberg und Vogelstein (1983). Je 2 µg DNA wurde zusammen mit einem Primermix (15 µg Zufalls Hexamerprimern; *BioPrime DNA Labeling System*, Invitrogen, Karlsruhe) denaturiert (5 min, 100°C). Die Synthese fluoreszenzmarkierter komplementärer DNA-Stränge erfolgte in Anwesenheit von 3 nmol der dUTP-Analoga FluoroLink Cy3-dUTP und Cy5-dUTP mit 40 U Klenow-Fragment (*BioPrime DNA Labeling System*, Invitrogen, Karlsruhe) für 2 - 3 h bei 37°C (Sindelar, 2003; <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>). Nach Inaktivierung des Klenow-Fragments (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) wurden die DNA-Sonden wie in Abschnitt 7.3.1 beschrieben mittels Microcon YM-30 Säulen (Millipore, Schwalbach) konzentriert, gereinigt und anschließend zur DNA-Chip-Hybridisierung verwendet.

7.4 DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA- oder DNA-Spiegel wurden je eine Cy3- und Cy5-markierte Sonde gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Den vereinigten Sonden wurden 2 µg poly(A) oder poly(dI-dC) (Sigma, Taufkirchen) als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz zugefügt. Der Sondenmix wurde in 3 x SSC mit 30 mM HEPES (pH 7,0) zur Sicherung stringenter Hybridisierungsbedingungen und 0,3% (w/v) SDS zur Verringerung der Oberflächenspannung aufgenommen. Die Hybridisierung erfolgte schließlich nach Denaturierung für 2 min bei 100°C und Abkühlen bei Raumtemperatur (5 - 10 min) für 8 - 16 h bei 65°C (Zimmer *et al.*, 2000).

7.5 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen

Zur Bestimmung relativer mRNA- oder DNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Hybridisierungssignale auf dem DNA-Chip gemessen, welche direkt mit der Menge gebundener, fluoreszenzmarkierter Signale korreliert. Nach der Hybridisierung und dem stringenten Waschen des DNA-Chips wurden hierzu orts aufgelöste Fluoreszenzintensitäten mit dem GenePix 4000A Laserscanner (Axon Inc., Union City, Kalifornien, USA) gemessen und als 16-bit-TIFF-Dateien elektronisch gespeichert (Software GenePix Pro 4.1, Axon Inc.). Die Anregung von Cy3-dUTP erfolgte mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 532 nm (Messung der Emission bei 570 nm), die von Cy5-dUTP mit 635 nm (Emission bei

670 nm). Die Lichtemission wurde geräteintern mit lichtempfindlichen Kathoden registriert. Dabei wurde das Bild in Bildpunkte unterteilt, die jeweils einer Fläche von $10 \mu\text{m}^2$ auf dem DNA-Chip entsprachen. Die Fluorogramme wurden quantitativ mit der GenePix-Software analysiert, wobei der Quotient der Mediane als Maß für das Verhältnis der roten zur grünen Fluoreszenz diente. Zur Berechnung des Quotienten der Mediane wird vor der Bildung des Cy5/Cy3-Fluoreszenzverhältnisses die Hintergrundfluoreszenz ($I_{B,\lambda 2}$ und $I_{B,\lambda 1}$, Abb. 4c, $I \equiv$ Intensität) von der Signalfuoreszenz ($I_{P,\lambda 2}$ und $I_{P,\lambda 1}$, Abb. 4c) bei der entsprechenden Wellenlänge subtrahiert (Abb. 4c).

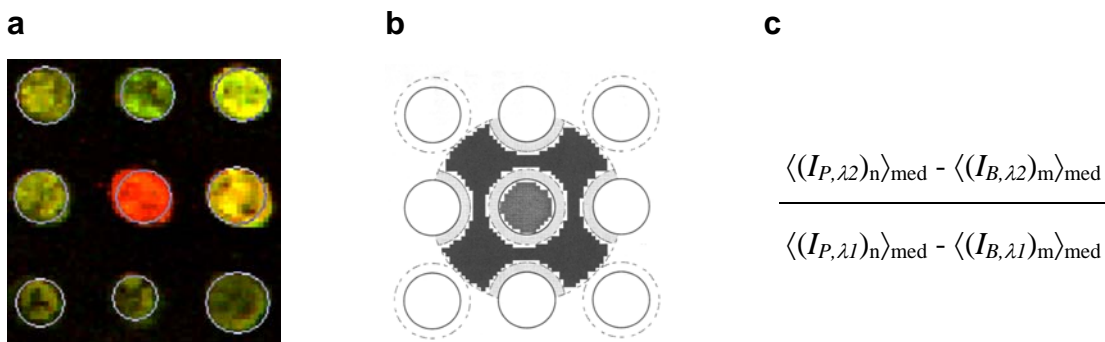


Abbildung 4: Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen auf einem DNA-Chip mit der Software GenePix Pro 4.1.

- a: Ausschnitt aus einem Fluorogramm mit identifizierten Hybridisierungssignalen
 b: Schematische Quantifizierung der Hybridisierungssignal-Fluoreszenz
 c: Berechnung des Quotienten der Mediane eines Hybridisierungssignals
 (a: Polen, 2002; b, c: Handbuch zur GenePix 4.1 Software)

Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt wie schematisch in Abbildung 4 b dargestellt. Die Bildpunkte des inneren Kreises bilden das Hybridisierungssignal, die lokale Hintergrundfluoreszenz wird vom zweifachen Radius des Hybridisierungssignals gebildet (schwarzer Kreis), wobei die Bereiche, die auf dem Hybridisierungssignal des nächsten Spots liegen, aus der Berechnung der Hintergrundfluoreszenz ausgeschlossen werden.

7.6 Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten

Um Unterschiede der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, zum Beispiel bei Einbau und Stabilität, ausgleichen zu können, wurden die erhaltenen Fluoreszenzverhältnisse durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor so normiert, dass der durchschnittliche Quotient der Mediane genomischer DNA von *C. glutamicum* den Wert 1 ergab (Eisen *et al.*, 1998; Khodursky *et al.*, 2000; Wendisch *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2000). Um nur zuverlässige Hybridisierungssignale für die Normierung zu verwenden, wurden ausschließlich solche Signale berücksichtigt, deren Fluoreszenzintensität für wenigstens eine Wellenlänge mindestens dreifach über dem Hintergrund lag (Signal/Rausch-Verhältnis ≥ 3) und die optisch deutlich zu erkennen waren. Diese Qualitätskriterien wurden auch auf alle anderen Hybridisierungssignale angewandt. Zu

schwache Signale (Signal/Rausch-Verhältnis <3) wurden als nicht quantifizierbar angesehen. Um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können, wurden die Experimente mehrfach wiederholt. Für statistische Analysen wurden p -Werte aus einem t -Test nach Student (einseitiger Test heteroskedastisch; TTest-Tabellenfunktion, Excel 2000, Microsoft, Redmond, USA) aus den logarithmierten mRNA- bzw. DNA-Spiegeln der Wiederholungsexperimente und den relativen Fluoreszenzverhältnissen der genomischen DNA von *C. glutamicum* als Kontrollgruppe berechnet. Bei einem p -Wert $\leq 0,05$ wurde die Veränderung des mRNA- bzw. DNA-Spiegels als signifikant erachtet (Arfin *et al.*, 2000; Lehnen *et al.*, 2002; Polen, 2002; Polen *et al.*, 2003). Soweit nicht anders angegeben wurden bei der Analyse von Genexpressionsveränderungen nach Genen mit signifikant im Durchschnitt mindestens zweifach verändertem relativem mRNA-Spiegel gesucht.

7.7 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 (MySQL AB Company, Uppsala, Schweden, <http://www.mysql.com>) verwendet. Alle relevanten Daten wurden mit Hilfe einer von Tino Polen selbst entwickelten Software (Polen & Wendisch, 2004) erfasst und zentral auf einem Linux-Server in einer MySQL-Datenbank hinterlegt, so dass sie über das institutsinterne Computernetzwerk für weitere Analysen zur Verfügung stehen.

7.8 Hierarchische Clusteranalyse

Durch hierarchische Clusteranalyse wurden Gene und Experimente anhand der Ähnlichkeit der Expressionsveränderung sortiert (Eisen *et al.*, 1998). Hierbei werden die zwei ähnlichsten Werte (Gene auf der einen und DNA-Chip-Experimente auf der anderen Achse) paarweise angeordnet und sukzessive mit weiteren Paaren graphisch als Dendrogramm dargestellt, so dass die ähnlichsten Werte örtlich nahe benachbart liegen, während verschiedenes Expressionsverhalten zu größerer örtlicher Entfernung führt (*average linkage method* nach Eisen *et al.* (1998)). Zur bildlichen Darstellung wurden die den relativen mRNA-Spiegeln entsprechenden Fluoreszenzverhältnisse in roten und grünen Farbwerten dargestellt. Schwarz symbolisiert einen unveränderten relativen RNA-Spiegel und grau einen nach den zuvor genannten Kriterien nicht auswertbaren RNA-Spiegel (Eisen *et al.*, 1998). Zur Durchführung der hierarchischen Clusteranalyse und zur Darstellung der Resultate wurde eine von Tino Polen erstellte Software (Polen, 2002; Polen & Wendisch, 2004) verwendet, die auf dem Algorithmus der hierarchischen Clusteranalyse-Software von Eisen *et al.* (1998) beruht.

IV. ERGEBNISSE

1. Einfluss von L-Glutamat auf das Wachstum und die Genexpression von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Vor der Bestimmung von Expressionsmustern, die für die Ausscheidung von L-Glutamat spezifisch sind, sollte zunächst überprüft werden, ob allein schon die Anwesenheit der Aminosäure L-Glutamat einen Einfluss auf die Genexpression ausübt. Hierzu wurden parallele Kultivierungen von *C. glutamicum* ATCC 13032 in CGXII-Medium mit 100 mM D-Glucose in An- oder Abwesenheit von 100 mM L-Glutamat durchgeführt. Nach mindestens acht Generationen exponentiellen Wachstums wurden die Zellen zur RNA-Extraktion zwischen geerntet. Die Kultivierung wurde zweimal unabhängig wiederholt. Nach Herstellung markierter cDNA-Sonden durch reverse Transkriptase wurden relative mRNA-Spiegel (mRNA-Konzentration in Anwesenheit von Glutamat/mRNA-Konzentration in Abwesenheit von Glutamat) durch Hybridisierung auf DNA-Chips bestimmt. Ausgewertet wurden nur Gene, die statistisch signifikant (p -Wert $<0,05$ in einem t -Test nach Student) mindestens dreifache Änderungen des relativen mRNA-Spiegels zeigten.

Die Wachstumsexperimente zeigten, dass 100 mM L-Glutamat keinen Einfluss auf die maximale Wachstumsrate ausübten. Wie in Abbildung 5 verdeutlicht, erreichte *C. glutamicum* auf 100 mM D-Glucose eine OD_{600} von bis zu 30, auf 100 mM D-Glucose und 100 mM L-Glutamat dagegen eine OD_{600} von 44. Da L-Glutamat von *C. glutamicum* als Energie- und Stickstoffquelle verwertet werden kann, ist die zusätzliche Bildung von Biomasse in Anwesenheit dieser Aminosäure auf die größere zur Verfügung stehenden Kohlenstoffmenge zurückzuführen. Eine Analyse der D-Glucose- und L-Glutamat-Verwertung deckte den sequentiellen Verbrauch beider Kohlenstoffquellen auf, wobei die Verstoffwechslung von L-Glutamat solange marginal verlief, bis die D-Glucose nahezu vollständig verbraucht war (Abb. 5). Diese Daten stehen in Einklang mit Untersuchungen zum Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf Komplexmedium mit D-Glucose und L-Glutamat (Krämer *et al.*, 1990).

Die Ergebnisse der genomweiten DNA-Chip-Analysen zeigten, dass kein Gen durch die Anwesenheit von L-Glutamat verändert exprimiert wurde, d.h. weder das *gluABCD*-Operon, das für ein primär aktives L-Glutamat-ABC-Aufnahmesystem kodiert und bei der Verwertung von L-Glutamat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle eine Rolle spielt (Krämer *et al.*, 1994; Kronemeyer *et al.*, 1995), noch andere Gene der L-Glutamat-Verwertung wiesen veränderte mRNA-Spiegel auf.

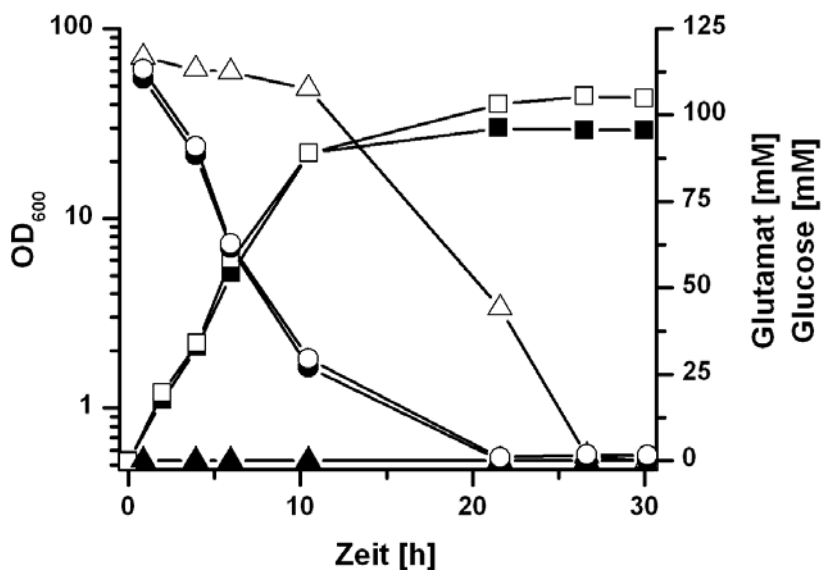


Abbildung 5: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 in CGXII mit 100 mM Glucose (geschlossene Symbole) oder 100 mM Glucose und 100 mM Glutamat (offene Symbole). Dargestellt sind die OD₆₀₀ (■, □), die Glucose- (●, ○) und die Glutamat-Konzentration (▲, △).

Zusammenfassend konnte durch die Transkriptomanalysen gezeigt werden, dass die Anwesenheit von L-Glutamat allein keinen Einfluss auf die Genexpression von *C. glutamicum* ausübt.

2. Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *C. glutamicum* ATCC 13032 mittels DNA-Chip Analysen

Es ist bisher unklar, auf welcher Ebene die verschiedenen Auslöser der Glutamatausscheidung regulierend eingreifen und ob es einen gemeinsamen Regulationsmechanismus gibt. Um zu prüfen, ob die Regulation auf Transkriptionsebene erfolgt, sollten Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* in An- und Abwesenheit verschiedener Stimuli der Glutamatausscheidung durchgeführt und anschließend mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse (Eisen *et al.*, 1998) verglichen werden. Dabei waren besonders solche Gene von Interesse, die unmittelbar an dem Export der Aminosäure beteiligt sind.

2.1 Einfluss von Stimuli auf Wachstum und Glutamatausscheidung

Um den Einfluss von Biotin-Mangel, Ethambutol, Penicillin G und Tween40 auf das Wachstum und die Glutamatausscheidung von *C. glutamicum* ATCC 13032 zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumsexperimente durchgeführt, bei denen der *C. glutamicum*-Wildtyp unter Biotin-Mangel bzw. unter Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40 in

Schüttelkolben kultiviert wurde. Als Kontrolle dienten parallel Kultivierungen ohne Biotin-Mangel bzw. ohne Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40. Zur Bestimmung der Metabolite im Kulturüberstand wurden von den jeweiligen Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und analysiert.

Wie aus Abbildung 6 zu ersehen, ist *C. glutamicum* ein schnell wachsendes Bakterium, das in den durchgeführten Experimenten auf CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,34 \text{ h}^{-1}$ nach 30 h Kultivierung eine OD_{600} von etwa 60 erreichte. Kultivierung mit einer limitierenden Biotin-Konzentration ($1 \mu\text{g/l}$) (Abb. 6A), in Anwesenheit von 500 mg/l Ethambutol (Abb. 6B), 750 U/l Penicillin G (Abb. 6C) oder 2 g/l Tween40 (Abb. 6D) führte bei *C. glutamicum* nicht nur zu einer leicht verringerten Wachstumsrate, sondern auch zu einer deutlich reduzierten Bildung von Biomasse (Tab. 3). Unter Biotin-Mangel wurde in der stationären Phase eine im Durchschnitt 50% niedrigere OD_{600} erreicht, während nach Zugabe von Ethambutol und Tween40 etwa 30% und nach Zugabe von Penicillin G sogar 80% weniger Biomasse gebildet wurde. Interessanterweise war die Glucose jedoch bei Erreichen der stationären Phase vollständig verbraucht. Die Bestimmung der Metabolite ergab, dass unter Biotin-Mangel eine durchschnittliche L-Glutamat-Konzentration von 31 mM, in Anwesenheit von Ethambutol und Tween40 jeweils 68 mM, und Penicillin 88 mM im Kulturüberstand erreicht wurde (Tab. 3). Auffällig war, dass die Ausscheidung von L-Glutamat erst in der späten exponentiellen Phase begann (Abb. 6).

Tabelle 3: Bildung von Glutamat im Kulturüberstand von *C. glutamicum* unter Biotin-Mangel bzw. unter Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40. Die Kultivierungen erfolgten in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Angegeben sind jeweils gemittelte Endwerte aus 5-10 unabhängigen Kultivierungen.

Stimulus	OD_{600}	Glutamat [mM]	$Y_{P/X} [\text{mM}\cdot\text{g}\cdot\text{TG}^{-1}]$	$Y_{P/S} [\text{mM}\cdot\text{mM}^{-1}]$
Biotin-Mangel	31 ± 6	52 ± 10	7 ± 2	$0,18 \pm 0,05$
Ethambutol	20 ± 5	68 ± 8	15 ± 5	$0,25 \pm 0,03$
Penicillin G	13 ± 1	88 ± 5	28 ± 1	$0,32 \pm 0,02$
Tween40	22 ± 3	68 ± 6	12 ± 2	$0,24 \pm 0,02$

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Glutamatausscheidung bei *C. glutamicum* 13032 nach Induktion durch Biotin-Mangel, Zugabe von Ethambutol, Penicillin G und Tween40 mit einer Reduktion der Biomasse korreliert. Die lineare Beziehung zwischen der L-Glutamat-Konzentration im Kulturüberstand und der OD_{600} in der stationären Phase deutet darauf hin, dass die nicht in die Bildung von Biomasse eingehende Glucose vollständig zu L-Glutamat umgesetzt wird.

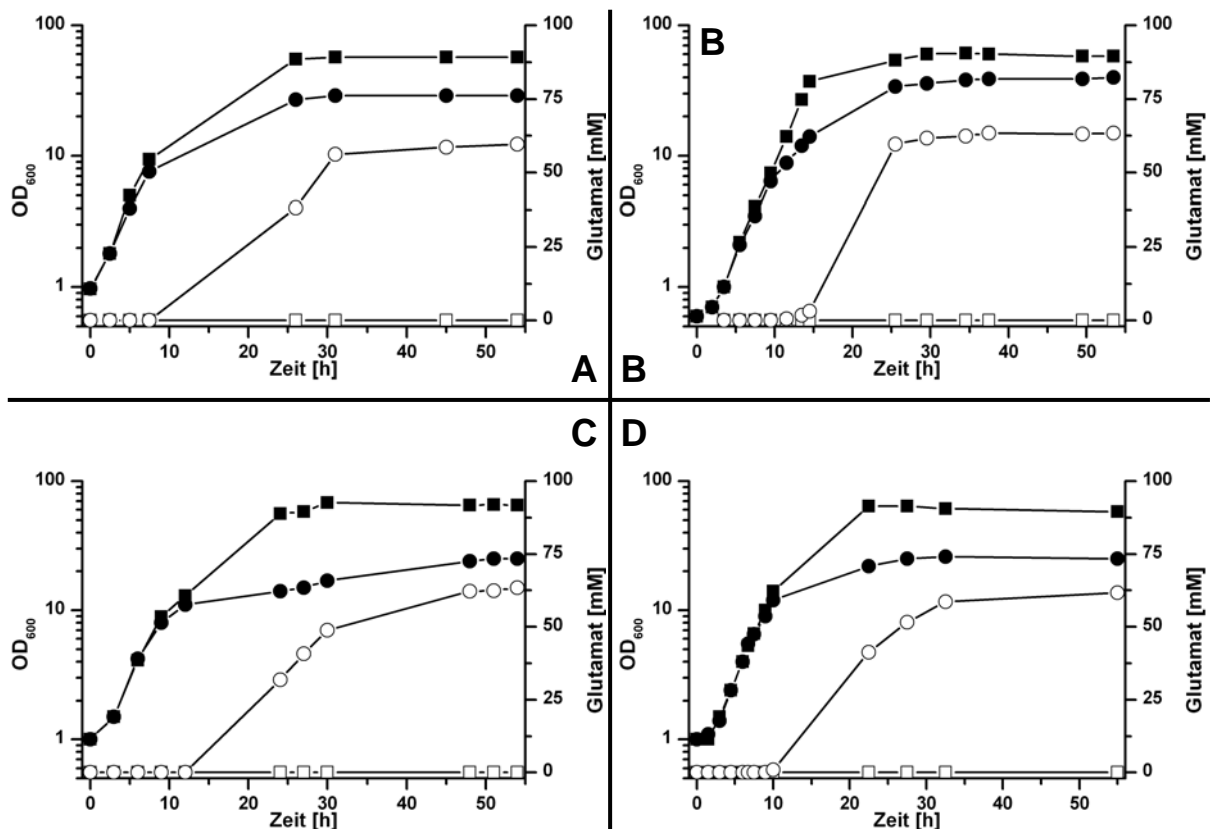


Abbildung 6: Einfluss von Biotin-Mangel (A), Ethambutol (B), Penicillin G (C) und Tween40 (D) auf Wachstum (geschlossene Symbole) und Glutamatausscheidung (offene Symbole) von *C. glutamicum* ATCC 13032 in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Dargestellt sind jeweils die OD₆₀₀ und die extrazelluläre Glutamatkonzentration in Anwesenheit (●, ○) sowie Abwesenheit (■, □) von Stimulanzien der Glutamatausscheidung.

2.1.1 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel

Der Einfluss von Biotin-Mangel auf die globale Genexpression von *C. glutamicum* 13032 wurde mittels Transkriptomanalysen untersucht. Hierfür wurden jeweils zwei Kultivierungen unter Biotin-Mangel und unter Biotin-Überschuss durchgeführt und die Zellen zur Analyse der mRNA zwischen OD₆₀₀ 4 - 6 in der exponentiellen Phase geerntet. Nach Herstellung der markierten cDNA-Sonden durch reverse Transkriptase wurden die relativen mRNA-Spiegel (Biotin-Mangel/Biotin-Überschuss) durch simultane Hybridisierung auf DNA-Chips bestimmt.

In Tabelle 4 sind die Gene zusammengestellt, die signifikant (p -Wert <0,05) mindestens dreifach veränderte mRNA-Verhältnisse aufwiesen. Während für 8 Gene eine erhöhte Expression festgestellt werden konnte, wies kein Gen einen verringerten mRNA-Spiegel auf. Interessanterweise sind die verstärkt exprimierten Gene vor allem an der Synthese (*bioA*, *bioB*) und der Aufnahme (*bioY*) von Biotin beteiligt. Ein weiteres Gen (*NCgl1884*), das stromabwärts von *bioY* liegt, zeigte ebenfalls einen erhöhten mRNA-Spiegel. Diese Gen

weist Ähnlichkeiten zu *bioM* aus *Sinorhizobium meliloti* auf, das für die ATPase-Untereinheit eines ABC-Transporters kodiert und in den Transport von Biotin involviert ist (Entcheva *et al.*, 2002). Stromabwärts davon liegt ein Gen (*NCgl1885*), das für eine ABC-Transporter-Permease kodiert. Die genomische Organisation der Gene *bioY*, *NCgl1884* und *NCgl1885* ist in den *Corynebacterium*-Spezies *glutamicum*, *efficiens* und *diphtheriae* konserviert, was auf eine Operonstruktur und Beteiligung aller drei Gene am Biotin-Stoffwechsel deutet. Die erhöhte Expression von Genen des Biotin-Metabolismus ist insofern überraschend, als *C. glutamicum* Biotin-auxotroph ist. Offenbar besteht trotz der Biotin-Auxotrophie dieses Stammes noch ein Biotin-abhängiger Regulationsmechanismus.

Tabelle 4: Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter Biotin-Mangel.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	Biotin – Mangel ⁴	
			Biotin – Mangel	Biotin – Überschuss
NCgl0071	450	Biotin-Synthase (<i>bioB</i>)	6,6	
NCgl0072	451	hypothetisches Protein	5,4	
NCgl0073	452	hypothetisches Protein	9,9	
NCgl1883	2048	Membranprotein, BioY-Familie	18,1	
NCgl1884	2049	ABC-Transportsystem, ATP-bindendes Protein	4,9	
NCgl2248	3092	Isocitrat-Lyase (<i>aceA</i>)	3,1	
NCgl2514	2835	Dipeptid-/Tripeptid-Permease	8,7	
NCgl2515	2834	Adenosylmethionin-8-amino-7-oxononanoat-Transaminase (<i>bioA</i>)	3,7	

¹Korrespondierende NCBI-Annotation (NC003450). Sofern keine entsprechende Annotation existiert, ist die Position in Klammern angegeben.

²Nummern der offenen Leseramen (ORFs) der Biomax-Annotation (öffentlich nicht zugänglich).

³Ähnlichstes Gen aus öffentlichen Datenbanken oder beschriebenes *C. glutamicum*-Gen.

⁴Hierbei handelt es sich um gemittelte mRNA-Verhältnisse.

Durch die Transkriptomanalysen konnte somit gezeigt werden, dass nach Induktion der Glutamat-exkretion durch Biotin-Mangel nur spezifisch Gene der Biotin-Synthese und -Aufnahme, nicht aber Gene des Zentralstoffwechsels, der Lipid- und Zellwandsynthese oder Gene der Produktion und Ausscheidung von L-Glutamat verändert exprimiert wurden.

2.1.2 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Ethambutol

Durch DNA-Chip-Analysen wurde der Einfluss von Ethambutol auf die Genexpression von *C. glutamicum* ATCC 13032 untersucht. Zu diesem Zwecke wurden in drei unabhängigen Experimenten Zellen parallel in An- oder Abwesenheit von Ethambutol kultiviert, in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ 3 - 5) geerntet und die RNA anschließend extrahiert. Nach

Hybridisierung markierter cDNAs auf DNA-Chips wurden die relativen mRNA-Spiegel (An-/Abwesenheit von Ethambutol) ermittelt.

Während des Wachstums in Anwesenheit von Ethambutol wiesen insgesamt 14 Gene einen signifikant (p -Wert $<0,05$) mindestens dreifach reduzierten und 7 Gene einen entsprechend erhöhten mRNA-Spiegel auf (Tab. 5). Darunter waren vor allem Gene, die für hypothetische Proteine, putative Permeasen, putative Transportproteine und putative Regulatoren kodieren. Das Chemotherapeutikum Ethambutol greift durch Interaktion mit Arabinosyltransferasen der Arabinogalactan- und Lipomannan-Synthese in die Zellwandstruktur ein (Belanger *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Mikusova *et al.*, 1995). Jedoch zeigten weder das Gen *emb* (*NCgl0184*), welches in *C. glutamicum* für eine Arabinosyltransferase kodiert, noch andere unmittelbar an der Zellwandsynthese beteiligte Gene eine Ethambutol-abhängige Expression. Stattdessen konnte für eine Reihe von Genen für Membranproteine veränderte mRNA-Spiegel beobachtet werden. Beispielsweise wies ein Gen des *gluABCD*-Operons (*NCgl1877*), das für ein L-Glutamat-Aufnahmesystem kodiert (Kronemeyer *et al.*, 1995), ein dreifach reduziertes mRNA-Verhältnis auf. Ein putatives Operon von Genen eines Oligopeptid-ABC-Transporters (*NCgl1915-1917*) zeigte verringerte mRNA-Spiegel, ebenso verschiedene sekretierte Proteine, deren Funktion bisher jedoch unbekannt ist.

Das am stärksten induzierte Gen in diesem Experiment war *mepA* (*NCgl2411*), das für eine putative sekretierte Metalloendopeptidase kodiert (Möker *et al.*, 2004). Homologe dieses Gens sind unter anderem in *M. tuberculosis* und *E. coli* zu finden. In letzterem Organismus scheint es bei dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase eine Rolle zu spielen (Lange & Hengge-Aronis, 1994). Die Überexpression von *mepA* aus *C. glutamicum* in *E. coli* führt zu lang gestreckten Zellen, die darüber hinaus sensitiv auf hypoosmotischen Schock reagieren (Möker *et al.*, 2004). Diese Beobachtung untermauert die Annahme, dass MepA möglicherweise durch Abspaltung von bereits inkorporierten Peptiden an einer Umstrukturierung des Peptidoglykans beteiligt ist. Die Expression von *mepA* wird in *C. glutamicum* durch das Zwei-Komponenten-System MtrAB reguliert, unter dessen Kontrolle auch die Expression von Genen der Osmoprotektion (*betP*, *proP*) steht (Möker *et al.*, 2004). Tatsächlich wiesen *betP* und *proP* in Anwesenheit von Ethambutol zweifach reduzierte mRNA-Spiegel auf (Tab. A3, siehe Anhang). *yggB* (*NCgl1221*), das für einen mechano-sensitiven Kanal kodiert und wie *betP* und *proP* ebenfalls an der Kompensation osmotischen Stresses beteiligt ist (Nottebrock *et al.*, 2003; Peter *et al.*, 1998a; Peter *et al.*, 1998b), zählt nicht zu dem MtrAB-Regulon (Möker *et al.*, 2004). In Anwesenheit von Ethambutol wurde dieses Gen jedoch wie *mepA* verstärkt exprimiert. Während für die Gene des Zwei-Komponenten-System MtrAB keine veränderte Expression festgestellt werden konnte, wies

phoR, das für den Regulator des PhoRS-Signaltransduktionssystems kodiert, ein mRNA-Verhältnis von 3,3 auf. Untersuchungen zur Reizantwort von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf Phosphatmangel deuten auf eine Beteiligung dieses Systems an der Phosphat-abhängigen Kontrolle der Genexpression (Ishige *et al.*, 2003). Die Wachstums-experimente in An- und Abwesenheit von Ethambutol wurden jedoch in Gegenwart von Phosphat durchgeführt, so dass keine Mangelsituation entstehen konnte. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass für keine weiteren Gene des PhoRS-Regulons eine veränderte Expression beobachtet werden konnte.

Tabelle 5: Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 in Anwesenheit von Ethambutol.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	$\frac{+ \text{Ethambutol}}{- \text{Ethambutol}}$ ⁴
(2996809-2997021)	190	hypothetisches Protein	0,3
NCgl0697	1245	ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	0,3
NCgl0776	1349	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem	0,3
NCgl1131	1774	putative sekretierte Hydrolase	0,3
NCgl1288	2705	putatives sekretiertes Protein	0,2
NCgl1289	2703	putatives sekretiertes Protein	0,2
NCgl1588	3268	putatives sekretiertes Protein	0,2
NCgl1625	3618	hypothetisches Protein	0,3
NCgl1646	3347	putative sekretierte Hydrolase	0,1
NCgl1647	3348	putatives sekretiertes Protein	0,3
NCgl1656	3359	putatives sekretiertes Protein	0,3
NCgl1877	2042	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Permease (<i>gluC</i>)	0,3
NCgl1915	2092 2093	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	0,1
NCgl1916	2094	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	0,3
NCgl1917	2095	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	0,2
NCgl2970	3458	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	0,1
NCgl0057	431 432	hypothetisches Protein	5,5
NCgl0059	434	putatives sekretiertes Protein	3,4
NCgl1221	2795	mechanosensitiver Ionenkanal (<i>yggB</i>)	3,6
NCgl2411	3507	sekretierte Metalloendopeptidase (<i>mepA</i>)	7,7
NCgl2518	2831	Zwei-Komponenten-System, Regulator (<i>phoR</i>)	3,3
NCgl2944	1938	hypothetisches Protein	4,3
NCgl2946	1941	hypothetisches Protein	3,5

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Wie bereits beschrieben, hatten zeitlich festgelegte Wachstumsexperimente und nachfolgende Aminosäure-Bestimmungen ergeben, dass die Glutamatausscheidung unabhängig vom jeweiligen Auslöser immer erst in der späten exponentiellen Phase begann (Abb. 6). Um einen Einblick in die differenzielle Genexpression zu gewinnen, wurden deshalb parallele Kultivierungen von *C. glutamicum* ATCC 13032 in An- und Abwesenheit von Ethambutol durchgeführt und die Zellen zur RNA-Analyse vor und 2, 4, 6, 8, 10, 15 sowie 25 h nach Zugabe von Ethambutol geerntet. Die Experimente im Zeitraum von 0 bis 10 h nach Zugabe von Ethambutol wurden zweimal durchgeführt, während die Untersuchung der Zeitpunkte 15 und 25 h nur jeweils einmal erfolgte. Nach Hybridisierung markierter cDNA-Sonden auf DNA-Chips wurden die relativen mRNA-Verhältnisse (An-/Abwesenheit von Ethambutol) zu dem jeweiligen Zeitpunkt bestimmt.

In Tabelle 6 sind die Gene zusammengefasst, die in Anwesenheit von Ethambutol zu mindestens einem Zeitpunkt eine signifikant (p -Wert $<0,05$) drei- oder mehrfach veränderte Expression aufwiesen. Der Vergleich mit Tabelle 5 zeigt zunächst, dass sich die Zahl signifikanter Veränderungen auch in der späten exponentiellen Phase nur wenig ändert. Die Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass auch in der mittleren bis späten exponentiellen Phase keine signifikante Veränderung der Expression von Genen des Zentralstoffwechsels, der Aminosäure-, Lipid- oder Zellwandsynthese stattfindet. Darüber hinaus wird offensichtlich, dass einige der in Tabelle 5 für die frühe exponentielle Phase beschriebenen Gene mit veränderten mRNA-Spiegeln zu späteren Zeitpunkten noch drastischere Expressionsveränderungen (um maximal das 34-fache) erfuhren, darunter auch *mepA*, dem bereits ein Bezug zur Zellwand zugeschrieben werden konnte (Möker *et al.*, 2004). Zwei weitere hypothetische Operons (*NCgl0057-0059* und *NCgl2944-2946*) wiesen ebenfalls stark erhöhte mRNA-Spiegel auf, jedoch konnte den einzelnen Genen trotz Datenbankvergleiche bisher noch keine Funktion zugeordnet werden.

Tabelle 6: Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 25 h nach Zugabe von Ethambutol. Fett gedruckt sind Gene mit ≥ 10 erhöhten oder gesenkten mRNA-Spiegeln.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	0h ⁴	2h ⁴	4h ⁴	6h ⁴	8h ⁴	10h ⁴	15 h	25 h
(152824-153009)	535	hypothetisches Protein	1,1	1,0	1,9	3,3*	3,1*	4,0	2,9	1,3
(2888165-2888362)	66	hypothetisches Protein	1,2	0,9	0,7*	0,3	0,3	0,2*	0,1	0,2
NCgl0023	3526	stress-induziertes Protein	1,0	0,9	1,0	0,7	0,3*	0,3*	2,0	2,0
NCgl0025	3528	hypothetisches Protein	1,1	1,1	0,4	0,5	0,1*	0,1	n.a.	1,6
NCgl0057	431 432	hypothetisches Protein	0,7*	1,7	8,9	18,4	26,2	28,2*	1,5	2,8
NCgl0059	434	putatives sekretiertes Protein	0,7*	1,4	4,8	9,1*	16,5*	9,2*	2,5	2,2

Tabelle 6 (ff): Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 25 h nach Zugabe von Ethambutol. Fett gedruckt sind Gene mit ≥ 10 erhöhten oder gesenkten mRNA-Spiegeln.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	0h ⁴	2h ⁴	4h ⁴	6h ⁴	8h ⁴	10h ⁴	15 h	25 h
NCgl0076	456	hypothetisches Protein	0,7	1,6	1,6	2,4	3,0*	3,1	n.a.	3,0
NCgl0394	878	putatives ABC-Transportsystem, Permease	1,0	1,7*	2,6*	3,9*	5,5	3,9*	1,8	2,0
NCgl0498	997	hypothetisches Protein	0,9	2,0*	4,3*	5,5*	9,6*	7,4*	5,4	1,5
NCgl0510	1011	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, ATPase	1,1*	0,5*	0,4*	0,3*	0,4*	0,3	2,0	1,8
NCgl0511	1012	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, Permease	0,9	0,5	0,4	0,2*	0,5	0,2	3,9	2,6
NCgl0512	1013	hypothetisches Membranprotein	0,9	0,5	0,4	0,3	0,4*	0,2*	1,0	1,6
NCgl0513	1014	hypothetisches Protein	1,0	0,6	0,5	0,3*	0,5	0,4	1,0	1,5
NCgl0576	1097	putative sekretierte saure Phosphatase	1,0	1,5	1,9	2,6	3,4	6,0*	2,6	0,3
NCgl0623	1152	hypothetisches Protein	0,7	1,9	2,8	4,5*	4,7*	3,8	1,3	1,5
NCgl0768	1337	ATP-bindendes Protein der Zellteilung (<i>ftsE</i>)	1,0	1,7	1,7	2,0*	3,2	3,1*	1,0	2,4
NCgl1131	1774	putative sekretierte Hydrolase	1,2	0,7	0,5*	0,3	0,1*	0,2	0,8	1,8
NCgl1159	1807	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpB</i>)	1,2	0,8*	0,8*	0,6*	0,4*	0,3*	0,3	1,0
NCgl1160	1808	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpE</i>)	1,1	0,7	0,8*	0,6	0,6*	0,3*	0,6	1,2
NCgl1161	1809	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpF</i>)	1,1	0,7*	0,8*	0,7	0,6	0,3*	0,7	1,0
NCgl1162	1810	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpH</i>)	1,1	0,6	0,7	0,5	0,5*	0,2*	0,5	1,1
NCgl1163	1811	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpA</i>)	1,1	0,8	0,7	0,6	0,6	0,3*	0,5	0,9
NCgl1170	1818	putative Methylmalonyl-CoA-Epimerase	1,1	0,7	0,6	0,4	0,4*	0,3*	0,2	0,3
NCgl1221	2795	mechanosensitiver Ionen-Kanal (<i>yggB</i>)	1,0	2,3	4,3*	4,9*	3,6	4,1*	1,0	1,2
NCgl1288	2705	putatives sekretiertes Protein	1,0	0,7*	0,3	0,3	0,3*	0,2	0,1	0,4
NCgl1289	2703	putatives sekretiertes Protein	1,1	0,7	0,5	0,4*	0,4*	0,3*	0,2	0,5
NCgl1337	2632	putative Esterase	1,0	1,2	0,8	0,3*	0,3	0,3*	1,0	1,1
NCgl1588	3268	putatives sekretiertes Protein	0,8	0,8	0,4*	0,1*	0,1	0,1*	0,1	0,3
NCgl1625	3618	hypothetisches Protein	1,0	0,7	0,4*	0,3	0,3*	0,2*	0,1	0,2
NCgl1646	3347	hypothetisches Protein	1,0	0,3	0,2*	0,4	0,4*	0,6	1,1	0,4
NCgl1656	3359	putatives sekretiertes Protein	0,9	0,6	0,4*	0,3*	0,6	0,4*	0,7	0,4
NCgl1708	3428	hypothetisches Protein	1,0	1,0	0,9	0,9	0,3	0,3*	n.a.	0,5
NCgl1877	2042	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Permease (<i>gluC</i>)	1,0	0,8	0,5*	0,3*	0,6	1,3	1,3	1,4
NCgl1929	2111	hypothetisches Membranprotein	0,8	0,8	0,6	0,4	0,5	0,3*	0,1	0,2
NCgl2033	2240	putatives ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	1,0	1,4	2,6*	3,0*	3,1*	4,2*	1,8	0,9
NCgl2034	2241	Mar-ähnlicher Regulator	1,0	1,8*	2,9*	3,7*	5,0	4,0*	1,9	0,8

Tabelle 6 (ff): Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 25 h nach Zugabe von Ethambutol. Fett gedruckt sind Gene mit ≥ 10 erhöhten oder gesenkten mRNA-Spiegeln.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	0h ⁴	2h ⁴	4h ⁴	6h ⁴	8h ⁴	10h ⁴	15 h	25 h
NCgl2109	2332	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>qcrB</i>)	1,1	1,1	0,8	0,5	0,5	0,3*	0,2	0,5
NCgl2111	2334	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>qcrC</i>)	1,1	1,1	0,8	0,5	0,5	0,3*	0,3	0,3
NCgl2112	2335	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>ctaE</i>)	1,2	1,1	0,7	0,6	0,6	0,3*	0,2	0,1
NCgl2411	3507	sekretierte Metalloendopeptidase (<i>mepA</i>)	1,1	5,7	6,3*	14,9*	13,7*	9,6*	27,2	15,5
NCgl2518	2831	Zwei-Komponenten-System, Regulator (<i>phoR</i>)	0,9	1,8	2,6*	3,0*	3,1	3,2*	0,8	0,6
NCgl2944	1938	hypothetisches Protein	0,7	1,0	2,7	6,1*	14,2*	18,3*	34,0	18,7
NCgl2946	1941	hypothetisches Protein	1,0	1,2*	2,2	6,3	9,8*	6,6	9,4	10,7
NCgl2961	3444	Prolin-/Ectoin-Carrier (<i>proP</i>)	1,1	0,8	0,5	0,3*	0,5	0,8	1,6	4,5
NCgl2970	3458	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	1,0	0,3	0,3*	0,1*	0,1	0,4	6,8	1,7

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4. Nicht auswertbare Daten sind mit n.a. gekennzeichnet.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse (Eisen *et al.*, 1998) mit den mRNA-Spiegeln aller Gene der Tabellen 5 und 6, die in mindestens 75% der Experimente detektierbar waren. Hierbei wurden Gene und Experimente nach Ähnlichkeit des Expressionsverhaltens angeordnet. Je näher sie in der Darstellung benachbart sind, desto ähnlicher ist das Muster der Expressionsveränderungen. Ziel der Darstellung ist die Einordnung der Gene in Gruppen, die einer gemeinsamen Regulation unterliegen.

Die Analyse globaler Genexpressionsmuster zeigte deutliche Unterschiede in den durchgeführten Experimenten (in den Spalten der Abb. 7), die sich wie erwartet entsprechend der untersuchten Zeitpunkte in drei Subclustern gruppierten: (A) Kontrolle (0h), (B) frühe bis mittlere exponentielle Phase (2 - 10h) und (C) späte exponentielle bis stationäre Phase (15 - 25 h).

Bei der Anordnung der Gene (in den Zeilen der Abb. 7) konnten drei große Gruppen von Expressionsmustern identifiziert werden. In Gruppe 1 sind 13 Gene enthalten, die im Zeitraum von 2 bis 10 h nach Zugabe von Ethambutol transient verringert exprimiert wurden und höchstens zwischen 15 und 25 h erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen. Den Hauptanteil machen Gene aus, die in Transportprozesse involviert sind. Hierzu zählen Gene eines Oligopeptid-Aufnahmesystems (*NCgl1915-1917*), ein Gen des *gluABCD*-Operons (*NCgl1877*), das für einen Transporter zur Aufnahme von Glutamat kodiert (Kronemeyer *et al.*, 1995), und Gene eines putativen Kobalt-Transporters (*NCgl0510-0512*).

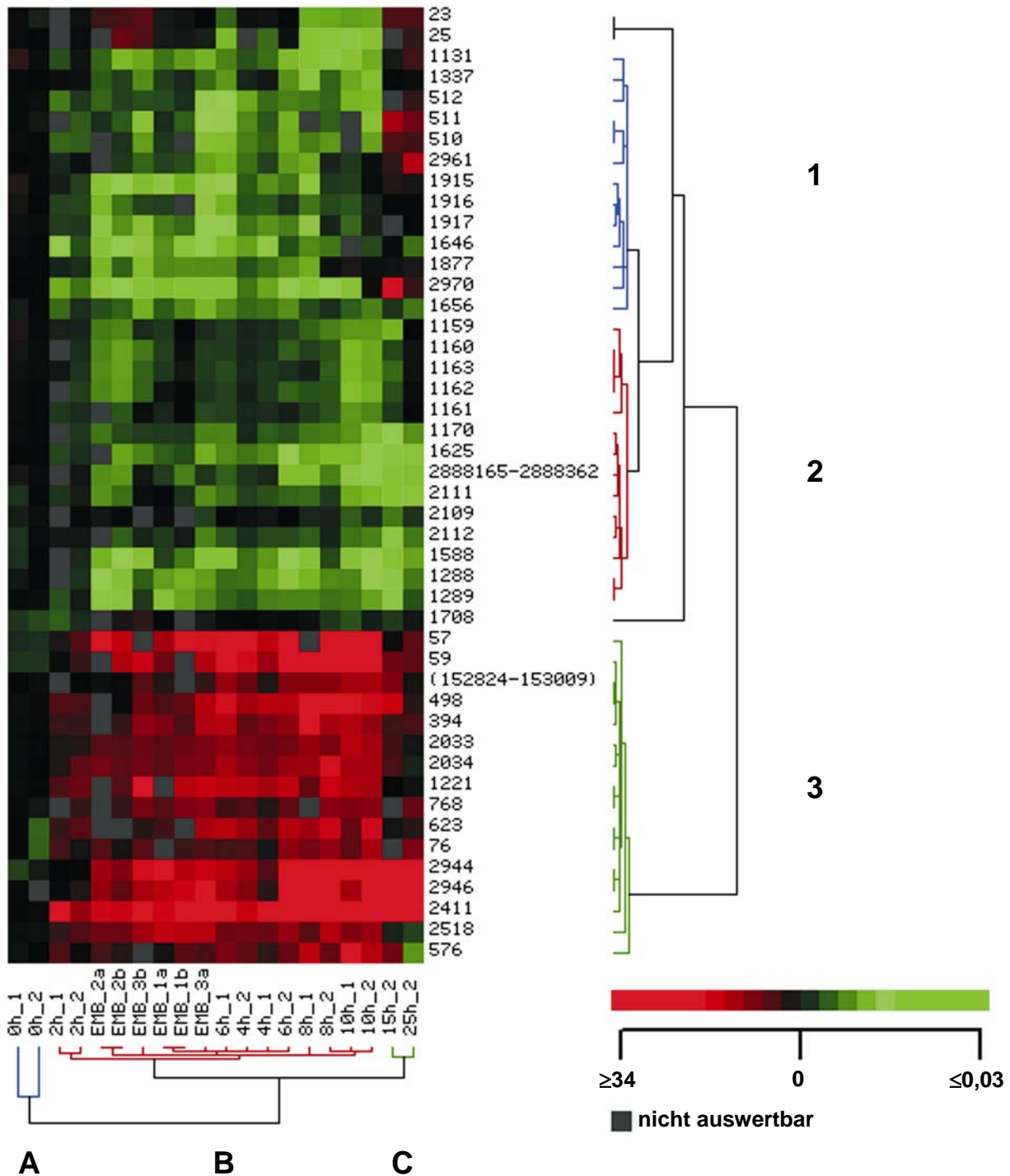


Abbildung 7: Hierarchische Clusteranalyse zur Identifizierung von Gen-Gruppen mit ähnlichem Expressionsverhalten bei *C. glutamicum* ATCC 13032 in Anwesenheit von Ethambutol.

Es wurden Gene aus den Tabellen 6 und 7 berücksichtigt, soweit die mRNA-Spiegel in ≥ 15 von 20 Experimenten detektierbar waren. Die durch die NCgl-Ziffern bezeichneten Gene sind in Reihen angeordnet. Die Experimente sind in Spalten festgehalten und wurden mit dem jeweiligen Zeitpunkt (0h, 2h, ff.) bzw. bei Ernte der Zellen zu einer festgelegten OD_{600} mit „EMB“ beschriftet. Ziffern dienen der Unterscheidung von biologischen, Buchstaben der Unterscheidung von technischen Wiederholungsexperimenten. Rot bedeutet entsprechend der Farbskala eine erhöhte Expression in Anwesenheit von Ethambutol, grün weist auf eine reduzierte Expression hin (grau: nicht messbar). Im Text diskutierte Gruppen von Genen sind durch Zahlen, Gruppen von Experimenten durch Buchstaben gekennzeichnet.

Die 12 Gene der Gruppe 2 zeigten nach Ethambutol kontinuierlich verringerte mRNA-Spiegel, wobei das Ausmaß der Repression in der frühen und der späten Wachstumsphase besonders stark war. Ein großer Teil dieser Gene ist am respiratorischen Energiehaushalt der Zelle beteiligt. Die reduzierte Expression von Genen der F_0F_1 -ATP-Synthase (*NCgl1159-1163*) (Sekine *et al.*, 2001) ist möglicherweise auf das verringerte Wachstum der Zellen in Gegenwart von Ethambutol zurückzuführen. Dies steht im Einklang zu Untersuchungen zum Wachstum von Bakterien unter oligotrophen Bedingungen (Ishige *et al.*, 2003; Morita, 1997). Gruppe 3 umfasst 12 Gene, die eine kontinuierlich erhöhte Expression nach Zugabe von Ethambutol aufwiesen, wobei der Expressionsgrad entweder konstant hoch war (*mepA/NCgl2411*) oder sein Maximum in der mittleren exponentiellen Phase erreichte. Zur Gruppe 3 zählen unter anderem Zellwand- oder Zellteilungs-korrelierte Gene wie *mepA* (*NCgl2411*), das für eine Metalloendopeptidase kodiert, und *ftsE* (*NCgl0768*), dessen Produkt ein in der Zellteilung involviertes, ATP-bindendes Protein ist. Neben *yggB* (*NCgl1221*) gehört zu dieser Gruppe auch Gene, die an einem Transportprozess beteiligt sind (*NCgl2033-2034*). Interessanterweise konnte in einer vergleichenden Analyse globaler Genexpressionsveränderungen in *E. coli* in Gegenwart von Ampicillin für eine große Zahl von Membranproteinen veränderte mRNA-Spiegel nachgewiesen werden (Shaw *et al.*, 2003). Durch Ethambutol auf die Zellwand ausgeübter Stress könnte somit ebenfalls vor allem die Expression von Membranproteinen beeinflussen.

Die Zugabe von Ethambutol führte somit zu einer Vielfalt von Expressionsveränderungen, die vor allem Gene betrafen, die für Transporter, Komponenten des Energiehaushalts und Enzyme der Zellwandorganisation kodieren.

2.1.3 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Penicillin

Um den Einfluss von Penicillin auf die genomweite Expression von *C. glutamicum* ATCC 13032 zu untersuchen, wurden weitere DNA-Chip-Analysen durchgeführt, wobei der Wildtyp nach Wachstum in An- und Abwesenheit von Penicillin G verglichen wurde. Nach Extraktion von RNA dreier unabhängiger Kultivierungen und Hybridisierung markierter cDNA-Sonden auf DNA-Chips wurden relative mRNA-Spiegel (Anwesenheit von Penicillin/Abwesenheit von Penicillin) bestimmt. Überraschenderweise konnte jedoch für kein Gen eine signifikant ($p < 0,05$) mindestens dreifach veränderte Expression festgestellt werden.

Das Antibiotikum Penicillin G verhindert die Quervernetzung von Mureinbausteinen durch Transpeptidierung, indem es die Aktivität von Transpeptidasen inhibiert und an die

terminalen D-Ala-D-Ala-Reste unverzweigten Peptidoglykans bindet (Walsh, 1989). Die Expression von Transpeptidase-Genen wurde jedoch nicht durch die Gegenwart von Penicillin G beeinflusst. Untersuchungen zur genomweiten Expression von *E. coli* in Anwesenheit von des β -Lactam-Derivats Ampicillin wiesen ebenfalls auf eine konstitutive Expression von Genen für Transpeptidasen hin (Shaw *et al.*, 2003).

Die Transkriptomanalysen deuten darauf hin, dass *C. glutamicum* dem Effekt des β -Lactam-Antibiotikums Penicillin G weder durch eine verstärkte Bereitstellung von mRNA der Gene der Zellwandsynthese entgegenwirkt, noch dass andere Gene in ihrer Expression durch dieses Antibiotikum beeinflusst werden.

2.1.4 Transkriptomanalysen nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Zugabe von Tween40

Die Transkriptome von *C. glutamicum* ATCC 13032 in Anwesenheit und Abwesenheit von Tween40 wurden mit Hilfe von DNA-Chip-Analysen verglichen. Zu diesem Zwecke wurden in drei unabhängigen Experimenten Zellen parallel in An- oder Abwesenheit von Tween40 kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet und die RNA anschließend extrahiert. Anschließend wurden fluoreszenzmarkierte cDNAs simultan auf DNA-Chips hybridisiert und die mRNA-Verhältnisse (Anwesenheit-/Abwesenheit von Tween40) ermittelt.

In Tabelle 7 sind 27 Gene zusammengestellt, die signifikant (p -Wert $<0,05$) mindestens dreifach veränderte mRNA-Verhältnisse aufwiesen. Während für 19 Gene eine reduzierte Expression festgestellt werden konnte, zeigten 8 Gene einen erhöhten mRNA-Spiegel. In Anwesenheit von Tween40 mindestens dreifach verringert exprimierte Gene können vor allem den Funktionen Transport, Energiehaushalt und Proteinsynthese zugeordnet werden. Zwei Gene des Eisen-Transports (*NCgl0774* und *NCgl2970*) wiesen eine fünf- bis 10-fach verringerte Expression auf. Beide Gene sind Teil eines Stimulons des Eisenmangels (Krug *et al.*, 2005). Es ist daher zu vermuten, dass die Verfügbarkeit von Eisen während des Wachstums in Anwesenheit von Tween40 limitiert ist. Da in dem verwendeten Medium die Konzentration verwertbaren Eisens gering war und unterschiedlich schnelles Wachstum häufig zu Expressionsänderungen der Eisenaufnahmesysteme führt, könnten die verringerten mRNA-Spiegel von Genen des Eisen-Transports auf dem langsameren Wachstum von *C. glutamicum* nach Zugabe von Tween40 beruhen. Darüber hinaus zeigten ein Gen (*NCgl0026*), das für eine Untereinheit eines Zink-Transporters kodiert von Mangan (*NCgl2239*), und ein Gen des *gluABCD*-Operons (*NCgl1877*), das für ein L-Glutamat-Aufnahmesystem kodiert (Kronmeyer *et al.*, 1995), reduzierte mRNA-Verhältnisse in

Gegenwart von Tween 40. Gene der F_0F_1 -ATP-Synthase (*NCgl1159-1163*) (Sekine *et al.*, 2001) wiesen mRNA-Spiegel von 0,2 - 0,3 auf, was auf Veränderungen im Energiehaushalt der Zelle in Anwesenheit von Tween40 deuten könnte. Wie schon für Ethambutol vermutet, könnte die verringerte Expression von Genen der F_0F_1 -ATP-Synthase auf das schlechte Wachstum im Vergleich zur Kontrolle zurückzuführen sein. Dies wird durch die verringerte Expression von Gene ribosomaler Untereinheiten untermauert.

Fast alle der in Gegenwart von Tween40 verstärkt exprimierten Gene wiesen auch in Anwesenheit von Ethambutol erhöhte mRNA-Spiegel auf. Die stärksten Veränderungen konnten für zwei Gene eines putativen Operons (*NCgl0057*, *NCgl0059*) festgestellt werden, deren Funktion allerdings unbekannt ist. Da *NCgl0059* jedoch Ähnlichkeiten zu *cothH* aus *Bacillus subtilis* aufweist, das an der Bildung der Sporenhülle beteiligt ist (Naclerio *et al.*, 1996; Zilhao *et al.*, 1999; Zilhao *et al.*, 2004) liegt die Vermutung nahe, dass das Gen *NCgl0059* in dem nicht-sporenbildenden Bakterium *C. glutamicum* an der Synthese oder Restrukturierung der Zellwand beteiligt sein könnte. Für *NCgl1221* und *NCgl2411* konnte ebenfalls in Anwesenheit von Tween40 und Ethambutol eine erhöhte Expression festgestellt werden. Die beiden Gene kodieren für die Membranproteine YggB und MepA. Während der mechanosensitive Kanal YggB jedoch am Efflux kompatibler Solute unter hypoosmotischem Stress beteiligt ist (Nottebrock *et al.*, 2003), spielt die sekretierte Metalloendopeptidase MepA möglicherweise bei der Restrukturierung des Peptidoglycans eine Rolle (Möker *et al.*, 2004). Marcyjaniak *et al.* (2004) konnten zeigen, dass MepA in *E. coli* als periplasmatische, penicillininsensitive Mureinendopeptidase die D-Alanyl-meso-2,6-diamino-pimelyl-Amidbrücke des Peptidoglycans spaltet. Die Insensitivität von MepA gegenüber Penicillin könnte auch erklären, weshalb dieses Gen in den Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* in Anwesenheit dieses Antibiotikums nicht aufgefallen war.

Für *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass die Deletion der β -Untereinheit *AccBC* einer Acetyl-CoA-Carboxylase, die in der Fettsäuresynthese involviert ist (Gande *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 1997), zu erhöhter Detergensen sensitivität und konstitutiver Exkretion von L-Glutamat führt (Kimura *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999). Kimura *et al.* postulierten, dass *accBC* (andere Bezeichnung: *dtsR* für engl. *detergent sensitive protein*) das Angriffsziel von Tween40 ist. Tatsächlich wiesen die Gene der α - und β -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase *accBC* (*NCgl0670*) und *accD1* (*NCgl0678*) in Gegenwart von Tween40 zweifach reduzierte mRNA-Spiegel auf (Tab. A6, siehe Anhang). Offenbar greift Tween40 auf direktem oder indirektem Wege in die Transkription der Acetyl-CoA-Carboxylase und somit in die Fettsäuresynthese ein. Interessanterweise wurde auch ein Gen (*NCgl0025*), das für ein putatives Lipoprotein kodiert, fünffach verringert exprimiert.

Tabelle 7: Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Zugabe von Tween40.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	+ Tween40 ⁴	
				- Tween40
NCgl0025	3528	putatives Lipoprotein		0,2
NCgl0026	3529 67007	putatives Zink-Aufnahmesystem, Bindeprotein		0,2
NCgl0488 NCgl0489	3775	ribosomales Protein L23 (<i>rplD</i>)		0,3
NCgl0493	992	ribosomales Protein S3 (<i>rpsC</i>)		0,3
NCgl0536	1044	Translationsinitiationsfaktor IF-1 (<i>infA</i>)		0,3
NCgl0774	1347	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein		0,2
NCgl1159	1807	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpB</i>)		0,2
NCgl1160	1808	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpE</i>)		0,3
NCgl1161	1809	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpF</i>)		0,3
NCgl1162	1810	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpH</i>)		0,2
NCgl1163	1811	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpA</i>)		0,2
NCgl1625	3618	hypothetisches Protein		0,2
NCgl1646	3347	putative sekretierte Hydrolase		0,3
NCgl1859	2019	Transkriptionsregulator des Zuckermetabolismus, DeoR-Familie		0,3
NCgl1877	2042	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Permease(<i>gluC</i>)		0,3
NCgl2553	69134	hypothetisches Protein		0,3
NCgl2562	67057	hypothetisches Protein		0,3
NCgl2970	3458	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein		0,1
NCgl2972	3460	hypothetisches Protein		0,2
NCgl0057	431 432	hypothetisches Protein		22,3
NCgl0059	434	putatives sekretiertes Protein		8,2
NCgl0516	1018	ribosomales Protein L6 (<i>rplF</i>)		3,4
NCgl1221	2795	mechanosensitiver Ionen-Kanal (<i>yggB</i>)		3,9
NCgl1253	2748	Enzym der Thiamin-Synthese (<i>thiC</i>)		3,1
NCgl2411	3507	sekretierte Metalloendopeptidase (<i>mepA</i>)		3,3
NCgl2518	2831	Zwei-Komponenten-System, Regulator (<i>phoR</i>)		5,7
NCgl2940	1933	konserviertes hypothetisches Protein		3,7

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4.

2.2 Identifizierung von Transkriptommustern

Zur Klärung der Frage, ob es ein Genexpressionsmuster gibt, das unabhängig von der Art der Induktion bei der Glutamatausscheidung auftritt, wurde eine hierarchischen Clusteranalyse (Eisen *et al.*, 1998) mit den Genen der Tabellen 4, 5, 7 und A5 (siehe Anhang) durchgeführt, soweit sie in 50% der durchgeführten Experimente auswertbar waren. Wie Abbildung 8 jedoch verdeutlicht, existiert ein solches Muster nicht.

Die Analyse der globalen Genexpressionsmuster zeigte deutliche Unterschiede in den durchgeführten Experimenten (in den Spalten der Abb. 8), die sich entsprechend der untersuchten Auslöser der Glutamatausscheidung in vier Subclustern gruppierten: Biotin-Mangel (A), Penicillin (B), Ethambutol (C) und Tween40 (D). Die Experimente zur Induktion durch Biotin-Mangel bildeten eine strikt von allen anderen Experimenten abgegrenzte Gruppe, während die Ähnlichkeiten zwischen Experimenten zur Induktion durch Ethambutol und Tween40 am größten waren.

Bei der Anordnung der Gene (in den Zeilen der Abb. 8) konnten fünf große Gruppen von Expressionsmustern identifiziert werden. Die 23 Gene der Gruppe 1 wiesen signifikant verringerte mRNA-Spiegel in Anwesenheit von Ethambutol und Tween40 auf. Mit stärkeren Schwankungen konnte für einen Teil diese Gene auch in Anwesenheit von Penicillin G eine reduzierte Expression verzeichnet werden. Während des Wachstums unter Biotin-Mangel blieb die Expression dieser Gene dagegen unverändert. Gruppe 1 wird von Genen ribosomaler Untereinheiten (*NCgl0488* und *NCgl0493*), des respiratorischen Energiestoffwechsels (*NCgl1159-1163*) sowie von Genen für Untereinheiten diverser Transportsysteme (*NCgl0697*, *NCgl1877*, *NCgl1915-1917*, *NCgl2663* und *NCgl2970*) dominiert. Gruppe 2 umfasst vier Gene, die hauptsächlich in Anwesenheit von Tween40 verringert exprimiert wurden. Hierzu zählen vor allem Gene, die für nicht weiter charakterisierte Proteine kodieren. Gene der Gruppe 3 wurden Tween40-spezifisch verstärkt exprimiert, während sie in Gegenwart von Ethambutol oder Penicillin leicht verringerte, unter Biotin-Mangel dagegen leicht erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen. In der vierten Gruppe sind 7 Gene zusammengefasst, die besonders in Anwesenheit von Ethambutol und Tween40 stark erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen. Unter Biotin-Mangel sowie in Anwesenheit von Penicillin G konnten für diese Gene nur sehr schwache Veränderungen der Expression festgestellt werden. *NCgl2518* kodiert für das Regulatorprotein PhoR eines Zwei-Komponenten-Systems, das durch Phosphat-Mangel aktiviert wird (Ishige *et al.*, 2003). *mepA* (*NCgl2411*), das für eine sekretierte Metalloendopeptidase kodiert und möglicherweise an der Restrukturierung des Peptidoglykans beteiligt ist, und *yggB* (*NCgl1221*), das für einen mechanosensitiven Kanal kodiert, zählen ebenfalls zu dieser Gruppe.

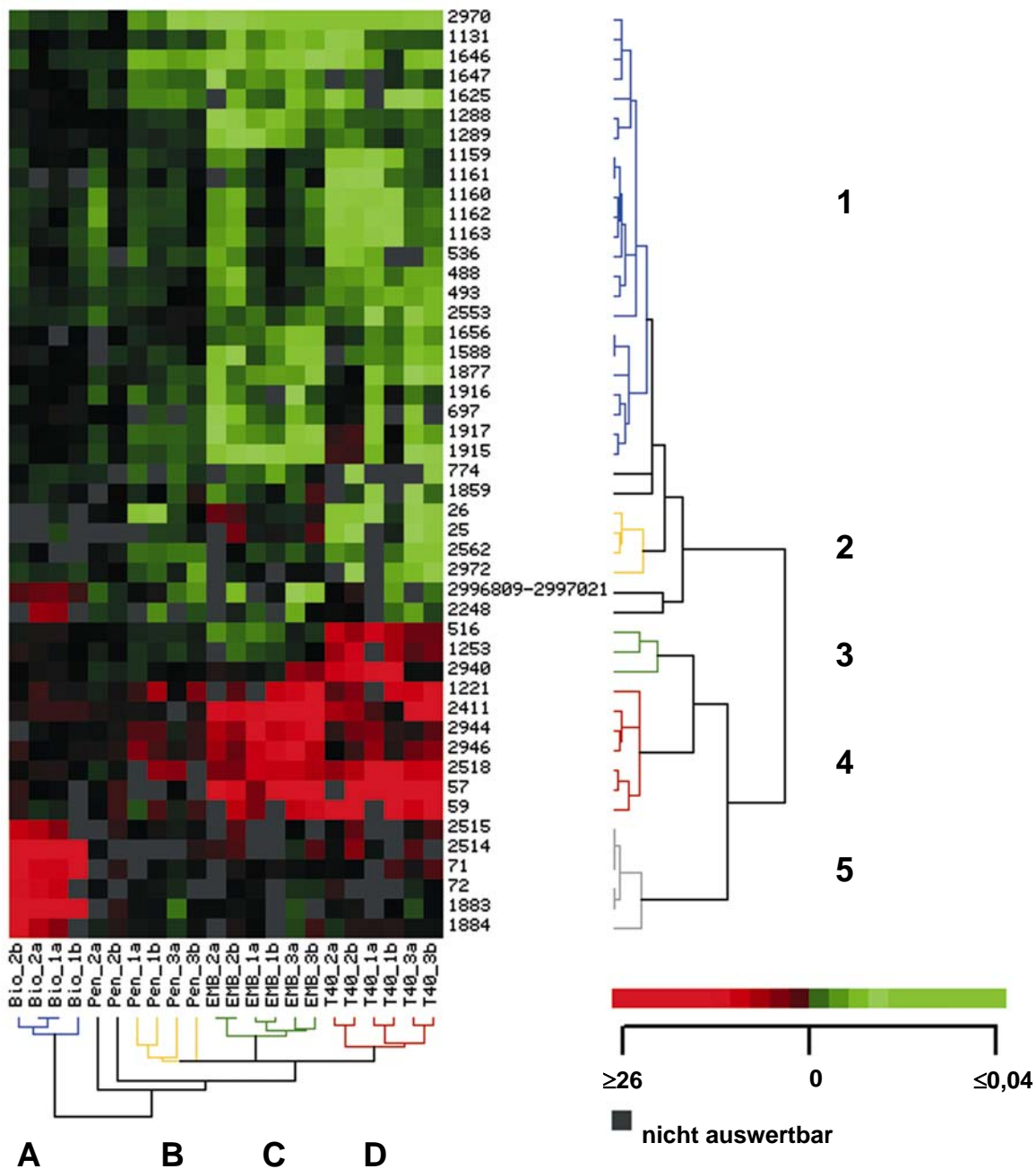


Abbildung 8: Vergleich der Genexpressionsmuster von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Stimulierung der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel, Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40 durch hierarchische Clusteranalyse.

Für Erläuterungen siehe auch Abbildung 7. Es wurden die Gene aus den Tabellen 4, 5, 7 und A5 (Anhang) berücksichtigt, soweit die mRNA-Spiegel in ≥ 11 von 22 Experimenten detektierbar waren.

Starke Expressionsänderungen konnten auch für zwei Gene eines putativen Operons (*NCgl0057* und *NCgl0059*) festgestellt werden, deren Funktion bisher unbekannt ist. *NCgl0059* weist Ähnlichkeiten zu *cofH* aus *Bacillus subtilis* auf, das an der Bildung der Sporenhülle beteiligt ist (Naclerio *et al.*, 1996; Zilhao *et al.*, 1999; Zilhao *et al.*, 2004). Denkbar wäre daher, dass das Gen *NCgl0059* in dem nicht-sporenbildenden Bakterium *C. glutamicum* an der Synthese oder Restrukturierung der Zellwand beteiligt ist. Die sich am deutlichsten

abhebende Gruppe 5 umfasst 6 Gene, die ausschließlich unter Biotin-Mangel exprimiert werden. Dazu gehört neben den in der Biotin-Synthese involvierten Genen *bioA* (NCgl2515) und *bioB* (NCgl0071) auch ein Gen, das für ein Membranprotein der BioY-Familie kodiert (NCgl1883) und am Transport von Biotin beteiligt sein könnte (Rodionov *et al.*, 2002). Drei weitere Gene, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu NCgl0071, NCgl1883 und NCgl2515 liegen, wiesen ebenfalls erhöhte mRNA-Spiegel auf und spielen möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Aufnahme von Biotin.

3. Charakterisierung der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung von *C. glutamicum* 2262

Einige *C. glutamicum*-Stämme produzieren L-Glutamat nach Induktion durch einen Temperaturschock. Da dem Medium keine teuren Zusätze wie zum Beispiel Antibiotika zugeführt werden müssen und geringere Kosten zur Kühlung der Fermenter anfallen, sind solche Stämme für die Aminosäureproduktion im industriellen Maßstab von großem Interesse. Der von Lapujade *et al.* (1998) beschriebene Stamm 2262 bildet nach Erhöhung der Fermentationstemperatur von 33 auf 39°C hohe L-Glutamat-Titer von bis zu 85 g/l im Medium. Uy *et al.* (2003) konnten nach kontinuierlicher Fermentation dieses Stammes eine Instabilität der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung feststellen und eine nicht-produzierende Mutante 2262-NP isolieren. Um die Temperatur-induzierte Glutamatausscheidung des Stammes *C. glutamicum* 2262 zu charakterisieren, sollten in dieser Arbeit kontinuierliche Fermentationen des Wildtyps 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP durchgeführt und die Transkriptome dieser beiden Stämme miteinander verglichen werden.

3.1 Kontinuierliche Fermentation von *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP

Zunächst wurden kontinuierliche Fermentationen mit dem Produzenten (*C. glutamicum* 2262) und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP durchgeführt und die Zellen 70 h nach Temperaturschock zur RNA-Extraktion und anschließenden Transkriptomanalyse geerntet.

Wie Abbildung 9A zeigt, war das Wachstum von *C. glutamicum* 2262 nach Umstellung von Batch-Modus auf kontinuierliche Fermentation mit einer Durchflussrate von 0,05 h⁻¹ und Erhöhung der Temperatur von 33 auf 39°C zunächst stark gehemmt und stabilisierte sich erst nach etwa 50 h Kultivierung bei einer OD₅₇₀ von maximal 9.

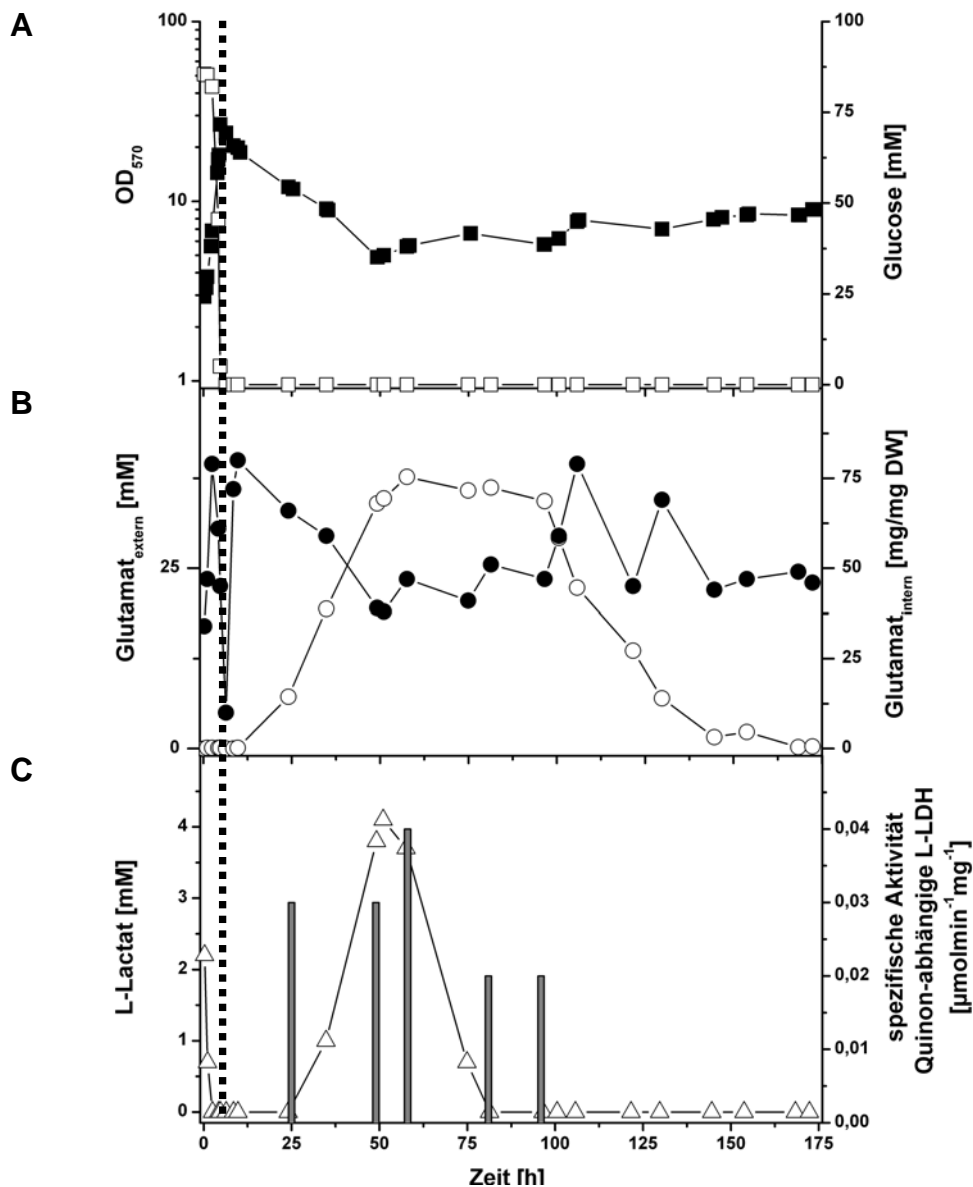


Abbildung 9: Kontinuierliche Fermentation von *C. glutamicum* 2262 im Chemostat bei 39°C und einer Durchflussrate von 0,05h⁻¹. Dargestellt sind (A) die OD₅₇₀ (■) und Glucose-Konzentration (□), (B) intrazelluläre (●) und extrazelluläre (○) Glutamatkonzentrationen sowie (C) die L-Lactat-Konzentration (△) in Überständen und spezifische Aktivitäten der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase (Säulen) in Rohextrakten. Die vertikale, gestrichelte Linie zeigt den Zeitpunkt der Glucose-Limitierung, von dem an mit modifiziertem MCGC-Medium supplementiert und gleichzeitig durch Erhöhung der Temperatur von 33°C auf 39°C ein Temperaturschock durchgeführt wurde.

Wie bereits durch Uy *et al.* (2003) beschrieben, begann die Akkumulation von L-Glutamat im Kulturmedium etwa 5 h nach Erhöhung der Temperatur und erreichte die höchsten Konzentrationen (> 30 mM) im Zeitintervall von 50 - 100 h (Abb. 9B). Die Bildung des Nebenproduktes L-Lactat nach Erhöhung der Temperatur konnte zwischen 35 und 75 h mit maximal 4,1 mM nachgewiesen werden (Abb. 9C). Die beobachtete Instabilität der Glutamat-ausscheidung könnte auf eine Anpassung der Bakterien an die hohe Temperatur oder die Selektion einer temperaturinsensitiven Mutante zurückgeführt werden.

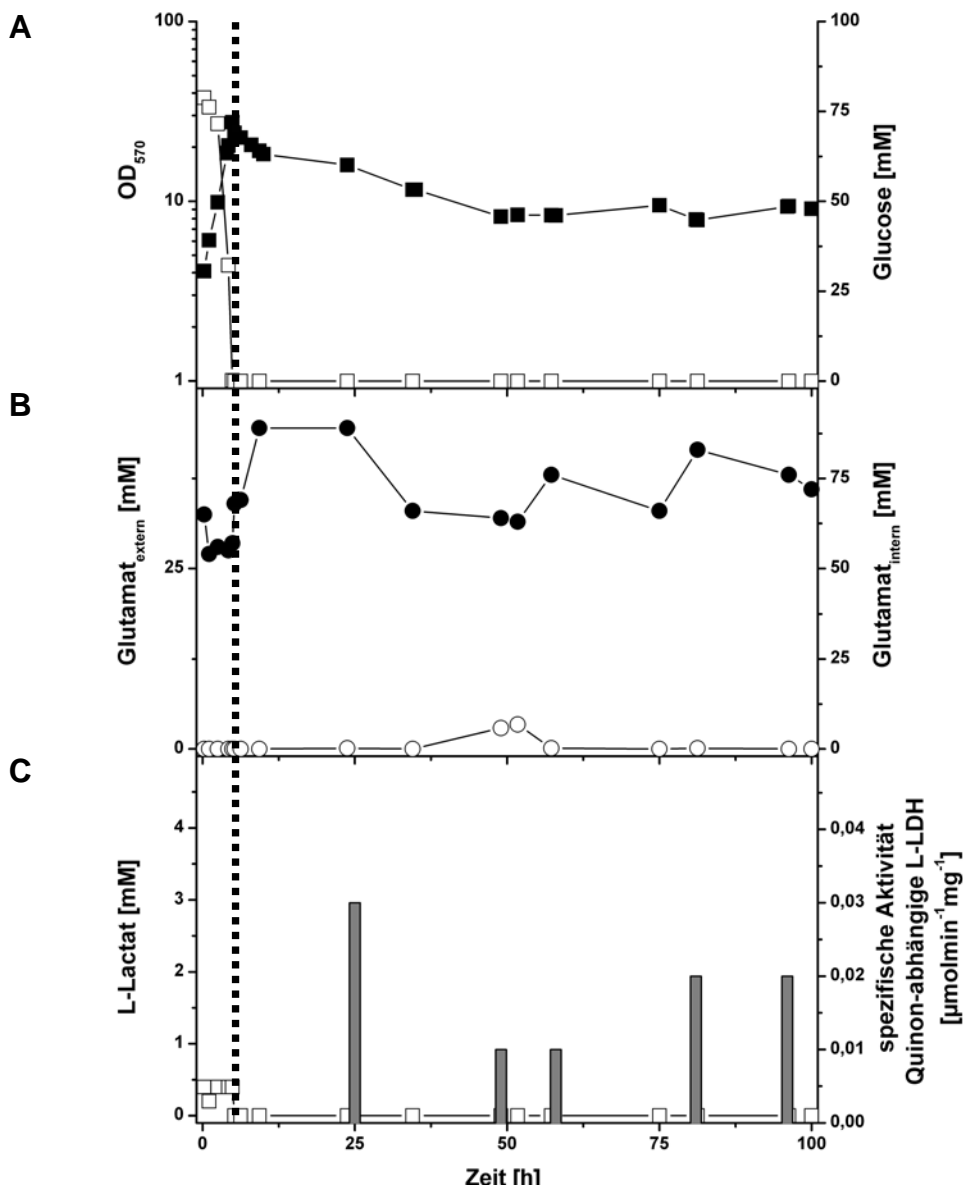


Abbildung 10: Kontinuierliche Fermentation der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP im Chemostat bei 39°C und einer Durchflussrate von $0,05\text{h}^{-1}$. Dargestellt sind (A) die OD_{570} (■) und Glucose-Konzentration (□), (B) intrazelluläre (●) und extrazelluläre (○) Glutamatkonzentrationen sowie (C) die L-Lactat-Konzentration (□) in Überständen und spezifische Aktivitäten der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase (Säulen) in Rohextrakten. Die vertikale, gestrichelte Linie zeigt den Zeitpunkt der Glucose-Limitierung, von dem an mit modifiziertem MCGC-Medium supplementiert und gleichzeitig durch Erhöhung der Temperatur von 33°C auf 39°C ein Temperaturschock durchgeführt wurde.

In einem zweiten Experiment wurde die von Uy *et al.* (2003) isolierte, nicht-produzierende Mutante 2262-NP zunächst in einer Batch-Kultur bei 33°C angezogen und dann analog zu *C. glutamicum* 2262 kontinuierlich kultiviert (Abb. 10B). Die auf den Temperaturschock folgende Hemmung des Wachstums fiel geringer als bei *C. glutamicum* 2262 aus und stabilisierte sich nach etwa 50 h, wobei eine OD_{570} von 9,5 erreicht wurde. Glutamat konnte nach 49 - 58 h in geringen Konzentrationen ($< 3,5$ mM) im Kulturüberstand detektiert werden

(Abb. 10B). L-Lactat hingegen wurde nur in der Phase vor dem Temperaturschock in geringen Konzentrationen ($< 0,4$ mM) nachgewiesen (Abb. 10C).

Weitere Unterschiede zwischen *C. glutamicum* 2262 und 2262-NP konnten durch Analyse der Zellgrößen mit Hilfe der Durchflusscytometrie beobachtet werden. Hierzu wurden während der Fermentation von *C. glutamicum* 2262 und *C. glutamicum* 2262-NP vor und nach Temperaturschock über einen Zeitraum von insgesamt 154 bzw. 100 h Proben entnommen und die Größe von jeweils etwa 10000 Zellen bestimmt.

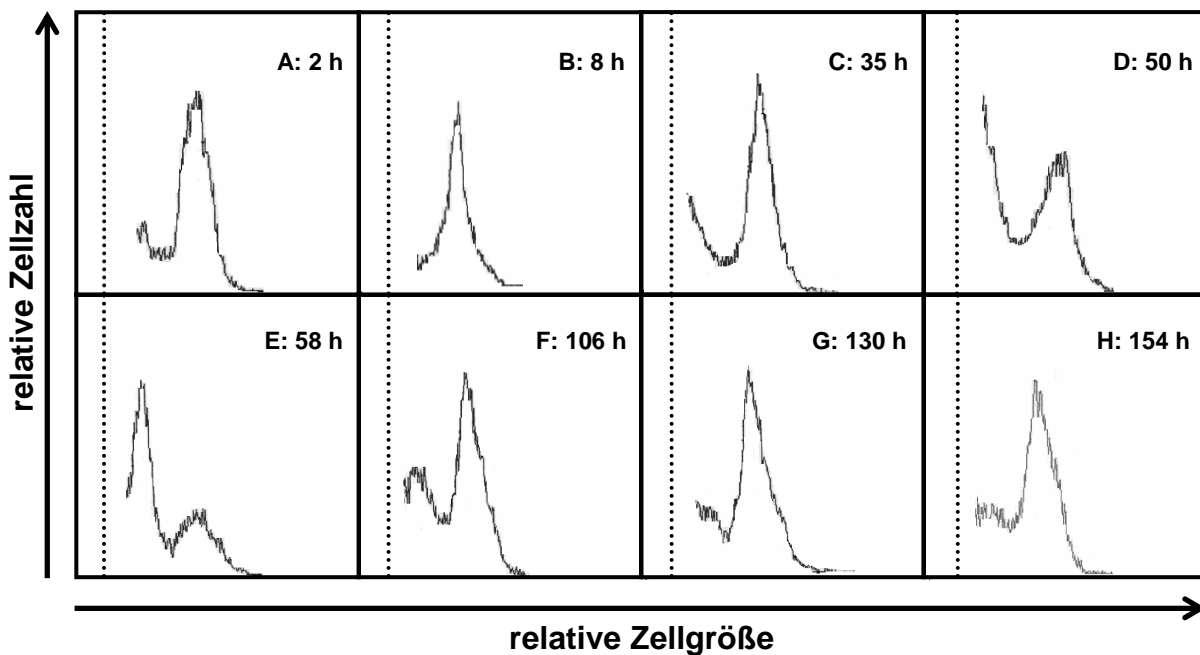


Abbildung 11: Relative Zellgröße des L-Glutamat-produzierenden Stammes *C. glutamicum* 2262 während der kontinuierlichen Fermentation vor (A) und nach Temperaturschock (B - H). In den Histogrammen ist die Zellzahl über dem Logarithmus der Streulichtintensität (als Maß der Zellgröße) aufgetragen. Zur Vergleich der relativen Zellgrößen dient die senkrechte, gestrichelte Linie.

Wie die Histogramme der Abbildung 11 zeigen, konnte für *C. glutamicum* 2262 nach Erhöhung der Temperatur von 33 auf 39°C zunächst eine deutliche Reduktion der Zellgröße (Abb. 11E) beobachtet werden. Nach 106 h Kultivierung nahm der Anteil größerer Zellen wieder zu. In genau diesem Zeitraum (58 und 106 h) akkumulierte *C. glutamicum* 2262 über 30 mM L-Glutamat im Kulturüberstand (Abb. 9B). Während des weiteren Verlaufs der Fermentation konnte eine Verschiebung zu größeren Zellen beobachtet werden, wobei die anfängliche Größe (Abb. 11A) wieder erreicht wurde (Abb. 11F - H).

Im Falle der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP (Abb. 11) war die Zellgröße unabhängig von der Kultivierungstemperatur stabil, was auf die erhöhte Temperaturinsensitivität der Mutante zurückgeführt werden könnte. Da nach 49 h parallel zwei Zellgrößen (Abb. 11D) auftraten und die *C. glutamicum* 2262-NP zu diesem Zeitpunkt etwa 3,5 mM L-Glutamat im

Kulturüberstand akkumulierte (Abb. 10B), wäre jedoch auch denkbar, dass die Zellgröße in Abhängigkeit davon variiert, ob L-Glutamat produziert wird oder nicht.

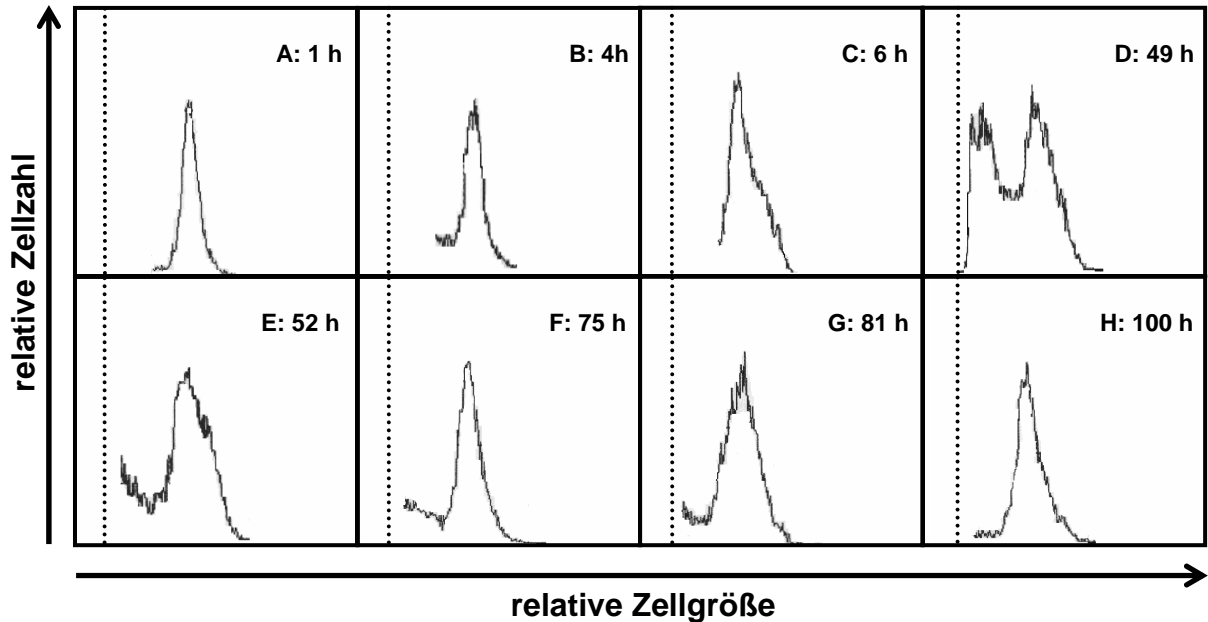


Abbildung 12: Relative Zellgröße der nicht-produzierenden Mutante 2262 während der kontinuierlichen Fermentation vor (A, B) und nach Temperaturschock (C - H). Zur näheren Erläuterung siehe Abbildung 11.

Die Varianz zwischen *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP beschränkt sich somit nicht nur auf die Bildung von L-Glutamat und L-Lactat, sondern äußert sich auch in einer unterschiedlichen Temperatur-abhängigen Zellgröße. Denkbar ist, dass alle beobachteten Unterschiede aufgrund der erhöhten Temperaturinsensitivität der Mutante 2262-NP auftreten.

3.2 Vergleichende Transkriptomanalyse des L-Glutamat-produzierenden Stammes *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP

Zur Transkriptomanalyse von *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP sollten DNA-Chips von *C. glutamicum* ATCC 13032 verwendet werden. Zu diesem Zwecke wurden in Anlehnung an Wendisch (2003) Genomvergleiche der Stämme *C. glutamicum* 2262 und *C. glutamicum* ATCC 13032 durchgeführt. Genomische DNA wurde aus beiden Stämmen isoliert und mit *EcoRV* geschnitten. Nach Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden wurden durch simultane Hybridisierung auf *C. glutamicum* ATCC 13032-DNA-Chips relative DNA-Spiegel (DNA-Konzentration in *C. glutamicum* 2262/DNA-Konzentration in *C. glutamicum* ATCC 13032) bestimmt.

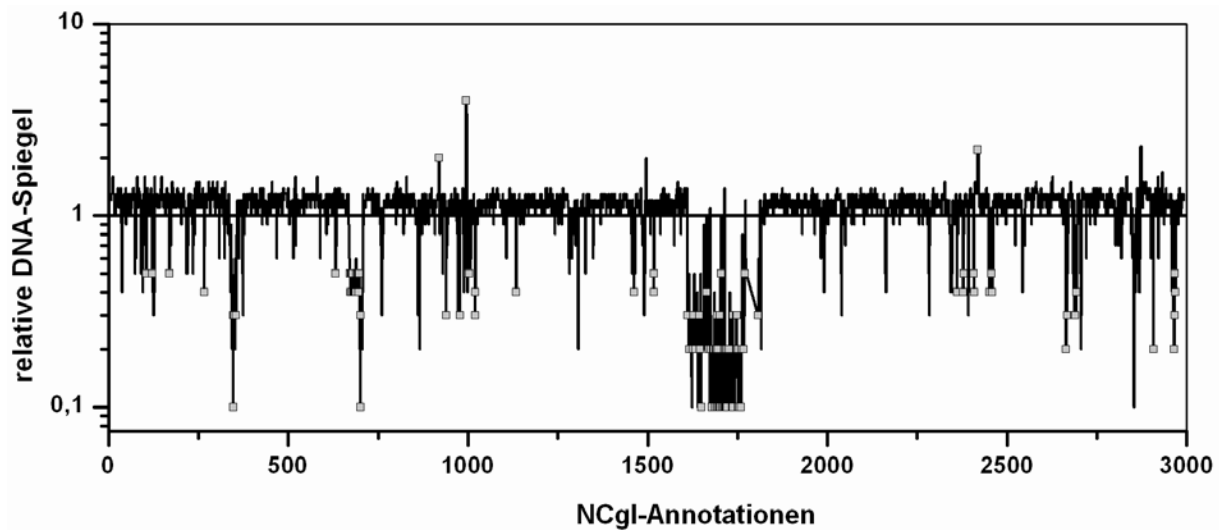


Abbildung 13: Vergleichende Genomanalyse der Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 2262. Aufgetragen sind die relativen DNA-Spiegel 2262/13032 gegen die NCgl-Annotationen des *C. glutamicum* ATCC 13032-Genoms. Hervorgehoben (□) sind Gene, die signifikant ($p < 0,05$) mindestens zweifach veränderte DNA-Spiegel aufwiesen.

Hybridisierungssignale konnten nicht nur mit genomischer DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 detektiert werden, sondern auch für mehr als 2000 Gene mit *C. glutamicum* 2262-DNA. Darüber hinaus verdeutlichte der Genomvergleich der beiden Stämme, dass es Gene gibt, die in 13032 vorhanden sind, in 2262 aber offensichtlich fehlen (Abb. 13). Die in Tabelle A7 (siehe Anhang) aufgeführten Gene sind allerdings nicht essentiell für die Glutamat-ausscheidung, da beide Stämme nach Induktion L-Glutamat im Medium akkumulieren. Dasselbe gilt für solche Gene, welche *C. glutamicum* 2262 zusätzlich aufweist, die aber nicht im Genom von *C. glutamicum* 13032 vorhanden sind. Der Genomvergleich der Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 2262 belegte somit, das Genom- und Transkriptomanalysen mit *C. glutamicum* 2262 unter Verwendung von *C. glutamicum* ATCC 13032 DNA-Chips durchgeführt werden können.

Um zwischen dem Produzenten *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP bestehende Unterschiede im Genexpressionsmuster zu identifizieren, wurden die Transkriptome beider Stämme miteinander verglichen. Hierzu wurden den kontinuierlichen Fermentationen nach 70 h Proben entnommen und relative mRNA-Verhältnisse durch Hybridisierung markierter cDNA-Sonden auf DNA-Chips bestimmt.

Nur zwei Gene wiesen ein signifikant (p -Wert $< 0,05$) mindestens dreifach erhöhtes mRNA-Verhältnis (*C. glutamicum* 2262/*C. glutamicum* 2262-NP) auf. Ihre benachbarte Lage auf dem Chromosom von *C. glutamicum* lässt eine Co-Transkription vermuten. *NCgl2816* kodiert für ein putatives Transportprotein und weist mit einem relativen mRNA-Spiegel von 11,1 die stärkste Expressionsveränderung auf, die in den Transkriptomanalysen von *C. glutamicum*

unter verschiedenen L-Glutamat-Exkretionsbedingungen für ein Transporter-Gen festgestellt werden konnte. Stromaufwärts dieses Gens liegt *NCgl2817*, welches für eine putative Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase kodiert. Da Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenasen an der Verwertung von L-Lactat beteiligt sind, könnten die Gene *NCgl2817* und *NCgl2816* folglich ein Operon der L-Lactat-Verwertung zur Aufnahme von L-Lactat und anschließenden Umwandlung in Pyruvat darstellen. Das weiter stromabwärts gelegene Gen *NCgl2819* zeigte eine zweifache Induktion (Tabelle A8 siehe Anhang). Möglicherweise ist dieses für einen putativen Transkriptionsregulator kodierende Gen an der Regulation des hypothetischen *NCgl2816-NCgl2817*-Operons beteiligt.

Tabelle 8: Vergleich der Genexpression von *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP nach Temperaturschock.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	2262 - P ⁴
			2262 - NP
NCgl2817	313	Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase (<i>lldD</i>)	9,2
NCgl2816	312	putatives Transportprotein	11,1

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4.

Wie von Uy *et al.* (2003) gezeigt, ist das Auftreten einer nicht-produzierenden Mutante während der kontinuierlichen Fermentation von *C. glutamicum* 2262 reproduzierbar. Möglicherweise korreliert die Mutation direkt mit dem Unvermögen der Mutante, L-Glutamat zu exkretieren. Aus diesem Grund wurde ein Genomvergleich zwischen zwei Proben von *C. glutamicum* 2262 durchgeführt, die 30 h (Glutamatausscheidung) und 167 h (Auftreten der nicht-produzierenden Mutante) nach Temperaturschock entnommen worden waren. Nach Isolierung und *EcoRV*-Verdau der genomischen DNA beider Proben wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden erstellt. Durch simultane Hybridisierung auf *C. glutamicum* ATCC 13032-DNA-Chips wurden anschließend relative DNA-Spiegel (DNA-Konzentration 30h/167h) bestimmt. Der Genomvergleich zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Proben. Allerdings ist die Auflösung der DNA-Chips beim Vergleich chromosomaler Unterschiede auf etwa 1 kb bzw. ein Gen beschränkt (Peters *et al.*, 2003), so dass beispielsweise kleinere Deletionen gar nicht erfasst werden können. Möglicherweise machen Punktmutationen die Unterschiede zwischen *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante aus.

Um die Ergebnisse der Transkriptomanalysen zu untermauern, wurde die spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase in Rohextrakten von *C. glutamicum* 2262 und 2262-NP ermittelt. Während die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP eine konstante spezifische Aktivität von 8 - 26 nmol·min⁻¹·mg⁻¹

zeigte (Abb. 10C), wies der produzierende Stamm *C. glutamicum* 2262 eine transiente Erhöhung der spezifischen Aktivität auf bis zu $44 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ auf (Abb. 9C). Interessanterweise ging die Erhöhung der L-Lactat-Konzentration dem Anstieg der spezifischen Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase zeitlich voraus (Abb. 9C).

Die erhöhte Expression von *NCgl2817* korrelierte demzufolge mit einer erhöhten spezifischen Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase. Diese Beobachtung sowie die Tatsache, dass aus thermodynamischen Gründen die Reaktion Quinon-abhängiger L-Lactat-Dehydrogenasen in Richtung der L-Lactat-Oxidation abläuft (Bott & Niebisch, 2003), lassen annehmen, dass das von *NCgl2817* kodierte Polypeptid an der Wiederverwertung von ausgeschiedenem L-Lactat beteiligt ist.

3.3 Konstruktion einer *NCgl2816*-Inaktivierungsmutante in *C. glutamicum* ATCC 13032

Um die Funktion des putativen Operons der L-Lactat-Verwertung zu untersuchen, wurde der Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt, da für diesen die gängigen molekularbiologischen Methoden etabliert sind und sein Genom bereits sequenziert vorliegt (Kalinowski *et al.*, 2003). Zunächst wurde eine *NCgl2816*-Inaktivierungsmutante von *C. glutamicum* ATCC 13032 erstellt und hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Verwertung von L-Lactat analysiert.

Die Mutante 13032::*NCgl2816* wuchs auf Pyruvat als einzige Kohlenstoffquelle wie der Wildtyp, war jedoch nicht in der Lage, L-Lactat zu verwerten. *C. glutamicum* ATCC 13032 dagegen wuchs auf L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ und erreichte eine OD_{600} von 7,3. Interessanterweise wuchsen auf D-Lactat beide Stämme gleich schlecht (μ_{max} 0,04 - 0,05) (Abb. 14). Auf einem Kohlenstoffgemisch aus 50 mM D-Glucose und 100 mM L-Lactat konnte die Inaktivierungsmutante 13032::*NCgl2816* wachsen, nutzte für die Bildung von Biomasse jedoch nur die Glucose. Während der Wildtyp beide Kohlenstoffquellen verwertete und in der stationären Phase eine OD_{600} von 14,5 erreichte, wuchs die Mutante deshalb lediglich bis zu einer OD_{600} von 4,8.

Da der Locus auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf eine Transkriptionsorganisation der Gene *NCgl2816* und *NCgl2817* in Form eines Operons schließen lässt, könnte die Inaktivierung von *NCgl2816* einen polaren Effekt auf die Expression der stromabwärts gelegenen Gens *NCgl2817* haben.

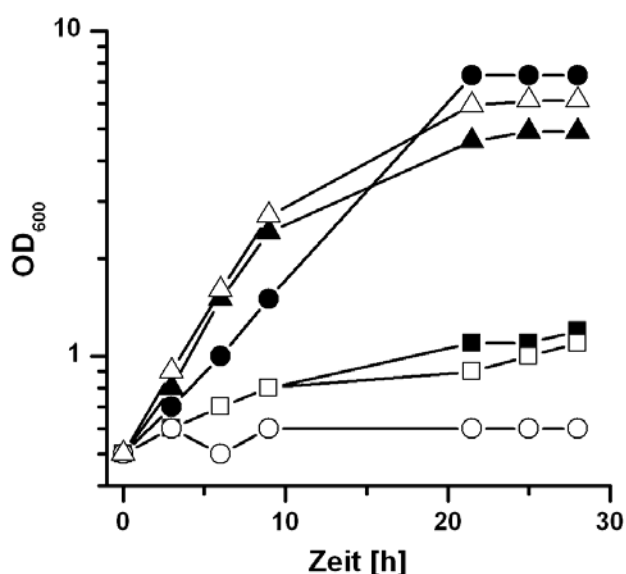


Abbildung 14: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (geschlossene Symbole) und der Mutante *C. glutamicum* ATCC 13032::NCgl2816 (offene Symbole) auf CGXII-Medium mit 100 mM Pyruvat (▲, △), 100 mM D-Lactat (■, □) oder 100 mM L-Lactat (●, ○).

Um zu überprüfen, ob dies der Fall ist, wurde die spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* ATCC 13032::NCgl2816 bestimmt. Für beide Stämme wurden auf Pyruvat, D-Lactat und Glucose basale Aktivitäten der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase gemessen (0,01 - 0,03 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (Tab. 9 - 10). Auf einem Gemisch aus 50 mM D-Glucose und 100 mM L-Lactat wies *C. glutamicum* 13032::NCgl2816 jedoch nicht die hohe spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase des Wildtyps von 0,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ auf, sondern erreichte lediglich eine spezifische Aktivität von 0,03 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tab. 9). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Inaktivierung des Gens *NCgl2816* tatsächlich einen polaren Effekt auf das stromabwärts gelegene Gen der putativen Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase ausübt.

Tabelle 9: Spezifische Aktivitäten der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* während des Wachstums auf 100 mM Pyruvat, 100 mM D-Lactat und einem Gemisch aus 50 mM D-Glucose und 100 mM L-Lactat.

Stamm	spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]		
	Pyruvat	D-Lactat	Glucose + L-Lactat
13032	0,02	0,02	0,23
13032::NCgl2816	0,02	0,01	0,03

3.4 Überexpression von *NCgl2817* in *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816*

Aufgrund der möglichen Organisation der Gene *NCgl2816* und *NCgl2817* in einem Operon stellt sich die Frage, ob die Funktion beider Gene für das Wachstum auf L-Lactat als einzige Kohlenstoffquelle essentiell ist oder ob nur *NCgl2817* erforderlich ist. Hierzu wurde getestet, ob eine Plasmid-kodierte Überexpression des Gens *NCgl2817* genügt, um das Wachstumsdefizit des Stammes *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816* auf L-Lactat zu komplementieren.

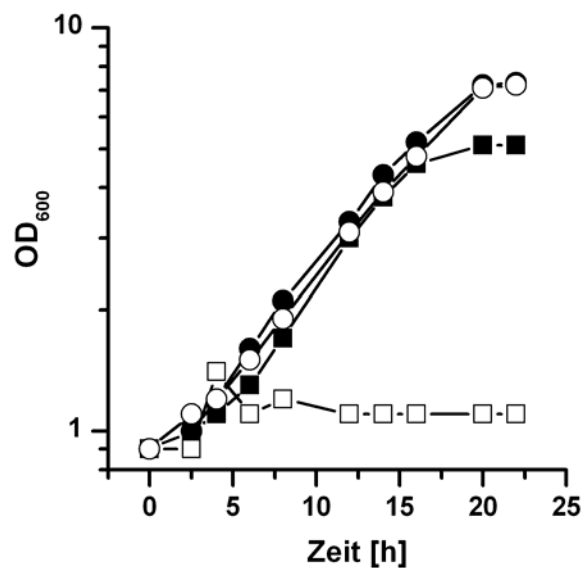


Abbildung 15: Wachstum von *C. glutamicum* 13032(pEKEEx3) (■), *C. glutamicum* 13032(pEKEEx3-*NCgl2817*) (●), *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816*(pEKEEx3) (□) und *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816*(pEKEEx3-*NCgl2817*) (○) auf 100 mM L-Lactat.

Während *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816* mit dem Leervektor pEKEEx3 nicht in der Lage war, auf L-Lactat als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen, wuchs *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816* (pEKEEx3-*NCgl2817*) auf L-Lactat und erreichte eine mit *C. glutamicum* 13032(pEKEEx3-*NCgl2817*) vergleichbare OD₆₀₀ (Abb. 15). Offensichtlich ist also nur die Funktion des Gens *NCgl2817*, welches für eine putative Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase kodiert, für das Wachstum von *C. glutamicum* auf L-Lactat als Kohlenstoffquelle essentiell. Um zu prüfen, ob *NCgl2817* tatsächlich für eine Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase kodiert, wurde die spezifische Aktivität dieses Enzyms nach Überexpression bestimmt. In *C. glutamicum* ATCC 13032 und 13032::*NCgl2816* erhöhte sich die spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase nach Überexpression von *NCgl2817* während des Wachstums auf Glucose um den Faktor 47 bzw. 29 (Tab. 10). Auf die spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen D-Lactat-Dehydrogenase hingegen hatte die Überexpression in beiden Stämmen keinen Einfluss (Tab. 10).

Die bisher gewonnenen Daten zeigen, dass *NCgl2817* tatsächlich das Gen ist, welches für die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase kodiert. Daher erfolgt eine Umbenennung von *NCgl2817* in *lldD*, wie bereits durch Bott und Niebisch (2003) vorgeschlagen worden war.

Tabelle 10: Spezifische Aktivitäten der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase und der Quinon-abhängigen D-Lactat-Dehydrogenase verschiedener *C. glutamicum*-Stämme während des Wachstums auf 100 mM D-Glucose und 100 mM L-Lactat.

Stamm	spezifische Aktivität [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]			
	L-Lactat-Dehydrogenase (Quinon-abhängig)		D-Lactat-Dehydrogenase (Quinon-abhängig)	
	D-Glucose	L-Lactat	D-Glucose	L-Lactat
13032	0,03	0,23	0,13	0,19
13032(pEKEx3)	0,03	0,20	0,11	0,25
13032(pEKEx3- <i>lldD</i>)	1,41	0,99	0,09	0,15
13032:: <i>NCgl2816</i>	0,02	# ^{a,b}	0,14	# ^{a,b}
13032:: <i>NCgl2816</i> (pEKEx3)	0,02	# ^{a,b}	0,17	# ^{a,b}
13032:: <i>NCgl2816</i> (pEKEx3- <i>lldD</i>)	0,58	0,63	0,09	0,15

^a# weist darauf hin, dass der Stamm auf L-Lactat kein Wachstum zeigte.

^bAuf einem Kohlenstoffgemisch aus 100 mM L-Lactat und 50 mM D-Glucose konnte für die Mutante *C. glutamicum* 13032::*NCgl2816* eine spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase von 0,03 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ gemessen werden, während der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 eine spezifische Aktivität von 0,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ aufwies. Die spezifischen Aktivitäten der Quinon-abhängigen D-Lactat-Dehydrogenase betragen jeweils 0,15 bzw. 0,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Um das Substrat-Spektrum und die Substrat-Affinität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* zu überprüfen, wurden Rohextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Überexpression der *lldD* und ein Kontrollstamm mit Leervektor auf die Reduktion von Quinon hin untersucht, wobei verschiedene Substrate getestet wurden (Tab. 11).

Tabelle 11: Spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen Lactat-Dehydrogenasen. Dargestellt sind die gemessenen spezifischen Aktivitäten von *C. glutamicum*-Stämmen während des Wachstums auf 50 mM D-Glucose oder 100 mM L-Lactat. Die Zugabe von Substrat erfolgte in folgenden Konzentrationen: 20 mM L-Lactat, 10 mM D-Lactat, 20 mM D/L-Malat.

Stamm / Kohlenstoffquelle	Substrat-abhängige Reduktion von Quinon [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]		
	L-Lactat	D-Lactat	D/L-Malat
13032(pEKEx3) / Glucose	0,03	0,11	0,00
13032(pEKEx3- <i>lldD</i>) / Glucose	1,41	0,09	0,00
13032(pEKEx3) / L-Lactat	0,20	0,25	0,01
13032(pEKEx3- <i>lldD</i>) / L-Lactat	0,99	0,15	0,00

Die Überexpression der *lldD* resultierte in einer Steigerung der L-Lactat-abhängigen Reduktion von Quinon, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Malat- und D-Lactat-abhängige

Quinon-Reduktion (Tab. 11). Somit konnte gezeigt werden, dass das von *lldD* kodierte Enzym spezifisch L-Lactat oxidiert. Die Kinetik der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* ATCC 13032(pEKEx3-*lldD*) entsprach bezüglich des Substrates L-Lactat einer Michaelis-Menten-Beziehung. Nach Lineweaver-Burk Auftragung ergab sich ein K_m -Wert von 0,5 mM, die maximale Geschwindigkeit betrug $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Abb. 16).

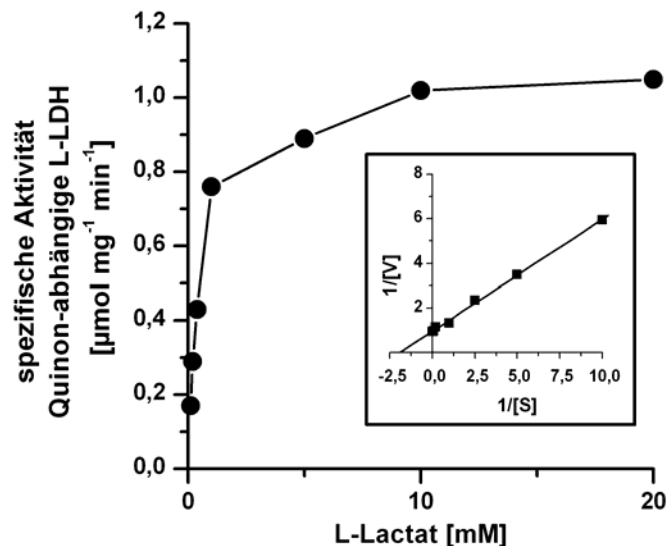


Abbildung 16: Spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (pEKEx3-*lldD*) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Im Kasten dargestellt die Auftragung nach Lineweaver-Burk.

Futai und Kimura (1977) konnten zeigen, dass die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase in *E. coli* in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle des Mediums induzierbar war, während die Quinon-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase konstitutiv gebildet wurde. Um zu prüfen, ob eine kohlenstoffabhängige Regulation der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* besteht, wurden Wachstumsexperimente mit verschiedenen Kohlenstoffquellen durchgeführt. Wie bereits beschrieben, konnten für die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase während des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf Pyruvat, D-Lactat oder Glucose nur basale spezifische Aktivitäten von maximal $0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ nachgewiesen werden, in Anwesenheit von L-Lactat war dagegen eine etwa 8-fach höhere spezifische Aktivität von $0,23 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ vorhanden. Die Menge aktiven Enzyms wurde somit durch die verstoffwechselte Kohlenstoffquelle reguliert. Der erhöhte mRNA-Spiegel von *NCgl2817* und die Steigerung der spezifischen Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase in dem L-Glutamat-produzierenden Stamm *C. glutamicum* 2262 lassen darauf schließen, dass die beobachtete Regulation entweder auf Ebene der RNA-Stabilität oder wahrscheinlicher noch über Transkriptionskontrolle erfolgt.

3.5 Vergleichende Transkriptomanalyse nach Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf L-Lactat und Pyruvat

Um zu überprüfen, ob die Regulation der *lldD*-kodierten Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase durch Transkriptionskontrolle erfolgt, wurden DNA-Chip-Analysen durchgeführt. Da *C. glutamicum* auf Pyruvat und L-Lactat ein ähnliches Wachstumsverhalten aufweist ($\mu_{\max/\text{Pyruvat}} 0,18 \text{ h}^{-1}$ und $\mu_{\max/\text{L-Lactat}} 0,15 \text{ h}^{-1}$ gegenüber $\mu_{\max/\text{Glucose}} 0,34 \text{ h}^{-1}$ und $\mu_{\max/\text{D-Lactat}} 0,04 \text{ h}^{-1}$), wurden die Transkriptome von *C. glutamicum* ATCC 13032-Kulturen verglichen, die entweder auf L-Lactat oder auf Pyruvat gewachsen waren. Zusätzlich diente dieses Experiment dem Nachweis, ob nur *NCgl2816* und *lldD* L-Lactat-spezifisch induziert werden, oder ob weitere Gene spezifisch für die Verwertung von L-Lactat als Kohlenstoffquelle sind.

Die DNA-Chip Analyse verdeutlichte, dass die mRNA-Spiegel von *NCgl2816* und *lldD* während des Wachstums auf L-Lactat im Vergleich zum Wachstum auf Pyruvat stark erhöht sind (Tab. 12). Darüber hinaus zeigten 41 weitere Gene signifikant ($p < 0,05$) mindestens dreifach erhöhte und 15 Gene signifikant reduzierte mRNA-Spiegel (Tab. 12). Die Verwertung von L-Lactat ist somit einerseits durch eine substratspezifische Induktion der Gene *NCgl2816* und *lldD*, andererseits durch zusätzliche, weniger starke Genexpressionsveränderungen geprägt. Gene mit erhöhter Expression während des Wachstums auf L-Lactat kodieren vor allem für hypothetische Proteine, putative Regulatorproteine, putative Transportproteine und putative sekretierte Proteine. Gene und Operons der Aufnahme und Verwertung von Eisen-Siderophoren (*NCgl0482*, *NCgl0639*, *NCgl0773-0774*) und Häm (*NCgl0377*), ebenso Gene für Regulatoren der AraC- und ArsR-Familien (*NCgl0430*, *NCgl0943*) zeigten drei- bis 10-fach erhöhte mRNA-Spiegel während des Wachstums auf L-Lactat im Vergleich zum Wachstum auf Pyruvat. Diese Gene sind Teil eines Stimulons des Eisenmangels (Krug *et al.*, 2005). Da im verwendeten Medium die Konzentration verwertbaren Eisens gering war, könnte unterschiedlich schnelles Wachstum zu Expressionsveränderungen der Eisen-Aufnahmesysteme führen. Es ist allerdings unklar, warum hier eine erhöhte Expression dieser Gene in der langsamer wachsenden Kultur beobachtet wurde, die entsprechend später unter Eisenmangel leiden sollte. Eine plausible Erklärung könnte die Abhängigkeit der Eisen-Löslichkeit vom pH-Wert des Mediums sein. Da während des Wachstums auf L-Lactat ein im Vergleich zu Pyruvat schnellerer Anstieg des pH-Wertes im Kulturüberstand beobachtet werden konnte und die Löslichkeit von Eisen mit der Basizität des Mediums abnimmt, könnte dies zu einer reduzierten Verfügbarkeit von Eisen geführt haben. Auffällig war weiterhin, dass die Expression von Genen des Cystein-Biosyntheseweges (*NCgl2715-2718*) und der Aufnahme alternativer Schwefelquellen (*NCgl1174*) drei- bis vierfach erhöht war.

Auf Pyruvat gewachsene Zellen wiesen dagegen eine deutlich erhöhte Expression eines Gens des *pta-ack*-Operons auf (*NCgl2657*), das für eine Phosphotransacetylase und eine Acetat-Kinase kodiert. Das für die Isocitrat-Lyase des Glyoxylat-Zyklus kodierende Gen *aceA* (*NCgl2248*), das für die Aconitase des Glyoxylat- und des Tricarbonsäure-Zyklus kodierende Gen *acn* (*NCgl1482*) und die Gene des *sdhCAB*-Operons (*NCgl0359-0361*), welches für die Succinat-Dehydrogenase des Tricarbonsäure-Zyklus kodiert, wiesen ebenfalls erhöhte mRNA-Spiegel auf. Diese Gene zählen zu dem Regulon des Acetat-Stoffwechsel-Regulators in *C. glutamicum*, RamB (Gerstmeir *et al.*, 2003). Die Expression des *leuCD*-Operons (*NCgl1262-1263*), das für beide Untereinheiten der 3-Isopropylmalat-Dehydratase kodiert, und Gene für putative Enzyme des Methylmalonyl-CoA-Metabolismus (*NCgl1471-1472*) war während des Wachstums auf Pyruvat fünffach höher als auf L-Lactat.

Tabelle 12: Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	L - Lactat ⁴ Pyruvat
(2470325-2470678)	3093	hypothetisches Protein	0,3
NCgl0359	830	Succinat-Dehydrogenase, Membrananker (<i>sdhC</i>)	0,2
NCgl0360	831	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein (<i>sdhA</i>)	0,2
NCgl0932	1545	putatives sekretiertes Protein (<i>porC</i>)	0,3
NCgl1170	1818	putative Methylmalonyl-CoA-Epimerase	0,2
NCgl1262	2737	3-Isopropylmalat-Dehydratase, große Untereinheit (<i>leuC</i>)	0,2
NCgl1263	2736	3-Isopropylmalat-Dehydratase, kleine Untereinheit (<i>leuD</i>)	0,2
NCgl1470	2409	putative Proteinkinase	0,2
NCgl1471	2410	Methylmalonyl-CoA-Mutase, große Untereinheit (<i>mcmB</i>)	0,3
NCgl1472	2411	Methylmalonyl-CoA-Mutase, kleine Untereinheit (<i>mcmA</i>)	0,2
NCgl1482	2425	Aconitase (<i>acn</i>)	0,3
NCgl1565	2534	hypothetisches Protein	0,3
NCgl2248	3092	Isocitrat-Lyase (<i>aceA</i>)	0,2
NCgl2319	3723 66055	Catechol-1,2-Dioxygenase	0,3
NCgl2657	122	Phosphotransacetylase (<i>pta</i>)	0,1
(1366244-1366474)	2754	hypothetisches Protein	3,6
(66382-66609)	440	hypothetisches Protein	3,3
NCgl0009	3303	putativer Transkriptionsregulator	5,9
NCgl0014	3308	hypothetisches Membranprotein	4,1
NCgl0062	438	putativer Chlorid-Kanal	4,0

Tabelle 12 (ff): Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	L - Lactat Pyruvat ⁴
NCgl0122	516 517	hypothetisches Protein	6,2
NCgl0123	518	hypothetisches Protein	7,6
NCgl0377	854	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein	5,2
NCgl0430	927	Transkriptionsregulator, ArsR-Familie	4,2
NCgl0482	3549	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase	4,2
NCgl0625	1154	O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase (<i>metY</i>)	3,2
NCgl0639	1173	putatives Eisen-reguliertes Lipoprotein	3,6
NCgl0773	1346	putatives Protein mit Siderophor-Interaktion	3,0
NCgl0774	1347	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	3,3
NCgl0943	1558	Transkriptionsregulator, AraC-Familie	10,1
NCgl1023	1646	Nikotinat-Nukleotid-Pyrophosphorylase (<i>nadC</i>)	3,0
NCgl1174	1822	aliphatisches Sulfonat-ABC-Transportsystem (<i>ssuC</i>)	3,0
NCgl1499	2450	Protein der Eisen-Cluster-Bildung	3,1
NCgl1501	2452	Multiple-Resistenz-Protein	3,4
NCgl1502	2453	hypothetisches Protein	4,0
NCgl1503	2455	hypothetisches Protein	3,8
NCgl1504	2456	putativer Transkriptionsregulator	3,6
NCgl1646	3347	putative sekretierte Hydrolase	7,0
NCgl1647	3348	putatives sekretiertes Protein	5,0
NCgl2027	2233	SAM-abhängige Methyltransferase	3,3
NCgl2350	2965 2966	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, ATPase	3,3
NCgl2351	2968	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	3,4
NCgl2352	2969	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	3,0
NCgl2353	2970	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	4,1
NCgl2450	2920	hypothetisches Protein	6,7
NCgl2451	2919	hypothetisches Protein	4,5
NCgl2713	193	putatives Transportprotein	5,4
NCgl2714	194	hypothetisches Protein	3,7
NCgl2715	195	Sulfat-Adenylyltransferase, große Untereinheit (<i>cysN</i>)	3,7
NCgl2717	197	Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reduktase (<i>cysH</i>)	3,8
NCgl2718	198 199	Sulfit-Reduktase (<i>cysI</i>)	3,4
NCgl2719	200	putative Ferredoxin/Ferredoxin-NADP-Reduktase	4,2
NCgl2816	312	putatives Transportprotein	17,9
NCgl2817	313	Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase (<i>lldD</i>)	17,4

Tabelle 12(ff): Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	L-Lactat / Pyruvat ⁴
NCgl2940	1933	hypothetisches Protein	3,7
NCgl2942	1935 1936	putative NADH-abhängige Flavin-Oxidoreduktase	3,6
NCgl2965	3452	putatives Transportprotein	4,6

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

3.6 Untersuchungen zur Transkription von *NCgl2816* und *lldD*

Durch den Transkriptomvergleich des L-Glutamat-Produzenten *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2262-NP sowie durch die vergleichende Transkriptomanalyse nach Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf L-Lactat und Pyruvat fiel auf, dass *NCgl2816* und *lldD* sehr ähnlich exprimiert wurden. Die benachbarte Lage beider Gene im Chromosom von *C. glutamicum* ATCC 13032 deutet auf eine transkriptionelle Organisation in Form eines Operons hin. Die transkriptionelle Organisation der Gene *NCgl2816* und *lldD* wurde mittels RT-PCR untersucht. Hierfür wurde Gesamt-RNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 zunächst durch reverse Transkription mit zwei verschiedenen Primern (*lldD_rev*, *NCgl2816int_proof_rev*) in cDNA umgeschrieben (cDNA-A und cDNA-B, Abb. 17). Die dabei erhaltenen cDNA-Produkte wurden nach Aufreinigung in PCR-Reaktionen eingesetzt (Nr. 1 - 6, Abb. 17).

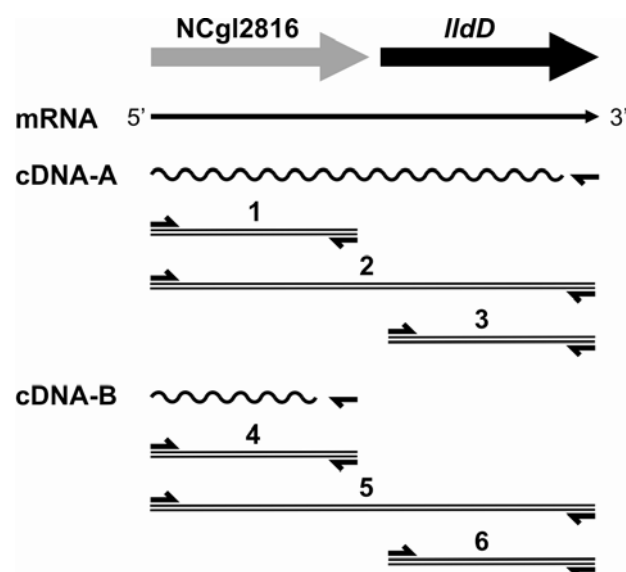


Abbildung 17: Schema zur Aufklärung der transkriptionellen Organisation der Gene *NCgl2816* und *lldD* mittels RT-PCR. Schematisch dargestellt sind die reverse Transkriptase-Reaktionen A und B sowie die daran anschließenden PCR-Reaktionen Nr. 1 - 6.

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 18). cDNA-A, deren Synthese am 3'-Ende von *lldD* startet, führte nicht nur zur Amplifikation eines *lldD*-Fragmentes (PCR Nr. 3), sondern auch eines *NCgl2816*-Fragmentes (PCR Nr. 1) sowie eines *NCgl2816-lldD*-Fragmentes (PCR Nr. 2). Als interne Kontrolle bei den reverse Transkriptase-Reaktionen wurde *dnaE*, das für eine Untereinheit der DNA-Polymerase kodiert, eingesetzt. Neben den Kontrollreaktionen Nr. 5 und 6, in denen ausgehend von einer nur *NCgl2816*-umfassenden cDNA wie erwartet kein *lldD*-Produkt erhalten wurde, wurden 6 weitere Kontrollreaktionen (Nr. 7 - 12, Abb. 18) durchgeführt. Diese waren zu den Ansätzen Nr. 1 - 6 identisch, enthielten jedoch in den anfänglichen RT-Reaktionen A und B keine reverse Transkriptase. Die Tatsache, dass in diesen Ansätzen keine PCR-Produkte erhalten wurden, zeigte, dass die eingesetzte RNA nicht durch chromosomale DNA verunreinigt war. Folglich konnte bewiesen werden, dass die Gene *NCgl2816* und *lldD* co-transkribiert werden.

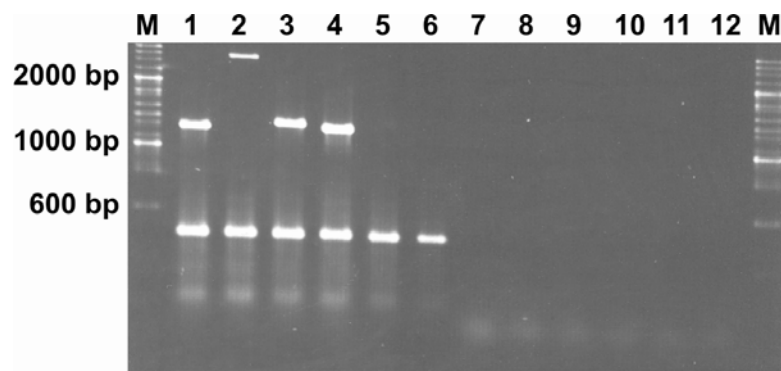


Abbildung 18: Ergebnis der RT-PCR-Analyse. Das kleinere Fragment, welches in den Spuren 1 - 6 sichtbar ist, repräsentiert *dnaE*-mRNA, die als Positivkontrolle in allen Reaktionen eingesetzt wurde. Das größere DNA-Fragment entspricht jeweils dem Produkt der PCR-Reaktionen 1 - 6 aus Abbildung 16. Die Spuren 7 - 12 zeigen Produkte von Reaktionen, die entsprechend den Reaktionen 1 - 6 durchgeführt wurden, jedoch keine reverse Transkriptase enthielten.

4. Untersuchungen zum Einfluss von Membranproteinen auf die Ausscheidung von L-Glutamat

4.1 Einfluss der Disruption von Genen, die während der Glutamatausscheidung differentiell exprimiert wurden

Ein Gros der in den DNA-Chip-Analysen differentiell verstärkt exprimierten Gene kodierte für Transporter und Membranproteine, deren Funktion bislang nicht geklärt ist. Um ihre Relevanz für die Produktion von L-Glutamat bzw. Funktion als mögliche L-Glutamat-Exporter zu überprüfen, sollten durch Inaktivierung oder Deletion rekombinante Stämme mit veränderter

Expression dieser Gene erstellt werden. Da die DNA-Chip-Analysen zeigten, dass kein allgemeines Genexpressionsmuster der Glutamatausscheidung existiert, welches unabhängig von der Art der Induktion existiert, wurden solche Gene ausgewählt, die in Anwesenheit wenigstens eines Stimulus signifikant ($p < 0,05$) zwei- oder mehrfach erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen und für die nach Analyse der Proteintopologie mit Hilfe des Programms TMPRED mindestens drei Transmembranhelices vorausgesagt wurden (Tab. 13). Zur Untersuchung der Funktion der in Tabelle 13 aufgeführten Gene wurden entweder *in-frame* Deletionen im Wildtyp mittels pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) oder aber Gendisruptionen durch Integration eines internen Fragmentes des jeweils zu unterbrechenden Wildtyp-Gens mittels pK18*mob* (Schäfer *et al.*, 1994) durchgeführt. Tabelle 13 verdeutlicht, dass die meisten der ausgewählten Gene nach Wachstum in Anwesenheit des Detergens Tween40 verstärkt exprimiert wurden. Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte daher zunächst nach Induktion mit Tween40.

Tabelle 13: Nach Induktion der Glutamatausscheidung diffentiell exprimierte Gene, für deren abgeleitete Aminosäuresequenz mindestens drei Transmembranhelices vorausgesagt wurden.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	TMHMM ⁴	B ⁵	E ⁵	P ⁵	S ⁵	T ⁵
NCgl0394	878	ABC-Transportsystem, Permease	10	---	+	---	---	---
NCgl0944	1559	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter-Superfamilie	7	---	---	---	---	+
NCgl0963	1583	Na ⁺ /Prolin-, Na ⁺ /Panthothenat-Symporter	10	+	---	---	---	---
NCgl0986	1605	fragwürdiger ORF	12	---	---	---	---	+
NCgl1174	1822	aliphatisches Sulphonat-ABC-Transportsystem (<i>ssuC</i>)	4-5	---	+	---	---	---
NCgl1221	2795	mechanosensitiver Ionen-Kanal (<i>yggB</i>)	3	---	+	---	---	+
NCgl1249	2756	konserviertes hypothetisches Protein	3	---	---	---	---	+
NCgl2032	2239	ABC-Transportsystem, Permease	8	---	(+) ⁶	---	---	(+) ⁶
NCgl2351	2968	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	7	---	---	---	---	(+) ⁶
NCgl2411	3507	sekretierte Metalloendopeptidase (<i>mepA</i>)	3	---	+	---	---	+
NCgl2713	193	putatives Transportprotein	7-8	---	---	---	---	+
NCgl2816	312	putatives Transportprotein	11	---	---	---	+	---
NCgl2839	341	Sporulationsprotein	6	---	---	---	---	+

¹Korrespondierende NCBI-Annotation (NC003450).

²Nummern der offenen Leserahmen (ORFs) der Biomax-Annotation (öffentlich nicht zugänglich).

³Ähnlichstes Gen aus öffentlichen Datenbanken oder beschriebenes *C. glutamicum*-Gen.

⁴TMHMM: TMPRED-Vorhersage der Zahl an Transmembranhelices mit Hilfe eines hidden Markov-Modells gemäß Krogh *et al.* (2001).

⁵Erhöhte Expression „+“ des jeweiligen Gens unter Biotin-Mangel (B), in Anwesenheit von Ethambutol (E), Penicillin G (P) und Tween40 (T) oder nach Temperaturschock (S).

⁶Von den beiden putativen Operons *NCgl2031-2033* und *NCgl2350-2353* wurde jeweils das Gen für die Permease-Untereinheit inaktiviert. Klammern symbolisieren, dass in den DNA-Chip-Experimenten nicht das inaktivierte Gen selbst, sondern andere Gene des Operons erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen.

Wachstumsexperimente unter nicht-induzierenden Kultivierungsbedingungen zeigten zunächst keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 bezüglich Wachstumsrate und gebildeter Biomasse. Die Ergebnisse (Tab. 14) verdeutlichen dagegen, dass drei Mutanten (13032::*NCgl0963*, 13032::*NCgl1221* und 13032::*NCgl2032*) nach Zugabe von Tween40 verringert L-Glutamat exkretierten und einer dieser Stämme (13032::*NCgl2032*) außerdem eine Sensitivität gegenüber Tween40 aufwies, die sich in einer reduzierten Bildung von Biomasse äußerte.

Tabelle 14: Charakterisierung rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme hinsichtlich Wachstum und Glutamatausscheidung in Anwesenheit von 2 g/l Tween40. Die Kultivierungen erfolgten in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Dargestellt sind gemittelte Werte der OD₆₀₀ und der Glutamatkonzentration im Überstand nach Kultivierungen von 50 h.

Klassifizierung nach Wachstum und Glutamatakkumulation	Stamm	ΔOD ₆₀₀	Glu _{max} [mM]
	13032	22	66
[1] Wachstum und Glutamatakkumulation unbeeinflusst	13032Δ <i>NCgl1249</i>	22	66
	13032Δ <i>NCgl2713</i>	19	62
	13032:: <i>NCgl0394</i>	17	68
	13032:: <i>NCgl0944</i>	20	61
	13032:: <i>NCgl0986</i>	21	70
	13032:: <i>NCgl1174</i>	17	63
	13032:: <i>NCgl2351</i>	24	59
	13032:: <i>NCgl2411</i>	23	71
	13032:: <i>NCgl2816</i>	21	69
	13032:: <i>NCgl2839</i>	23	72
[2] unverändertes Wachstum bei gleichzeitig reduzierter Glutamatakkumulation	13032:: <i>NCgl0963</i>	18	46
	13032:: <i>NCgl1221</i>	17	35
[3] Wachstum und Glutamatakkumulation reduziert	13032:: <i>NCgl2032</i>	12	28

Um zu überprüfen, wie sich die Mutanten gegenüber anderen Stimuli der Glutamatausscheidung verhalten, wurden zusätzliche Wachstumsexperimente in Anwesenheit von Ethambutol durchgeführt. Im Gegensatz zu den Resultaten nach Tween40-Zugabe fielen die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten in Gegenwart von Ethambutol wesentlich stärker aus (Tab. 15). Für drei Mutanten konnte nach Zugabe von Ethambutol eine drastisch reduzierte Ausscheidung von L-Glutamat festgestellt werden.

Die Inaktivierungsmutante des Gens *NCgl0944* fiel im Rahmen der Stamm-Charakterisierungen besonders durch ihre reduzierte Akkumulation von L-Glutamat im Kulturüberstand nach Induktion durch Ethambutol auf. *NCgl0944* kodiert für eine Permease der Uniporter-

Symporter-Antiporter-Superfamilie und weist Ähnlichkeiten zum Threonin-Exporter aus *C. glutamicum* (Simic *et al.*, 2002) auf. Es wäre somit denkbar, dass die von *NCgl0944* kodierte Permease am Export von L-Glutamat beteiligt ist. Wie jedoch der Vergleich der Tabellen 14 und 15 zeigt, verhielt sich diese Mutante überraschenderweise nach Zugabe von Tween40 wie der *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp, obwohl in den Transkriptomanalysen eine erhöhte Expression von *NCgl0944* in Anwesenheit von Tween40 festgestellt wurde.

Tabelle 15: Charakterisierung rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme hinsichtlich Wachstum und Glutamatausscheidung in Anwesenheit von 500 mg/l Ethambutol. Die Kultivierungen erfolgten in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Dargestellt sind gemittelte Werte der OD_{600} und der Glutamatkonzentration im Überstand nach Kultivierungen von 50 h.

Klassifizierung nach Wachstum und Glutamatakkumulation	Stamm	ΔOD_{600}	Glu _{max} [mM]
	13032	20	68
[1] Wachstum und Glutamatakkumulation unbeeinflusst	13032 Δ <i>NCgl1249</i>	19	61
	13032 Δ <i>NCgl2713</i>	20	55
	13032:: <i>NCgl1174</i>	23	56
	13032:: <i>NCgl2032</i>	27	63
	13032:: <i>NCgl2351</i>	35	60
	13032:: <i>NCgl2411</i>	21	69
	13032:: <i>NCgl2839</i>	19	62
[2] Wachstum reduziert bei nicht oder gering veränderter Glutamatakkumulation	13032:: <i>NCgl0963</i>	11	39
	13032:: <i>NCgl0986</i>	11	66
	13032:: <i>NCgl2816</i>	10	46
[3] Wachstum und Glutamatakkumulation reduziert	13032:: <i>NCgl0394</i>	5	17
	13032:: <i>NCgl0944</i>	8	6
	13032:: <i>NCgl1221</i>	7	8

Die reduzierte Glutamatakkumulation im Kulturüberstand nach Induktion durch Ethambutol könnte auf ein stark verringertes Wachstum von *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* infolge einer erhöhten Ethambutolsensitivität zurückgeführt werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die minimale Hemmkonzentration von Ethambutol im *C. glutamicum* 13032 Wildtyp und in der Inaktivierungsmutante 13032::*NCgl0944* mit Hilfe des *Etest*-Systems der Firma AB BIODISK (Solna, Schweden) ermittelt. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolgte nach Inkubation für 18 h bei 30°C und ergab einen Wert von 1,5 µg/ml für den Wildtyp und eine 50% geringere Konzentration für die Mutante. Folglich konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* in der Tat eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ethambutol aufweist. Möglicherweise kodiert *NCgl0944* nicht für einen L-Glutamat-Transporter,

sondern vielmehr für ein Antibiotika-Effluxsystem.

Zu der Inhibierung des Wachstums könnte unter Umständen auch eine Akkumulation der zellinternen Glutamatkonzentration aufgrund der limitierten Ausscheidung beitragen. Daher wurden interne wie auch externe Glutamatkonzentrationen des Wildtyps und der Mutante im Zeitraum von 20 - 28 h nach Induktion mit Ethambutol (Abb. 19) bestimmt.

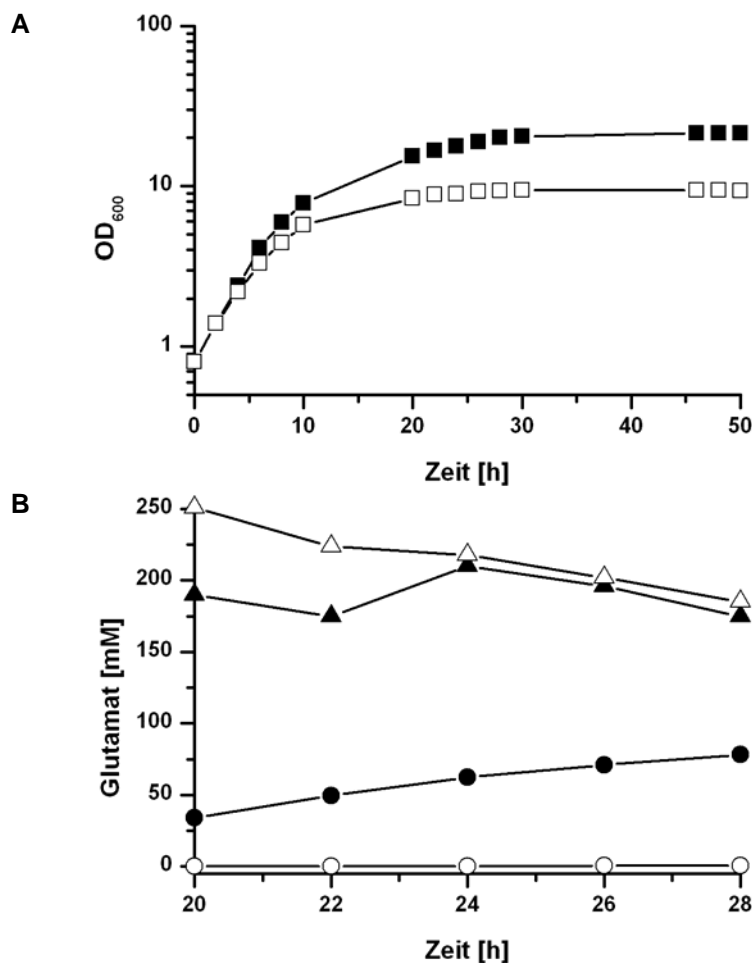


Abbildung 19: Wachstum von *C. glutamicum* 13032 (geschlossene Symbole) und *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* (offene Symbole) in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose und 500 mg/l Ethambutol. Dargestellt sind (A) die OD₆₀₀ (■, □) sowie (B) die interne (▲, △) und externe (●, ○) Glutamat-Konzentration.

Während der späten exponentiellen bis frühen stationären Phase schied der Wildtyp L-Glutamat mit einer maximalen Effluxrate von 28 nmol·min⁻¹·mgTG⁻¹ aus, während die Mutante kein L-Glutamat ausschied. In beiden Stämmen waren die internen Glutamatkonzentrationen aber vergleichbar hoch. Ein erhöhter zellinterner L-Glutamat-Pool kann folglich nicht für das reduzierte Wachstum der Ethambutol-induzierten Mutante verantwortlich sein. Ebenso kann der veränderte L-Glutamat-Efflux der Mutante nicht auf unterschiedliche interne Konzentrationen zurückgeführt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse zur Ethambutol- und Tween40-induzierten Glutamatausscheidung der *NCgl0944*-Inaktivierungsmutante wurden weitere Stimulanzen getestet (Tab. 16). In Übereinstimmung mit den Daten zur Induktion durch Ethambutol akkumulierte *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* auch in Anwesenheit von Penicillin G oder unter Biotin-Mangel nur maximal 6 mM L-Glutamat im Medium. Die Inaktivierung des Gens *NCgl0944* führte somit zu einem fast vollständigen Verlust der Fähigkeit, unter Biotin-Mangel oder nach Zugabe von Penicillin G oder Ethambutol L-Glutamat auszuschleiden, wohingegen die Induzierbarkeit der Ausscheidung durch Tween40 erhalten blieb. Die Tatsache, dass die Mutante *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* auch unter Biotin-Mangel deutlich weniger L-Glutamat ausscheidet als der Wildtyp und im Gegensatz zu Ethambutol eine reduzierte Sensitivität gegenüber Penicillin G aufweist, spricht gegen die Annahme eines Antibiotika-Effluxsystems.

Tabelle 16: Charakterisierung von *C. glutamicum*-Stämmen hinsichtlich Wachstum und Glutamatausscheidung in Anwesenheit von 750 U/l Penicillin G oder unter Biotin-Mangel (1 µg/l). Die Kultivierungen erfolgten in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Dargestellt sind die OD₆₀₀ sowie die Glutamatkonzentration im Überstand nach einer Kultivierung von 50 h.

Stimulans	Stamm	ΔOD ₆₀₀	Glu _{max} [mM]
[1] Penicillin G	13032	13	88
	13032:: <i>NCgl0944</i>	46	0
[2] Biotin-Mangel	13032	31	52
	13032:: <i>NCgl0944</i>	35	6

4.2 Einfluss der *NCgl2566*-Deletion auf die Ausscheidung von L-Glutamat

Im Rahmen der Charakterisierung des Genoms von *C. glutamicum* wurde durch Sequenzvergleiche mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul *et al.*, 1997) und der am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zur Verfügung stehenden Datenbank ein weiteres putatives Aminosäure-Exportsystem gefunden. *NCgl2566* kodiert für einen putativen Transporter in *C. glutamicum*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeit zu konservierten Domänen von Proteinen der LysE-Familie aufweist. Zusätzlich besteht eine Sequenzähnlichkeit des putativen Aminosäure-Exporters *NCgl2566* zur RhtB-Familie. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion des Gens *NCgl2566* in einer reduzierten Glutamatausscheidung sowohl nach Induktion durch Tween40 als auch durch Ethambutol resultiert (Fellmann, 2005). Zur weitergehenden Charakterisierung des Gens *NCgl2566* wurden Wachstumsexperimente mit drei unabhängigen Klonen *C. glutamicum* 13032Δ*NCgl2566*_{III} und dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 durchgeführt. Die Induktion der Ausscheidung von L-Glutamat erfolgte durch Biotin-Mangel und nach Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40.

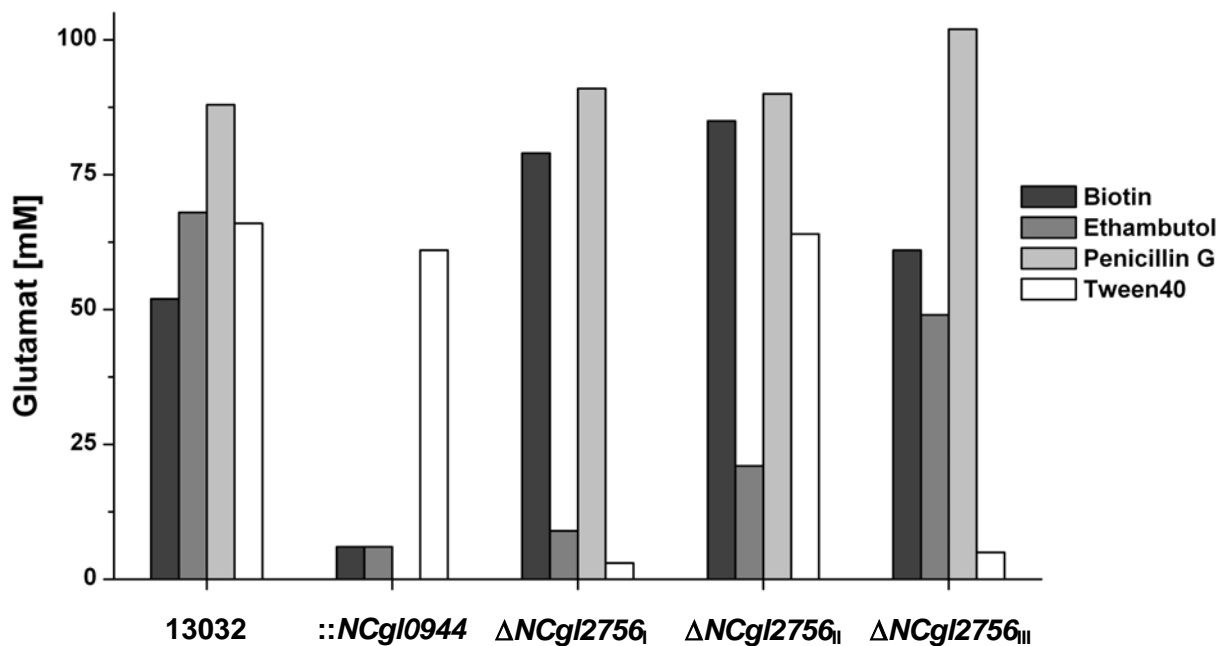


Abbildung 20: Vergleich der Glutamatkonzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum*-Stämmen nach Kultivierung von 50 h in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Die Ausscheidung von L-Glutamat wurde durch Biotin-Mangel (1 µg/l) oder Zugabe von 500 mg/l Ethambutol, 750 U/l Penicillin G bzw. 2 g/l Tween40 induziert.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, verhielten sich die drei untersuchten Klone der Deletionsmutante sehr unterschiedlich. Nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel oder Zugabe von Penicillin akkumulierten alle drei Klone vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp L-Glutamat im Kulturüberstand. Die Ethambutol-induzierte Glutamatausscheidung war allerdings nur in den Klonen 1 und 2 deutlich verringert. Dagegen schieden die Klone 1 und 3 nach Zugabe von Tween40 weniger L-Glutamat aus als der Wildtyp. Durch Wiederholung der von M. Fellmann durchgeführten Stamm-Validierungen mittels PCR-Analysen (Fellmann, 2005) konnte die Deletion des Gens *NCgl2566* in allen drei Klonen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind die Unterschiede zwischen den Deletionsklonen auf Transpositionereignisse zurückzuführen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse einer vergleichenden Genomanalyse zwischen dem *C. glutamicum* 13032 Wildtyp und einer Deletionsmutante des putativen *NCgl2566*-Regulator-Gens (*NCgl2567*) mit Hilfe von DNA-Chips bekräftigt, da gezeigt werden konnte, dass es infolge der Deletion zu einem Transpositionereignis gekommen war (verminderter relativer DNA-Spiegel des Gens *NCgl0993*) (Fellmann, 2005).

Abbildung 20 weist auf ein komplementäres Efflux-Verhalten der Stämme *C. glutamicum* 13032Δ*NCgl2566*_{III} und *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* hin. In 13032::*NCgl0944* war die L-Glutamat-Akkumulation im Kulturüberstand unter Biotin-Mangel oder nach Zugabe von Ethambutol oder Penicillin signifikant reduziert und nur noch durch Tween40 stark induzierbar.

Die Deletionsmutante 13032 Δ *NCgl2566*_{III} verhielt sich komplementär dazu. Der Hypothese folgend, dass mehrere L-Glutamat-Exportsysteme koexistieren, könnten die Ergebnisse auf zwei Exporter deuten, von denen der eine Tween40-spezifisch aktiviert wird, während der andere in Abhängigkeit von Biotin-Mangel oder Zugabe von Ethambutol oder Penicillin aktiv ist.

Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika der Klone *C. glutamicum* 13032 Δ *NCgl2566*_{III} ist es fraglich, ob die Reduktion der Tween40-induzierten Glutamatausscheidung des Klons 13032 Δ *NCgl2566*_{III} tatsächlich auf die Disruption des Gens *NCgl2566* zurückgeführt werden kann oder nicht viel wahrscheinlicher das Resultat genomischer Rearrangements war. Auch im Falle der Inaktivierungsmutante *C. glutamicum* 13032::*NCgl0944* kann nicht ausgeschlossen werden, dass Transpositionereignisse oder ein polarer Effekt der Gendisruption für die verringerte Glutamatausscheidung verantwortlich sind. Komplementation der Mutanten 13032 Δ *NCgl2566* und 13032::*NCgl0944* mit *NCgl2566* bzw. mit *NCgl0944* könnte zur Klärung dieser Fragen beitragen und im Falle einer vollständigen Wiederherstellung der Ausscheidung einen direkten Bezug zwischen dem jeweiligen Gen und der Exkretion von L-Glutamat erstellen.

4.3 Vergleichende Genomanalysen der Stämme *C. diphtheriae*, *C. efficiens* und *C. glutamicum*

Die Genome der drei *Corynebacterium*-Spezies *C. diphtheriae*, *C. efficiens* und *C. glutamicum* sind inzwischen sequenziert worden (Cerdano-Tarraga *et al.*, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003; Nishio *et al.*, 2003) und stehen in öffentlich zugänglichen Datenbanken zur Verfügung. *C. efficiens* ist nahe verwandt mit *C. glutamicum* und *C. callunae*, und zählt wie diese Spezies zu den L-Glutamat-produzierenden coryneformen Bakterien (Fudou *et al.*, 2002). Das Genom von *C. diphtheriae* wurde aufgrund seiner großen medizinischen Bedeutung als Erreger der Diphtherie sequenziert. Doch trotz seines hohen Verwandtschaftsgrades zu *C. glutamicum* und *C. efficiens* ist *C. diphtheriae* nicht als Aminosäureproduzent bekannt. Der Vergleich der kompletten Genomsequenzen ermöglicht einen Einblick in die Unterschiede zwischen diesen Stämmen und könnte das Verständnis der Glutamatausscheidung vertiefen.

Es war deshalb das Ziel, gemeinsame Gene von *C. glutamicum* und *C. efficiens* zu identifizieren, die in *C. diphtheriae* nicht vorkommen. Im Anschluss an einen Vergleich der sequenzierten Genome von *C. glutamicum*, *C. efficiens*, und *C. diphtheriae* mit Hilfe von BLAST (Altschul *et al.*, 1997) sollten deshalb jene Gene selektiert werden, für deren abgeleitete Aminosäuresequenzen die Voraussagen der Proteintopologie (ERGO) mindestens drei Transmembranhelices vorschlugen und die mehr als 30% Übereinstimmung zwischen den beiden Glutamatproduzenten *C. glutamicum* und *C. efficiens* und jeweils höchstens 30 %

Übereinstimmung der Produzenten zum Nichtproduzenten *C. diphtheriae* aufwiesen.

Nach Überprüfung von 3117 RCGL-Annotationen des *C. glutamicum*-Genoms konnten 616 ORFs identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen mindestens drei Transmembranhelices aufwiesen, wobei 242 RCGL-ORFs keine und weitere 40 höchstens 30% Übereinstimmung in *C. diphtheriae* fanden. Somit kodiert das Genom von *C. glutamicum* für 282 Proteine mit mindestens drei Transmembranhelices, die anscheinend nicht in *C. diphtheriae* vorkommen. Von diesen 282 RCGL-Annotationen zeigten 154 mehr als 30% Übereinstimmung zu RCEF-ORFs des Genoms von *C. efficiens* mit ebenfalls mindestens drei Transmembranhelices. Folglich kodieren die Genome der Glutamatproduzenten *C. glutamicum* und *C. efficiens* für 154 putative Membranproteine, über die *C. diphtheriae* nicht verfügt. 96 dieser ORFs waren bereits funktionell charakterisiert oder konnten mindestens funktionell eindeutig zugeordnet werden. 68 ORFs waren entweder unbekannter Funktion oder wiesen aufgrund unterschiedlicher Annotationen in den öffentlichen Datenbanken keine eindeutige Zuordnung auf. Darüber hinaus wurden nicht alle 68 ORFs putativer Membranproteine durch die von Winnen *et al.* (2005) durchgeführten genomischen Analysen von *C. glutamicum* und *C. efficiens* als Transporterproteine identifiziert.

Tabelle 17: Zielgene zur Konstruktion von Inaktivierungsmutanten. Dargestellt sind Gene von *C. glutamicum*, die für Membranproteine kodieren und über 30% Übereinstimmung zu *C. efficiens* und höchstens 30% Übereinstimmung zu *C. diphtheriae* aufweisen.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	TMHMM ⁴	höchster BLAST-Treffer ⁵	
				<i>C. efficiens</i> [%]	<i>C. diphtheriae</i> [%]
NCgl0007	3301	nicht charakterisiertes Membranprotein	5	52	0
NCgl0559	1124	Permease, MMPL-Familie	11	67	23
NCgl0816	1401	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter -Superfamilie	12	68	0
NCgl0821	1406	putatives ABC-Transportsystem, Permease	11	32	0
NCgl1026	1649	hypothetisches Membranprotein	10	68	0
NCgl1978	2170	putatives ABC-Transportsystem, Permease	6	56	0
NCgl2232	3112	Permease	8	74	0
NCgl2303	3707	putativer Transporter	9	70	0
NCgl2348	2962	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter -Superfamilie	8	49	0
NCgl2524	2824	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter -Superfamilie	11	66	0
NCgl2828	329	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter -Superfamilie	11	66	0

¹Korrespondierende NCBI-Annotation (NC003450).

²Nummern der offenen Leserahmen (ORFs) der Biomax-Annotation (öffentlich nicht zugänglich).

³Ähnlichstes Gen aus öffentlichen Datenbanken oder beschriebenes *C. glutamicum*-Gen.

⁴TMHMM: Vorhersage der Zahl an Transmembranhelices mit Hilfe eines hidden Markov-Modells gemäß Krogh *et al.* (2001)

⁵Die Datenbankvergleiche zur Suche nach ähnlichen Sequenzen erfolgten mit Hilfe von BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Um die Relevanz der nicht näher charakterisierten ORFs für die Glutamatausscheidung bzw. Funktion als mögliche Glutamat-Exporter zu überprüfen, sollten rekombinante Stämme mit veränderter Expression einiger Gene erstellt werden (Tab. 17). Wachstumsexperimente unter nicht-induzierenden Kultivierungsbedingungen zeigten zunächst keine deutlichen Unterschiede zwischen den Inaktivierungsmutanten und dem Wildtyp bezüglich Wachstumsrate und gebildeter Biomasse (Daten nicht gezeigt). Die Gene sind daher als nicht-essentiell anzusehen.

Das Wachstum der Inaktivierungsmutanten und ihr L-Glutamat-Exkretionsverhalten wurden anschließend in Abhängigkeit von Ethambutol (Tab. 18) und Tween40 (Tab. 19) überprüft. Wie aus Tabelle 18 zu ersehen ist, wuchsen 6 von 11 Mutanten in Anwesenheit von Ethambutol deutlich schlechter als der Wildtyp, wobei eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ethambutol durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen mit Hilfe von *Etests* nicht festgestellt werden konnte. Da diese Mutanten auch gegenüber den Antibiotika Penicillin, Rifampicin und Vancomycin in *Etest*-Analysen keine veränderte Sensitivität zeigten, kodieren die jeweiligen Gene vermutlich nicht für Antibiotika-Transportsysteme. Dieselben Mutanten sowie ein weiterer Stamm zeigten auch nach Zugabe von Tween40 ein im Vergleich zum Wildtyp schlechteres Wachstum. Die Glutamatausscheidung war bei den meisten Inaktivierungsmutanten maximal um 50% verringert. Keine der überprüften Mutanten wies somit eine mit den Stämmen 13032::NCgl0944 und 13032 Δ NCgl2566 vergleichbare, reduzierte Akkumulation von L-Glutamat auf.

Tabelle 18: Charakterisierung rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme hinsichtlich Wachstum und Glutamatausscheidung in Anwesenheit von 500 mg/l Ethambutol. Die Kultivierungen erfolgten in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Dargestellt sind die OD₆₀₀ sowie die Glutamatkonzentration im Überstand nach einer Kultivierung von 50 h.

Klassifizierung nach Wachstum und Glutamatakkumulation	Stamm	Δ OD ₆₀₀	Glu _{max} [mM]
	Wildtyp 13032	20	68
[1] Wachstum und Glutamatakkumulation unbeeinflusst	13032::NCgl1026	22	73
	13032::NCgl1978	23	72
[2] Wachstum und Glutamatakkumulation erhöht	13032::NCgl0007	25	81
	13032::NCgl0816	25	85
	13032::NCgl2828	25	77
[3] Wachstum und Glutamatakkumulation reduziert	13032::NCgl0559	13	46
	13032::NCgl0821	10	36
	13032::NCgl2232	12	39
	13032::NCgl2303	11	31
	13032::NCgl2348	9	30
	13032::NCgl2524	11	44

Interessanterweise war aber bei drei Mutanten die Akkumulation von L-Glutamat im Medium nach Zugabe von Ethambutol deutlich höher als beim Wildtyp, während zwei weitere Mutanten in Anwesenheit von Tween40 vermehrt L-Glutamat ausschieden. Die stärksten Veränderungen konnten bei *C. glutamicum* 13032::*NCgl0821* nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Tween40 beobachtet werden. Aufgrund des verminderten Wachstums dieser Mutante betrug die Ausbeute pro Biomasse $Y_{P/X}$ 27 mM L-Glutamat / g TG gegenüber 12 mM L-Glutamat / g TG beim Wildtyp. *NCgl0821* weist Homologie zu *ftsX* aus *E. coli* auf, das für die Permease eines FtsEX-ABC-Transporters kodiert, der am Transport von Komponenten der Zellteilung beteiligt ist (Schmidt *et al.*, 2004). Da der Glutamatausscheidung immer Veränderungen der Plasmamembran und/oder der Zellwand vorausgehen, wäre es möglich, dass die Inaktivierung von *NCgl0821* Veränderungen der Zellwandtopologie verursacht, die wiederum die Aktivität des L-Glutamat-Exporters beeinflussen. Die im Vergleich zum Wildtyp unverändert Ausbeute nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Ethambutol könnte auf eine verringerte Stresskompensierung zurückgeführt werden, da die Transkriptomanalysen dieser Arbeit zeigten, dass das Gen für die zweite Untereinheit des FtsEX-ABC-Transporters, *ftsE*, in Anwesenheit von Ethambutol verstärkt exprimiert wurde und das FtsEX-Transportsystem in *C. glutamicum* möglicherweise wie in *E. coli* an der Stressantwort beteiligt ist (O'Reilly & Kreuzer, 2004).

Tabelle 19: Charakterisierung rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme hinsichtlich Wachstum und Glutamatausscheidung in Anwesenheit von 2 g/l Tween40. Die Kultivierungen erfolgten in CGXII-Medium mit 5% (w/v) Glucose. Dargestellt sind die OD_{600} sowie die Glutamatkonzentration im Überstand nach einer Kultivierung von 50 h.

Klassifizierung nach Wachstum und Glutamatakkumulation	Stamm	ΔOD_{600}	Glu _{max} [mM]
	Wildtyp 13032	22	66
[1] Wachstum und Glutamatakkumulation unbeeinflusst	13032:: <i>NCgl0816</i>	20	68
[2] unverändertes Wachstum bei gleichzeitig reduzierter Glutamatakkumulation	13032:: <i>NCgl2828</i>	20	34
[3] Wachstum reduziert bei unveränderter Glutamatakkumulation	13032:: <i>NCgl0007</i>	17	71
	13032:: <i>NCgl0559</i>	13	68
	13032:: <i>NCgl2232</i>	13	59
	13032:: <i>NCgl2303</i>	12	65
	13032:: <i>NCgl2348</i>	13	71
[4] Wachstum reduziert bei gleichzeitig erhöhter Glutamatakkumulation	13032:: <i>NCgl0821</i>	13	88
	13032:: <i>NCgl1026</i>	18	92
[5] Wachstum und Glutamatakkumulation reduziert	13032:: <i>NCgl1978</i>	14	44
	13032:: <i>NCgl2524</i>	12	50

5. Untersuchungen zum Einfluss der Osmolalität des Mediums auf die Glutamatausscheidung von *C. glutamicum*

Die DNA-Chip-Experimente mit *C. glutamicum* ATCC 13032 in An- und Abwesenheit verschiedener Stimuli verdeutlichten, dass kein Genexpressionsmuster der Glutamatausscheidung existiert, welches unabhängig von der Art der Induktion auftritt. Größere Übereinstimmungen konnten allerdings für Ethambutol und Tween40 festgestellt werden. So wurde das Gen *yggB* (*NCgl1221*), das für einen mechanosensitiven Kanal kodiert, sowohl in Anwesenheit von Ethambutol als auch von Tween40 verstärkt exprimiert. Mechanosensitive Kanäle werden durch Änderungen der Membranspannung aktiviert. Möglicherweise führt die Behandlung von *C. glutamicum* mit Ethambutol und Tween40 zu einer Erhöhung der Membranspannung, so dass Transporter wie YggB aktiviert werden. Da das gegenwärtige Modell zum Mechanismus der Exkretion von L-Glutamat neben einer erleichterten Passage durch die Mycolsäureschicht und einem aktiven Export durch die Cytoplasmamembran die Modulierung des Exporters durch seine Umgebung umfasst (Eggeling & Sahn, 2001), wäre es denkbar, dass auch die Aktivität des L-Glutamat-Exporters durch mechanischen Stress der Zellmembran beeinflusst wird.

Mechanischer Stress kann zum Beispiel durch Veränderung der Osmolalität des umgebenden Mediums hervorgerufen werden. *C. glutamicum* reagiert auf hypoosmotischen Stress durch Ausschleusung osmotisch wirksamer Solute über mechanosensitive Kanäle (Ruffert *et al.*, 1997). Es gibt allerdings auch Hinweise aus *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum* und *E. coli*, dass die Ausscheidung kompatibler Solute über andere Transportproteine vermittelt werden kann (Glaasker *et al.*, 1996; Koo *et al.*, 1991; Lamark *et al.*, 1992; Styrvold & Ström, 1991).

Lambert *et al.* (1995) zeigten bereits, dass die Glutamatausscheidung von *C. glutamicum* nach Induktion durch das Lokalanästhetikum Tetracain durch Veränderungen des osmotischen Gradienten beeinflusst werden kann. Um zu überprüfen, ob dies auch auf andere Stimuli zutrifft, wurde *C. glutamicum* unter Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel, Ethambutol, Penicillin G und Tween40 zunächst in Medium definierter Osmolalität kultiviert und anschließend in salines Medium abgestufter Osmolalität (hyper-, iso- und hypoton) transferiert. Die Konzentration von L-Glutamat im Kulturüberstand wurde nach 4 h bestimmt.

Abbildung 21 verdeutlicht, dass hyperosmotischer Schock (2168 mOsm) die Ausscheidung von Glutamat unter allen induzierenden Kultivierungsbedingungen drastisch reduzierte, während eine Verschiebung zum hypoosmotischen Milieu (597 mOsm) einen stimulierenden Effekt ausübte.

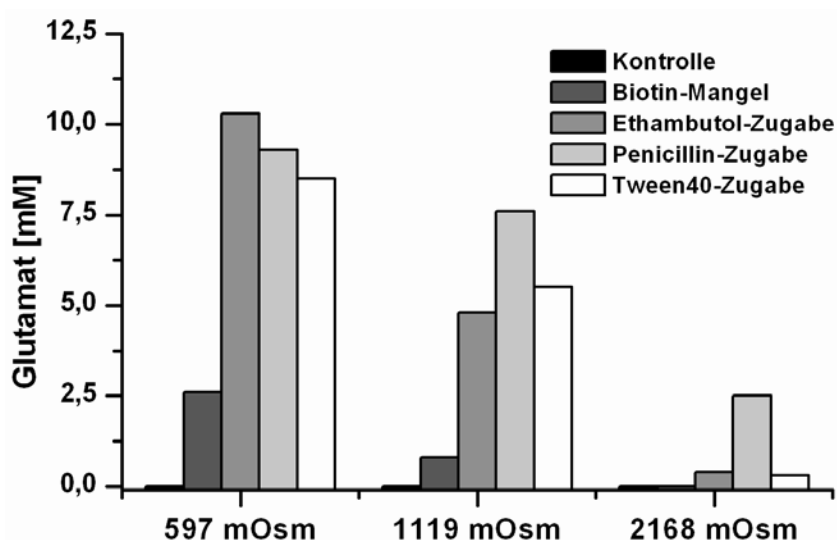


Abbildung 21: Osmotisch abhängige Glutamatakkumulation im Kulturüberstand von *C. glutamicum* unter induzierenden Kultivierungsbedingungen. *C. glutamicum* wurde nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel, Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40 in isoosmotischem Medium oder ohne induzierende Bedingungen (Kontrolle) vorkultiviert und anschließend in salines Medium abgestufter Osmolalität (hypo-, iso- und hyperten) mit oder ohne Stimuli der Glutamatausscheidung (Biotin-Mangel, Ethambutol, Penicillin G, Tween40) transferiert. Die Konzentration von Glutamat im Kulturüberstand wurde nach 4 h mittels *reversed phase* HPLC bestimmt.

Osmotischer Stress allein hatte auf nicht-induzierte Zellen jedoch keinen Einfluss (Kontrollen, Abb. 21). Die beobachtete Reduktion der Glutamatausscheidung nach hypoosmotischem Schock kann nicht auf Veränderungen der Ionen-Konzentration zurückgeführt werden, da eine Wiederholung der Experimente mit Sorbit als Osmotikum vergleichbare Resultate ergab (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten mit dem Lysin-Produzenten *C. glutamicum* MH20-22B konnte gezeigt werden, dass die Ausscheidung von Lysin im Gegensatz zu Glutamat unabhängig von den osmotischen Verhältnissen war.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der noch zu identifizierende L-Glutamat-Exporter durch die Membranspannung in seiner Aktivität beeinflusst wird, worüber auch ein Zusammenhang mit der Zellwand als bekannter Wirkort der verschiedenen Stimuli hergestellt werden könnte.

V. DISKUSSION

Mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* werden jährlich 1,5 Millionen Tonnen L-Glutamat produziert (Hermann, 2003). Aufgrund seiner großen industriellen Bedeutung wurde in den letzten Jahrzehnten die Forschung an diesem Bakterium intensiviert. Dennoch gibt es bislang kein schlüssiges Modell, welches die Ausscheidung von L-Glutamat und die Vielzahl der Induktionsbedingungen auf molekularer Ebene erklärt. Um das Verständnis zu vertiefen, sollten in dieser Arbeit durch genomumfassende DNA-Chip-Analysen Expressionsmuster in *C. glutamicum* identifiziert werden, die für verschiedene Auslöser der Glutamatausscheidung charakteristisch sind.

Wachstum und Regulation der Genexpression in Anwesenheit von L-Glutamat

Wie die experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, erfolgt bei simultaner Bereitstellung von Glucose und L-Glutamat in CGXII-Minimalmedium eine sequentielle Verwertung beider Kohlenstoffquellen, wobei die Aufnahme von L-Glutamat einer Kataboliten-Repression durch Glucose unterliegt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Untersuchungen zum Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf Komplexmedium mit Glucose und L-Glutamat (Krämer *et al.*, 1990). Die Transkriptomanalysen zeigen, dass L-Glutamat keinen Einfluss auf die Genexpression von *C. glutamicum* ausübt, wenn gleichzeitig Glucose verfügbar ist. Die Untersuchungen verdeutlichen zudem, dass die Expression des *gluABCD*-Operons, das für ein primär aktives L-Glutamat-Aufnahmesystem kodiert und bei der Verwertung von L-Glutamat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle eine Rolle spielt (Krämer *et al.*, 1994; Kronemeyer *et al.*, 1995), unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst wird. Ebenso wird das zweite bekannte L-Glutamat-Aufnahmesystem (GltS), das vermutlich an der Wiederverwertung exkretierten L-Glutamats beteiligt ist (Trötschel *et al.*, 2003), unverändert exprimiert, wenn im Medium noch Glucose vorhanden ist. Untersuchungen zur differentiellen Genexpression nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Ethambutol zeigen, dass die Expression von *gluABCD* mit sinkender Glucose-Konzentration im Medium ansteigt (vgl. Tab. 6, 70 mM Restglucose nach 25 h). Die Ergebnisse deuten somit auf eine Glucose-abhängige Regulation der beiden Transporter durch Transkriptionskontrolle hin.

Regulation der Genexpression unter L-Glutamat-Exkretionsbedingungen

Im Vordergrund der Transkriptomanalysen dieser Arbeit stand die Untersuchung, ob es ein Genexpressionsmuster gibt, das unabhängig von der Art der Induktion bei der Exkretion von

L-Glutamat auftritt und die Vielzahl der Induktionsbedingungen auf molekularer Ebene erklären kann. In dieser Arbeit wurden deshalb genomweite Genexpressionsmuster von *C. glutamicum* identifiziert, die für verschiedene Auslöser der Glutamatausscheidung charakteristisch sind. Bei Induktion der Exkretion durch Biotin-Mangel, Ethambutol, Penicillin, Tween40 und Temperaturschock zeigt sich eine Vielfalt von Expressionsänderungen. Obwohl die Ausscheidung von L-Glutamat mit charakteristischen Veränderungen des Zentralstoffwechsels einhergeht (Delaunay *et al.*, 1999; Delaunay *et al.*, 2004; Hoischen & Krämer, 1990; Marx *et al.*, 1997; Peters-Wendisch *et al.*, 2001; Shiio *et al.*, 1963; Takinami *et al.*, 1968), die zu einem L-Glutamat-Überflussmetabolismus führen (Kimura, 2003), zeigen die Transkriptomanalysen überraschenderweise, dass die Expression der entsprechenden Gene unter Induktionsbedingungen nicht beeinflusst wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Regulation des veränderten Zentralstoffwechsels nicht durch Transkriptionskontrolle, sondern vielmehr auf Protein- oder Aktivitätsebene erfolgt.

Die genomweiten DNA-Chip-Analysen dieser Arbeit ermöglichten die Identifizierung spezifischer, jedoch jeweils unterschiedlicher Genexpressionsmuster während der Glutamatausscheidung nach Induktion durch Biotin-Mangel, Zugabe von Ethambutol, Penicillin G oder Tween40 sowie durch Temperaturschock. In Gegenwart von Penicillin G, unter Biotin-Mangel oder nach Temperaturschock werden nur wenige Gene differenziell exprimiert. Die Antwort auf Ethambutol und Tween40 fällt dagegen wesentlich stärker aus.

Ethambutol - Ein Auslöser der Glutamatausscheidung bei *C. glutamicum*, der in dieser Arbeit besonders intensiv untersucht wurde, ist das Chemotherapeutikum Ethambutol (Radmacher, 2004; Radmacher, Stansen *et al.*, 2005). Für *Mycobacterium* konnte gezeigt werden, dass Ethambutol durch Interaktion mit Arabinosyltransferasen der Arabinogalactan- und Lipomannan-Synthese in die Zellwandstruktur eingreift (Belanger *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Mikusova *et al.*, 1995). In *M. smegmatis* sind zwei putative Arabinosyltransferasen EmbA und EmbB, die von den Genen *embA* und *embB* kodiert werden, an der Bildung von Arabinogalactan beteiligt (Escuyer *et al.*, 2001), während das von *embC* kodierte Polypeptid EmbC vermutlich in der Synthese von Lipomannan involviert ist (Zhang *et al.*, 2003a). Das Genom von *C. glutamicum* enthält nur ein *emb*-Gen (*NCgl0184*). Durch Deletion dieses Gens oder Ethambutol-Zugabe ist der Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex stark verändert (Radmacher, 2004; Radmacher, Stansen *et al.*, 2005), so dass die Translokation von L-Glutamat durch diese äußere Permeationsbarriere erleichtert wird (Abb. 24). Überraschenderweise konnte in den Transkriptomanalysen dieser Arbeit für *emb* in Anwesenheit von Ethambutol über einem Zeitraum von 25 h keine signifikant veränderte Expression nachgewiesen werden (Abb. 22).

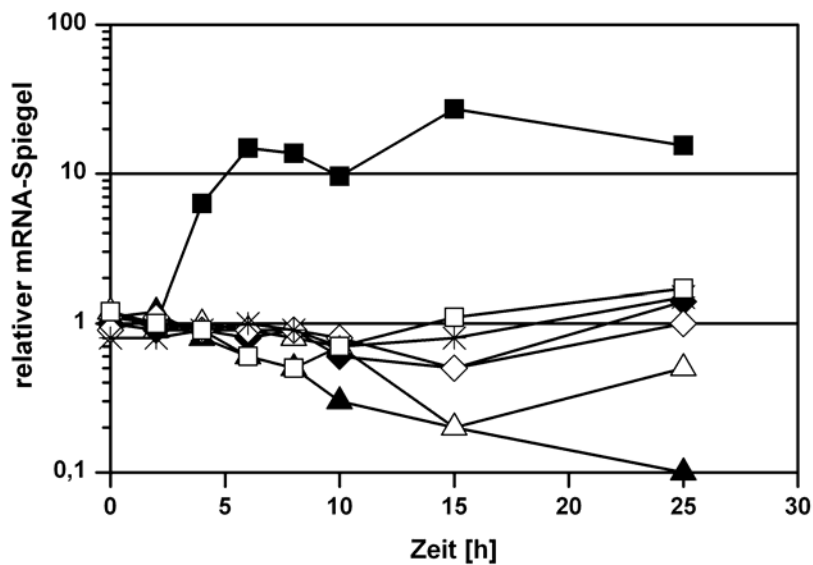


Abbildung 22: Expressionsänderungen von *emb* (*), der Gene des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes *odhA* (Δ), *sucB* (\blacklozenge) und *lpd* (\diamond) sowie eines repräsentativen Gens ribosomaler Proteine, *rplD* (\square) nach Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit von Ethambutol. Zum Vergleich sind die zwei Gene mit maximalen Expressionsprofilen dargestellt: *mepA* (\blacksquare) und *ctaE* (\blacktriangle).

Die Daten weisen also darauf hin, dass die Zelle dem Effekt des Antibiotikums nicht durch eine verstärkte Bereitstellung von *emb*-mRNA entgegenwirkt. Bisher konnte auch kein *emb*-Regulator im Genom von *C. glutamicum* identifiziert werden, wie es etwa für EmbR aus *M. avium* und *M. tuberculosis* der Fall ist (Belanger *et al.*, 1996). EmbR aus *M. tuberculosis* wird durch die Serin-Threonin-Proteinkinase PknH phosphoryliert, allerdings bleibt unklar, ob diese Phosphorylierung bei Antwort auf Ethambutol relevant ist und wie die Funktion von EmbR durch Ethambutol moduliert wird (Molle *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu *emb* konnte aber für eine Reihe von Genen mit Bezug zur Zellwand eine veränderte Expression festgestellt werden. Eine putative sekretierte saure Phosphatase (*NCgl0576*) wird in Anwesenheit von Ethambutol transient exprimiert. Interessanterweise liegt stromaufwärts im Genom von *C. glutamicum* ein Gen, das für einen Sigma-Faktor der RNA-Polymerase (*NCgl0575*) kodiert und in den Transkriptomanalysen mit größeren Schwankungen (p -Wert $>0,05$) eine erhöhte Expression aufweist. Die Sequenz und genomische Organisation dieses putativen Operons ist in allen *Corynebacteriaceae* ähnlich. In *M. tuberculosis* wird die Expression des Sigma-Faktor-Gens (*sigD*) durch Kälteschock reguliert (Manganelli *et al.*, 2001). Das Operon *NCgl0575-NCgl0576* könnte in *C. glutamicum* daher an einer Stressantwort beteiligt sein. Ein Charakteristikum der ECF-Sigma-Faktoren (extracytoplasmatische Funktion, ECF), zu denen auch σ^D zählt, ist die Regulation extracytoplasmatischer Funktionen. Die erhöhte Expression von *NCgl0575* deutet daher auf einen direkten Zusammenhang mit der Restrukturierung der Zellhülle. Für weitere Gene mit

Bezug zur Zellwand konnte in Anwesenheit von Ethambutol ebenfalls eine erhöhte Expression festgestellt werden, so zum Beispiel für *NCgl0768 (ftsE)*, das für ein ATP-bindendes Protein kodiert und in *E. coli* am Transport von Komponenten der Zellteilung partizipiert (Schmidt *et al.*, 2004). Das von *NCgl0394* kodierte Protein zählt zu einer Familie von ATP-abhängigen Permeasen, die am Transport von Lipiden der Zellwand beteiligt sind. Zusammenfassend gibt die erhöhte Expression der oben genannten Gene einen deutlichen Hinweis auf die Veränderungen der Zellwandtopologie nach Hemmung der Arabinogalactan-Synthese durch Ethambutol.

Etwa zwei Drittel der Gene, die in Anwesenheit von Ethambutol differentiell exprimiert werden, kodieren für cytosolische Enzyme. In Anbetracht der zum Teil drastischen Konsequenzen auf die mRNA-Spiegel für diese Enzyme ist es erstaunlich, dass Gene für Enzyme des Zentralstoffwechsels in ihrer Expression unbeeinflusst bleiben. Lediglich eine schwache Reduktion der *odhA*- und *lpd*-mRNA-Spiegel kann beobachtet werden (Abb. 22). Die Produkte dieser Gene bilden vermutlich Untereinheiten des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes, der mit der Glutamat-Dehydrogenase um das gemeinsame Substrat L-Glutamat konkurriert (Kimura, 2003; Uy *et al.*, 2003). Die Expressionsdaten und die Tatsache, dass die Umwandlung von Zucker zu L-Glutamat trotz Hemmung des Wachstums stattfindet, deutet auf eine konstitutive Transkription der Gene des Zentralstoffwechsels hin, die unabhängig vom Status der Zellhülle ist. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in *M. tuberculosis* nach Zugabe von Antibiotika beobachtet werden (Waddell *et al.*, 2004).

Biotin-Mangel - Die Untersuchung des Transkriptom von *C. glutamicum* unter Biotin-Mangel offenbart deutlich erhöhte mRNA-Spiegel von Genen der Synthese (*bioA* und *bioB*) und Aufnahme (*bioY*, *NCgl1884*) von Biotin (Abb. 23). Dies ist insofern überraschend, als *C. glutamicum* Biotin-auxotroph ist. Der Defekt in der Biotin-Synthese ist vermutlich auf den Verlust des Gens *bioF* zurückzuführen (Hatakeyama *et al.*, 1993a; Hatakeyama *et al.*, 1993b), das für die 7-Keto-8-Aminopelargonsäure-Synthetase kodiert. In *E. coli* erfolgt die Kontrolle der Biotin-Synthese über Biotin und das bifunktionale BirA-Protein (DeMoll, 1994), welches als Biotin-Protein-Ligase wie auch als Repressor des Biotin-Operons agieren kann und in den meisten bekannten bakteriellen Genomen zu finden ist (Rodionov *et al.*, 2002). Das Genom von *C. glutamicum* enthält zwar eine putative Biotin-Ligase (*NCgl0679*), die zu dem Cluster orthologer Gruppen COG0340 zählt und 29% Sequenzidentität zu BirA (REC03867) aus *E. coli* aufweist, Rodionov *et al.* (2002) konnten allerdings zeigen, dass in *C. glutamicum* weder das BirA-Bindemotiv noch die DNA-Bindedomäne vorhanden sind. Es bleibt somit unklar, wie die trotz Biotin-Auxotrophie noch intakte Transkriptionsregulation der Biotin-Gene in *C. glutamicum* erfolgt.

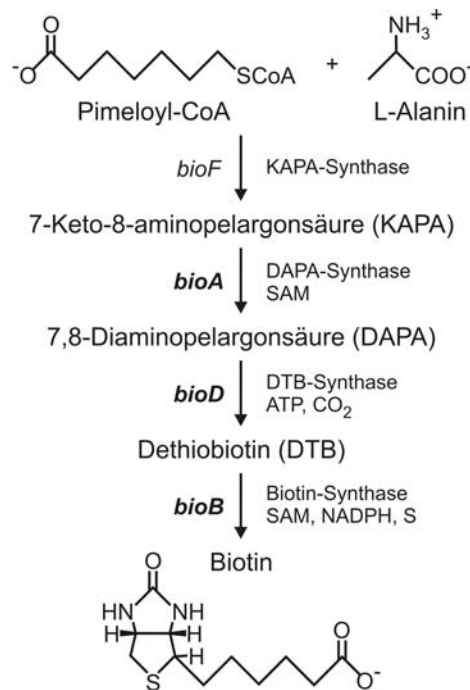


Abbildung 23: Der Biosynthese-Weg von Biotin. Fettgedruckte Gene sind in *C. glutamicum* präsent und funktionell aktiv.

Biotin-Mangel führt in *C. glutamicum* zu einer Veränderung des Lipidgehalts und der Zusammensetzung der Membran (Hoischen & Krämer, 1990). In *C. glutamicum* existieren zwei Carboxylasen, für die Biotin als kovalent gebundene prosthetische Gruppe nachgewiesen werden konnte. Neben der anaplerotischen Pyruvatcarboxylase (Peters-Wendisch *et al.*, 1998), ist das die aus den beiden Untereinheiten AccBC und AccD1 (DtsR1) bestehende Acetyl-CoA-Carboxylase (Jäger *et al.*, 1996). Da dieses Enzym in der Fettsäuresynthese von *C. glutamicum* involviert ist (Kimura *et al.*, 1997), liegt der Schluss nahe, dass die Veränderung des Lipidgehalts unter Biotin-Mangel auf eine Reduktion der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität und somit auf einer verringerten Fettsäuresynthese beruht (Abb. 24). Durch die vorliegende Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *accBC* und *accD1* (*dtsR1*) nicht durch Biotin-Mangel beeinflusst wird. Kimura *et al.* (1999) konnten zeigen, dass das AccBC-Protein nach achtstündiger Kultivierung unter Biotin-Mangel kaum nachweisbar ist, während der zunächst hohe Spiegel des detergentensensitiven AccD1-(DtsR)-Proteins erst nach 24 h stark abnimmt. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die Regulation von *accBC* und *accD1* nicht über Transkriptionskontrolle, sondern vielmehr über Proteinabbau erfolgt. Da die DNA-Chip-Analysen dieser Arbeit allerdings zu einem früheren Kultivierungszeitpunkt durchgeführt wurden als die von Kimura *et al.* (1999) beschriebenen Protein-Analysen, kann trotz unveränderter Expression von *accBC* und *accD1* nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression dieser Gene später reguliert wird.

Tween40 - Wie bereits von Kimura *et al.* (1999) gezeigt, inhibiert die Überexpression der β -Untereinheit (AccD1) der Acetyl-CoA-Carboxylase die Induktion der Glutamatausscheidung nicht nur unter Biotin-Mangel sondern auch in Anwesenheit von Tween40 (Abb. 24), während eine Deletion zu konstitutivem Glutamatefflux führt. In dieser Arbeit konnte durch Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* gezeigt werden, dass *accBC* (α -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase) und *accD1* in Anwesenheit von Tween40 etwa zweifach reduziert exprimiert werden. Diese Ergebnisse sprechen im Gegensatz zu den Expressionsdaten der Biotin-Mangel-Experimente für eine Regulation von *accBC* und *accD1* durch Transkriptionskontrolle. Die Veränderung der Lipidzusammensetzung in *C. glutamicum* nach Behandlung mit Tween40 (Nampoothiri *et al.*, 2002) korreliert somit unmittelbar mit der reduzierten Expression der Gene der Acetyl-CoA-Carboxylase.

Die Behandlung von *C. glutamicum* mit dem Detergens Tween40 löst darüber hinaus eine Vielzahl von Expressionsveränderungen aus. Bei einigen dieser Gene könnte ebenfalls ein Bezug zur Zellwand bestehen. Der durch *sigB* kodierte Sigma-Faktor (*NCgl1844*) spielt eine Rolle in der Transkription von Genen, die auf Stressfaktoren wie Kälte- oder Hitzeschock, aciden pH, Salz und Ethanol reagieren (Halgasova *et al.*, 2002). In *M. tuberculosis* agiert σ^B als alternativer Sigma-Faktor, wenn σ^A inaktiv ist (Manganelli *et al.*, 2001). Die Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes von *sigB* aus *C. glutamicum* ist nahezu identisch zu dem Motiv des *sigB*-Promotors aus *M. tuberculosis*, der sich unter der Kontrolle der beiden ECF-Sigma-Faktoren σ^H und σ^E befindet (Manganelli *et al.*, 2001). Der Promotor von *sigB* aus *C. glutamicum* könnte somit ebenfalls unter der Kontrolle eines ECF-Sigma-Faktors stehen (Halgasova *et al.*, 2002). In *M. tuberculosis* wird die Expression von *sigE* durch das Detergens SDS induziert (Manganelli *et al.*, 1999). Unter der Kontrolle von σ^E stehen unter anderem Gene des Fettsäure- und Proteinabbaus (Manganelli *et al.*, 2002). Durch die Transkriptomanalysen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *sigE*-Gen (*NCgl1075*) in *C. glutamicum* Detergens-abhängig exprimiert wird. Die erhöhte Expression von *sigE* und *sigB* in Anwesenheit von Tween40 könnte daher auf einen direkten Zusammenhang mit den für Tween40 charakteristischen Veränderungen der zellulären Lipidzusammensetzung stehen. Für den Sigma-Faktor σ^H aus *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass über ihn die transkriptionelle Aktivierung der Clp-Protease-Gene *clpC*, *clpP1P2* und *clgR* nach Hitzeschock erfolgt (Engels *et al.*, 2004). Unklar bleibt, ob die putativen σ^H -Promotoren dieser Gene in *C. glutamicum* auch von σ^E erkannt werden, wie es für den *clpB*-Promotor aus *M. tuberculosis* der Fall ist (Raman *et al.*, 2001). Die erhöhte Expression von *clpP1P2* nach Induktion der Glutamatausscheidung durch Tween40 deutet ebenfalls auf eine Detergens-abhängige Regulation durch σ^E hin. Interessanterweise wies auch *NCgl1316*, das

für ein Protein der allgemeinen Stressantwort kodiert, einen erhöhten mRNA-Spiegel auf. In *M. tuberculosis* wird das entsprechende Homologe unter Sauerstoffmangel exprimiert (O'Toole & Williams, 2003) und es steht unter der Kontrolle eines Zwei-Komponenten-Systems (O'Toole *et al.*, 2003).

Penicillin G - Die Analysen zur Genexpression in Anwesenheit des Antibiotikums Penicillin G zeigten, dass nur wenige Gene in ihrer Expression beeinflusst werden. Ein direkter Bezug dieser Gene zu Penicillin konnte nicht aufgedeckt werden. Penicillin greift in die Synthese des Peptidoglykans ein, indem es die Aktivität von Transpeptidasen hemmt. In den Transkriptomanalysen dieser Arbeit konnte jedoch keine veränderte Expression der Transpeptidase-Gene in Anwesenheit von Penicillin G nachgewiesen werden. Auch Untersuchungen zur globalen Genexpression von *E. coli* in Anwesenheit von Ampicillin deuten auf eine unveränderte Expression dieser Gene hin (Shaw *et al.*, 2003). Offensichtlich spielt sowohl bei *E. coli* als auch bei *C. glutamicum* eine genetische Regulation dieser Gene keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Antwort auf β -Lactam-Antibiotika. Denkbar wäre allerdings auch, dass nur der Zeitpunkt der Probennahme für die DNA-Chip-Analysen ungünstig gewählt wurde und die Zahl der Expressionsveränderungen zu einem späteren Kultivierungszeitpunkt noch deutlich steigt. Die experimentellen Daten zur zeitaufgelösten Genexpression in Anwesenheit von Ethambutol sprechen jedoch gegen diese Annahme, da gezeigt werden konnte, dass die Zahl der verändert exprimierten Gene nur unwesentlich mit der Kultivierungsdauer ansteigt.

Cluster-Analyse - Den Vergleich der Expressionsdaten zusammenfassend lässt sich sagen, dass es kein Muster erhöhter oder reduzierter Genexpression gibt, welches unabhängig von der Art der Induktion stets bei der Ausscheidung von L-Glutamat auftritt. Auf Transkriptionsebene hält die Hypothese, dass es eine Verbindung zwischen den verschiedenen L-Glutamat-Exkretionsbedingungen geben muss, somit nicht stand. Denkbar wäre jedoch, dass eine gemeinsame Regulation auf Proteinebene erfolgt. Interessant wäre in diesem Falle zum Beispiel eine vergleichende Proteomanalyse unter den verschiedenen L-Glutamat-Exkretionsbedingungen.

Charakterisierung der L-Lactat-Verwertung während der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung

Durch globale DNA-Chip-Analysen des L-Glutamat-Produzenten *C. glutamicum* 2262 und seiner nicht-produzierenden Mutante 2262-NP konnten zwei Gene identifiziert werden, die während der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung in dem Produzenten mindestens

neunfach erhöht exprimiert wurden. *NCgl2816* und *NCgl2817* kodieren für eine putative Permease und eine putative L-Lactat-Dehydrogenase. Ihre benachbarte Lage im Genom deutete auf eine Organisation als Operon hin. Da während der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung des Stammes *C. glutamicum* 2262 L-Lactat als Nebenprodukt anfällt, lag die Vermutung nahe, dass *NCgl2816* und *NCgl2817* ein Operon der Verwertung von ausgeschiedenem L-Lactat bilden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *NCgl2817* (*lldD*) aus *C. glutamicum* für die einzige L-Lactat-Dehydrogenase kodiert, die für das Wachstum auf L-Lactat essentiell ist. Eine Disruption des Operons *NCgl2816-lldD* resultierte in dem Verlust der Fähigkeit, L-Lactat als Kohlenstoffquelle zu nutzen, konnte jedoch durch Überexpression von *lldD* wiederhergestellt werden. Enzymatische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem von *lldD* kodierten Enzym um eine Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.2.3) handelt, die spezifisch L-Lactat zu Pyruvat reduziert und weder D-Lactat noch Malat als Substrat akzeptiert. Die Affinität für L-Lactat beträgt 0,51 mM und liegt somit zwischen den K_m -Werten der entsprechenden Enzyme aus *Saccharomyces cerevisiae* (0,03 mM) und *Rhizopus oryzae* (3,85 mM) (Pritchard, 1971; Xia & Mathews, 1990). Die in Rohextrakten aus *C. glutamicum* ATCC 13032 bestimmte spezifische Aktivität von $0,23 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg Protein})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ steht im Einklang mit der berechneten Aufnahme rate von $0,11 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg Trockenmasse})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ während der Verwertung dieses Substrats. Die Abhängigkeit der Reaktion von dem künstlichen Elektronenakzeptor Dichloroindophenol (DCPIP) sowie biochemische Untersuchungen bakterieller Quinon-abhängiger L-Lactat-Dehydrogenasen und die Kristallstruktur des Enzyms aus Hefe (Xia & Mathews, 1990), in denen FMN als prosthetische Gruppe identifiziert werden konnte, legen die Vermutung nahe, dass das Enzym aus *C. glutamicum* ebenfalls FMN als Cofaktor nutzt.

Die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* zählt zu dem Cluster orthologer Gruppen COG1304 und weist 88% Sequenzidentität zu *C. efficiens* CE2762 auf. In der nahe verwandten Gattung *Mycobacterium* sind zwei Gene für Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenasen zu finden (*lldD1* und *lldD2*). Die Sequenzähnlichkeiten der *lldD* aus *C. glutamicum* zu *lldD2*-Enzymen aus *M. tuberculosis* (57%, Rv1872c), *M. avium* subsp. Paratuberculosis (58%, MAP1585c), *M. bovis* (58%, Mb1903c) und *M. leprae* (58%, ML2046) ist deutlich höher als zu den *lldD1*-Enzymen dieser Spezies (jeweils 31% für *M. tuberculosis* Rv0694, *M. avium* subsp. Paratuberculosis MAP4154 und *M. bovis* Mb0713) wie auch zu der *lldD* aus *E. coli* (34 %) und einer L-Lactat-Ferricytochrom c-Reduktase aus *S. cerevisiae* (29%).

Die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* konnte kürzlich durch Proteomanalysen als Membran-assoziiertes Protein identifiziert werden (Schluesener *et al.*,

2005). Die Bindung der LldD an die Membran könnte einerseits die Oxidation von L-Lactat unmittelbar nach der Aufnahme erleichtern oder aber für die NADH-Oxidation von Bedeutung sein (Nantapong *et al.*, 2004). Disruption eines Typ II-NADH-Dehydrogenase-Gens (*ndh*) in *C. glutamicum* KY9714 resultierte in einer erhöhten L-Lactat-Oxidase-Aktivität, während eine Überexpression des *ndh*-Gens zu reduzierten Aktivitäten der L-Lactat- wie auch der Malat-Oxidase führte (Nantapong *et al.*, 2004). Möglicherweise kann die Funktion der Typ II-NADH-Dehydrogenase durch Kopplung cytoplasmatischer NAD-abhängiger L-Lactat-Dehydrogenase und Membran-assoziiierter Quinon-abhängiger L-Lactat-Dehydrogenase und/oder durch Kopplung cytoplasmatischer NAD-abhängiger Malat-Dehydrogenase und Membran-assoziiierter Malat:Quinon-Oxidoreduktase substituiert werden (Nantapong *et al.*, 2004).

NCgl2816 wird zusammen mit *lldD* in einem Operon transkribiert und kodiert für eine putative Permease der Uniporter-Symporter-Antiporter-Superfamilie (TC 2.A.1; (Winnen *et al.*, 2005)). Die Disruption des Operons *NCgl2816-lldD* in *C. glutamicum* ATCC 13032 resultierte in dem Verlust der Fähigkeit, L-Lactat als Kohlenstoffquelle zu nutzen, konnte jedoch durch Überexpression von *lldD* wiederhergestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Funktion der putativen Permease für die Verwertung von L-Lactat nicht essentiell ist. Sofern *NCgl2816* für einen L-Lactat-Transporter kodiert, wie es seine Primärsequenz und die Operonorganisation mit dem *lldD*-Gen zumindest vermuten lassen, muss in *C. glutamicum* mindestens ein weiterer Carrier zur Aufnahme von L-Lactat existieren. Tatsächlich kann L-Lactat in *E. coli* entweder über die L-Lactat-Permease LldP (Dong *et al.*, 1993) oder über das Glycolat-Aufnahmesystem GlcA (Nunez *et al.*, 2001) transportiert werden. Beide Systeme sind hinsichtlich der Aufnahme von 2-Hydroxymonocarboxylaten redundant (Nunez *et al.*, 2001; Nunez *et al.*, 2002). In Transkriptomanalysen von *C. glutamicum* nach Wachstum auf L-Lactat zeigten *NCgl2713* und *NCgl2965* erhöhte mRNA-Spiegel. Da beide Gene für putative Permeasen kodieren, stellen sie möglicherweise Kandidaten für 2-Hydroxymonocarboxylat-Carrier dar.

Die Expression des *NCgl2816-lldD*-Operons unterliegt einer Regulation durch die Kohlenstoffquelle. In Gegenwart von L-Lactat wiesen die Gene *NCgl2816* und *lldD* stark erhöhte mRNA-Spiegel auf. In Einklang mit diesen Daten konnte eine erhöhte spezifische Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase festgestellt werden. Die Transkription des *lld*-Operons wird in *E. coli* durch das Zwei-Komponenten-System ArcB/ArcA unter anaeroben Bedingungen reprimiert, durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Repressor PdhR aktiviert und vermutlich durch einen weiteren Regulator LldR reprimiert (Dong *et al.*, 1993; Quail & Guest, 1995). Ein entsprechendes Regulationssystem konnte für *C. glutamicum* bislang nicht identifiziert werden.

L-Lactat wird während der Glutamatausscheidung als Nebenprodukt in das Medium ausgeschieden und über die Quinon-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase wieder assimiliert. Die ursprüngliche Bildung des L-Lactats aus Pyruvat erfolgt ausschließlich über die durch *ldhA* kodierte NAD-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) (Inui *et al.*, 2004). Daher ist es zur Verbesserung von Produktionsstämmen vorteilhaft, die simultane Bildung von L-Lactat und L-Glutamat während der Temperatur-induzierten Glutamatausscheidung durch Deletion von *ldhA* zu unterbinden.

Modell zur Ausscheidung von L-Glutamat

Durch den Vergleich der Expressionsdaten zu den verschiedenen Induktionsbedingungen konnte zwar gezeigt werden, dass es kein Muster erhöhter oder reduzierter Genexpression gibt, welches unabhängig von der Art der Induktion stets bei der Glutamatausscheidung auftritt, dennoch fielen einige Übereinstimmungen zwischen der Ethambutol- und Tween40-induzierten Expression auf. So wird das Gen *mepA* (*NCgl2411*) unter diesen beiden Bedingungen mehr als dreifach verstärkt exprimiert. Dieses Gen kodiert für eine putative sekretierte Metalloendopeptidase. Wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, führt Überexpression von *mepA* aus *C. glutamicum* in *E. coli* zu lang gestreckten Zellen, die darüber hinaus sensitiv auf hypoosmotischen Schock reagieren (Möker *et al.*, 2004). Die erhöhte Expression von MepA weist somit auf eine Restrukturierung des Peptidoglykans nach Behandlung von *C. glutamicum* mit Ethambutol oder Tween40 hin. Darüber hinaus konnte in Anwesenheit von Ethambutol und Tween40 eine veränderte Expression von Genen festgestellt werden, die für Membranproteine kodieren. So wies beispielsweise *yggB* (*NCgl1221*), das für einen mechanosensitiven Kanal kodiert (Nottebrock *et al.*, 2003), einen drei- bis fünffach erhöhten mRNA-Spiegel auf, was auf einen Zusammenhang mit osmotischen Effekten hinweisen könnte (s.u.). Aus globalen Expressionsanalysen von *E. coli* weiß man allerdings, dass eine hohe Zahl von Membranproteinen als Folge von Antibiotika-Zugabe verändert exprimiert werden (Shaw *et al.*, 2003).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Membranproteinen, die unter Induktionsbedingungen verstärkt exprimiert werden und somit unmittelbar am L-Glutamat-Efflux beteiligt sein könnten. Dazu wurden 13 Gene in *C. glutamicum* ATCC 13032 inaktiviert und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Glutamatausscheidung überprüft. Das Gros der untersuchten Mutanten produzierte vergleichbar viel L-Glutamat wie der Wildtyp. Diese Mutanten wuchsen auch die der Wildtyp, so dass diese Transporter als nicht-essentiell anzusehen sind. Die Glutamatbildung der Mutanten 13032::*NCgl0944* und 13032 Δ *NCgl2566* hingegen war jeweils in Anwesenheit ausgewählter Auslöser der Glutamatausscheidung

signifikant reduziert. Im Falle der Mutante 13032::*NCgl0944* war die Exkretionsleistung unter Biotin-Mangel oder in Anwesenheit der Antibiotika Ethambutol und Penicillin G im Vergleich zum Wildtyp drastisch verringert, in Anwesenheit von Tween40 jedoch unverändert. *NCgl0944* kodiert für eine putative Permease der sekundär aktiven Uniporter-Symporter-Antiporter-Familie (COG0477, (Pao *et al.*, 1998)), deren Sequenz 81% Identität zu CE1048 aus *C. efficiens* aufweist. Obwohl die biochemischen Daten zum Exportmechanismus eher auf einen primär aktiven Exporter hinweisen (Gutmann *et al.*, 1992; Gutmann, 1993), wird ein sekundär aktives System nicht ausgeschlossen (Krämer, pers. Mitteilung).

Im Gegensatz zu 13032::*NCgl0944* wies die Deletionsmutante 13032 Δ *NCgl2566* nur nach Induktion mit Tween40 eine deutlich reduzierte Bildung von L-Glutamat auf, während Biotin-Mangel und Penicillin-Behandlung zu kaum verringerter Glutamatausscheidung führte. Allerdings waren diese Ergebnisse bei drei verschiedenen Klonen unterschiedlich, obwohl sie für jeden individuellen Klon reproduzierbar waren. Deswegen kann ein direkter Zusammenhang zwischen Glutamatausscheidung und Deletion des Gens *NCgl2566* nur mit Vorsicht hergestellt werden. Das unterschiedliche Verhalten der Klone könnte durch Transpositionereignisse während der Erstellung der Mutanten bedingt sein, was bei *C. glutamicum* ein bereits beschriebenes Phänomen ist (Barreiro *et al.*, 2005; Fellmann, 2005; Kalinowski *et al.*, 2003; Sindelar, 2003). *NCgl2566* weist eine hohe Ähnlichkeit zu Proteinen der LysE- und RhtB-Familie von Aminosäure-Exportsystemen auf. Wie bei LysE aus *C. glutamicum* (Vrljic *et al.*, 1996) liegt benachbart dazu ein möglicher Transkriptionsregulator (*NCgl2567*), dessen Deletion zu einem stark verminderten Export von L-Glutamat durch Ethambutol und Tween40 führt (Fellmann, 2005). Da das *NCgl2567*-Genprodukt *in vivo* im Genom von *C. glutamicum* vor *NCgl2566* bindet (Fellmann, 2005), könnte es sich bei dem Gen *NCgl2567* um einen Aktivator für das Gen *NCgl2566* handeln. Die Expression beider Gene wurde allerdings zu den untersuchten Zeitpunkten der Kultivierung weder durch Ethambutol noch durch Tween40 beeinflusst. Aufgrund der gegensätzlichen Stimulus-Abhängigkeit der Stämme 13032::*NCgl0944* und 13032 Δ *NCgl2566* besteht die Möglichkeit, dass zwei Gene für L-Glutamat-Exporter kodieren, die jedoch unterschiedlich aktiviert werden. Zur weiteren funktionalen Charakterisierung der Mutanten und Gene sind zusätzliche Untersuchungen erforderlich, insbesondere die Prüfung, ob deren plasmidvermittelte Überexpression zu einer Steigerung der Glutamatausscheidung führt.

Bislang gibt es noch kein schlüssiges Modell, welches die Exkretion von L-Glutamat und die Vielzahl der Induktionsbedingungen auf molekularer Ebene erklärt (Abb. 24). Bemerkenswert ist, dass alle Stimuli der Glutamatausscheidung in irgendeiner Weise die Zellhülle, einschließlich der inneren Lipiddoppelschicht, beeinflussen.

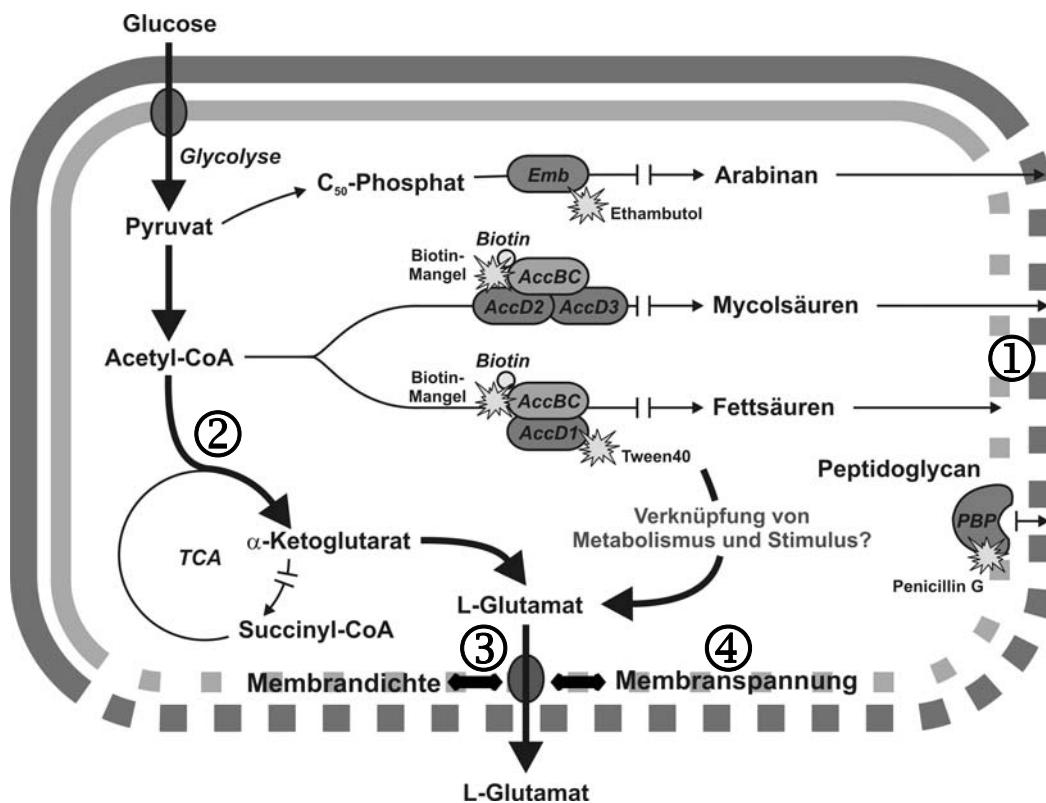


Abbildung 24: Modell zur induzierten Produktion und Exkretion von L-Glutamat. Durch einen extrazellulären Stimulus wird eine Veränderung des bakteriellen Stoffwechsels ausgelöst, der einerseits zu einer verringerten Synthese von Komponenten der Plasmamembran und Zellwand führt (1), andererseits einen L-Glutamat-Überflussmetabolismus auslöst (2). Die Ausscheidung von L-Glutamat erfolgt daraufhin über einen aktiven Export durch die Cytoplasmamembran (3), wobei die Aktivierung des Carriers durch die Membranspannung/-dichte reguliert werden könnte (4). Die Veränderung der Zellwandzusammensetzung (1) erleichtert möglicherweise auch die Translokation von L-Glutamat. Die Verknüpfung von Metabolismus und Stimulus ist unklar. Da aufgrund der Resultate der DNA-Chip-Analysen eine Transkriptionskontrolle ausgeschlossen werden kann, erfolgt die Regulation vermutlich auf Protein- und/oder Aktivitätsebene.

In der vorliegenden Arbeit wurden Belege erbracht, dass zusätzlich auch osmotische Effekte mit in Betracht zu ziehen sind. So konnte gezeigt werden, dass hyperosmotischer Schock die Glutamatausscheidung drastisch reduziert, während eine Verschiebung zum hypoosmotischen Milieu einen stimulierenden Effekt hat. Die Lysinausscheidung hingegen war unabhängig von den osmotischen Bedingungen. Es ist nun vorstellbar, dass durch die reduzierte Zellwandstabilität, wie sie bei Penicillin- oder Ethambutol-Zugabe vorliegt, die Lipiddoppelschicht beeinflusst wird und dies den gesuchten Carrier in seiner Aktivität reguliert. Im Falle der Induktion der Glutamatausscheidung durch Biotin-Mangel und Fettsäureauxotrophie würde die Aktivierung des Carriers dagegen auf direktem Wege erfolgen. Mittlerweile liegen sehr detaillierte Untersuchungen zu einigen ausgewählten Membranproteinen und deren Beeinflussung durch die Lipiddoppelschicht vor. So wird der mechanosensitive Kanal MscL aus *E. coli* durch die physikalischen Eigenschaften der

Plasmamembran in seiner Aktivität beeinflusst (Sukharev *et al.*, 1994). Bei erhöhter Membranspannung kommt es durch Lipid-Protein-Interaktionen zu einer drastischen Veränderung der räumlichen Struktur und damit zum Export von Soluten. Die Kristallstruktur von MscL aus *M. tuberculosis* ist bekannt (Chang *et al.*, 1998). Zwar erfolgt die Aktivierung von MscL durch hypoosmotischen Schock, mit unspezifischem Efflux als Folge, jedoch ist dieses Membranprotein ein sehr gutes Beispiel dafür, wie erhöhte Membranspannung die Aktivität von Carriern beeinflussen kann.

Ein weiteres Beispiel für die physikalische Beeinflussung von Transportern durch die Membranumgebung ist OpuA aus *Lactococcus lactis* (van der Heide *et al.*, 2001). Die Aktivität dieses Carriers ist sehr stark abhängig vom Anteil anionischer Lipide, die die cytoplasmatische Seite des Proteins umgeben. Für *C. glutamicum* ist somit gut vorstellbar, dass die verschiedenen Stimuli letztlich die Lipidumgebung des Carriers beeinflussen und so zu Glutamatexport führen. Es ist gezeigt worden, dass die Überexpression von Genen der Lipidsynthese zu veränderter Lipidzusammensetzung und verändertem Effluxverhalten führt (Nampoothiri *et al.*, 2002). Aufgrund der diversen Auslöser der Glutamatausscheidung ist es aber unwahrscheinlich, dass die Lipidumgebung immer gleichartig verändert sein muss. Die beobachtete osmotische Abhängigkeit des Glutamatexports spricht eher für einen generellen physikalischen Effekt der veränderten Lipidmembran auf den Carrier, wie z.B. eine erhöhte Membranspannung.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

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

Aboulwafa, M. & Saier, M. H., Jr. (2002). Dependency of sugar transport and phosphorylation by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system on membranous phosphatidyl glycerol in *Escherichia coli*: studies with a *pgsA* mutant lacking phosphatidyl glycerophosphate synthase. *Res Microbiol* **153**, 667-677.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

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.

Barksdale, L., Linder, R., Sulea, I. T. & Pollice, M. (1981). Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium bovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* **13**, 335-343.

Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2216-2220.

Barreiro, C., Gonzalez-Lavado, E., Brand, S., Tauch, A. & Martin, J. F. (2005). Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensable chaperone. *J Bacteriol* **187**, 884-889.

Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., Mikusova, K., Belisle, J. T., Brennan, P. J. & Inamine, J. M. (1996). The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11919-11924.

Bellmann, A., Vrljic, M., Patek, M., Sahm, H., Krämer, R. & Eggeling, L. (2001). Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **147**, 1765-1774.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

Börmann-El Kholi, E. R., Eikmanns, B. J., Gutmann, M. & Sahm, H. (1993). Glutamate Dehydrogenase Is Not Essential for Glutamate Formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 2329-2331.

Bott, M. & Niebisch, A. (2003). The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 129-153.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

- Bramucci, M. G. & Nagarajan, V. (1996).** Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3948-3953.
- Brennan, P. J. & Nikaido, H. (1995).** The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**, 29-63.
- Bröer, S. & Krämer, R. (1991).** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur J Biochem* **202**, 131-135.
- Burkovski, A., Weil, B. & Krämer, R. (1996).** Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **136**, 169-173.
- Burkovski, A. & Krämer, R. (2002).** Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 265-274.
- Busch, W. & Saier, M. H., Jr. (2002).** The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**, 287-337.
- Cantor, R. S. (1999).** Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys J*, 2625-2639.
- Cerdeno-Tarraga, A. M., Efstratiou, A., Dover, L. G. & other authors (2003).** The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res* **31**, 6516-6523.
- Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T. & Rees, D. C. (1998).** Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**, 2220-2226.
- Clement, Y., Escoffier, B., Trombe, M. C. & Lanéele, G. (1984).** Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*?: a working hypothesis. *J Gen Microbiol*, 2589-2594.
- Daffé, M. & Draper, P. (1998).** The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**, 131-203.
- Delaunay, S., Gourdon, P., Lapujade, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J. M., Lindley, N. D. & Goergen, J. (1999).** An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and Microbial technology* **25**, 762-768.
- Delaunay, S., Daran-Lapujade, P., Engasser, J. M. & Goergen, J. L. (2004).** Glutamate as an inhibitor of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**, 183-188.
- DeMoll, E. (1994).** Biosynthesis of biotin and lipoic acid. In *Escherichia coli and Salmonella*, pp. 704-709. Edited by F. Neidhardt. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Dong, J. M., Taylor, J. S., Latour, D. J., Iuchi, S. & Lin, E. C. (1993).** Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 6671-6678.

- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V. P., Laneelle, M. A., Yu, K., Quemard, A., Smith, I. & Daffe, M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol* **36**, 630-637.
- Duperray, F., Jezequel, D., Ghazi, A., Letellier, L. & Shechter, E. (1992). Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim Biophys Acta* **1103**, 250-258.
- Ebbighausen, H., Weil, B. & Krämer, R. (1989). Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol*, 238-244.
- Eggeling, L., Krumbach, K. & Sahm, H. (2001). L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or Tween addition doing the same? *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 67-68.
- Eggeling, L. & Sahm, H. (2001). The Cell Wall Barrier of *Corynebacterium glutamicum* and Amino Acid Efflux. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 201-213.
- 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** (Pt 8), 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.
- Entcheva, P., Phillips, D. A. & Streit, W. R. (2002). Functional analysis of *Sinorhizobium meliloti* genes involved in biotin synthesis and transport. *Appl Environ Microbiol*, 2843-2848.
- Ertan, H. (1992a). The effect of various culture conditions on the levels of ammonia assimilatory enzymes of *Corynebacterium callunae*. *Arch Microbiol* **158**, 42-47.
- Ertan, H. (1992b). Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch Microbiol* **158**, 35-41.
- Escuyer, V. E., Lety, M. A., Torrelles, J. B. & other authors (2001). The role of the *embA* and *embB* gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan. *J Biol Chem* **276**, 48854-48862.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Fellmann, M. (2005). Charakterisierung eines putativen Aminosäure-Export- und Regulationssystems aus *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hiraishi, A. & Yamanaka, S. (2002). *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1127-1131.

- Futai, M. & Kimura, H. (1977).** Inducible membrane-bound L-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *J Biol Chem* **252**, 5820-5827.
- Gande, R., Gibson, K. J., Brown, A. K. & other authors (2004).** Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacteriaceae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **279**, 44847-44857.
- George, K. M., Yuan, Y., Sherman, D. R. & Barry, C. E., 3rd (1995).** The biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification and functional analysis of CMAS-2. *J Biol Chem* **270**, 27292-27298.
- 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.
- Gibson, K. J., Eggeling, L., Maughan, W. N., Krumbach, K., Gurcha, S. S., Nigou, J., Puzo, G., Sahn, H. & Besra, G. S. (2003).** Disruption of *Cg-Ppm1*, a polyprenyl monophosphomannose synthase, and the generation of lipoglycan-less mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **278**, 40842-40850.
- Glaesker, E., Konings, W. N. & Poolman, B. (1996).** Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic stress and hyper- and hypo-osmotic shock. *J Biol Chem* **271**, 10060-10065.
- Goodfellow, M. (1992).** The family *Nocardiaceae*. In *The prokaryotes*, pp. 1188-1213. Edited by A. Balows, H. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. Schleifer. New York: Springer-Verlag.
- Gutmann, M., Hoischen, C. & Krämer, R. (1992).** Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim Biophys Acta* **1112**, 115-123.
- Gutmann, M. (1993).** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J. & Kormanec, J. (2002).** The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol Lett* **216**, 77-84.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA-cloning*, pp. 109-135. Edited by G. D. M. Oxford/Washington DC: IRL-Press.
- Hatakeyama, K., Kohama, K., Vertes, A. A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. & Yukawa, H. (1993a).** Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the *bioA-bioD* genes from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* **4**, 177-184.
- Hatakeyama, K., Kohama, K., Vertes, A. A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. & Yukawa, H. (1993b).** Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the *bioA-bioD* genes from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* **4**, 174-177.
- Hermann, T. (2003).** Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**, 155-172.

Hirasawa, T., Wachi, M. & Nagai, K. (2001). L-Glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* *ItsA* mutant strains. *BMC Biotechnol* **1**, 9.

Hoischen, C. & Krämer, R. (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Archives of Microbiology* **151**, 342-347.

Hoischen, C. & Krämer, R. (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **172**, 3409-3416.

Ikeda, K. (2002). New seasonings. *Chem Senses* **27**, 847-849.

Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertes, A. A. & Yukawa, H. (2004). Metabolic Analysis of *Corynebacterium glutamicum* during Lactate and Succinate Productions under Oxygen Deprivation Conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**, 182-196.

Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V. F. & Sahm, H. (2003). The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol* **185**, 4519-4529.

Jäger, W., Peters-Wendisch, P. G., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1996). A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins. *Arch Microbiol* **166**, 76-82.

Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**, 403-405.

Jones, B. N. & Gilligan, J. P. (1983). o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr* **266**, 471-482.

Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D. & other authors (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**, 5-25.

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.

Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O. & Yanofsky, C. (2000). DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12170-12175.

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.

Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y., Nakamatsu, T. & Tokuda, H. (1997). A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and

efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 157-161.

Kimura, E. (2003). Metabolic engineering of glutamate production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**, 37-57.

Kimura, K., Yagoshi, C., Kawahara, Y., Ohsumi, T., Nakamatsu, T. & Tokuda, H. (1999). Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum* Triggered by a Decrease in the Level of a Complex Comprising DtsR and a Biotin-containing Subunit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**, 1274-1278.

Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**, 193-205.

Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1977). Means of terminating reactions. *Methods Enzymol*, 680-684.

Koo, S. P., Higgins, C. F. & Booth, I. R. (1991). Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J Gen Microbiol* **137**, 2617-2625.

Krämer, R. & Lambert, C. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur J Biochem* **194**, 937-944.

Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C. & Ebbighausen, H. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur J Biochem* **194**, 929-935.

Krämer, R., Boles, E., Eggeling, L., Erdmann, A., Gutmann, M., Kronmeyer, W., Palimeri, L. & Zittrich, S. (1994). Mechanism and energetics of amino-acid transport in coryneform bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1187**, 245-249.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 457-580.

Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H. & Eggeling, L. (1995). Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**, 1152-1158.

Krug, A., Wendisch, V. F. & Bott, M. (2005). Identification of AcnR, a TetR-type Repressor of the Aconitase Gene *acn* in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **280**, 585-595.

Labarre, J., Reyes, O., Guyonvarch, A. & Leblon, G. (1993). Gene replacement, integration, and amplification at the *gdhA* locus of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **175**, 1001-1007.

Lamark, T., Styrvold, O. B. & Strom, A. R. (1992). Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **75**, 149-154.

Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M. & Krämer, R. (1995). Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients. *Appl Environ Microbiol* **61**.

- 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.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994).** The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol Microbiol* **13**, 733-743.
- Lapujade, P., Coccagn-Bousquet, M. & Loubiere, P. (1998).** Glutamate Biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2485-2489.
- Lapujade, P., Goergen, J. L. & Engasser, J. M. (1999).** Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* **1**, 255-261.
- Lee, R. E., Brennan, P. J. & Besra, G. S. (1997).** Mycobacterial arabinan biosynthesis: the use of synthetic arabinoside acceptors in the development of an arabinosyl transfer assay. *Glycobiology* **7**, 1121-1128.
- 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.
- Lichtinger, T., Rieß, F. G., Burkovski, A., Engelbrecht, F., Hesse, D., Kratzin, H. D., Krämer, R. & Benz, R. (2001).** The low-molecular-mass subunit of the cell wall channel of the Gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. Immunological localization, cloning and sequencing of its gene *porA*. *Eur J Biochem*, 462-469.
- 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**, 1167-1174.
- 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.
- Malin, G. M., Bourd, G. I. J. A. B. & Marx A, d. G. A., Wiechert W, Eggeling L, and Sahm H. (1996) Determination (1991).** Phosphotransferase-dependent glucose transport in *Corynebacterium glutamicum*. *J Appl Bacteriol*, 517.
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F. R. & Smith, I. (1999).** Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 715-724.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K. & Smith, I. (2001).** The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* **41**, 423-437.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., Dubnau, E., Gomez, M. & Smith, I. (2002).** Role of the extracytoplasmic-function σ Factor σ^H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol*, 365-374.
- Marcyjaniak, M., Odintsov, S. G., Sabala, I. & Bochtler, M. (2004).** Peptidoglycan amidase MepA is a LAS metallopeptidase. *J Biol Chem* **279**, 43982-43989.

- Marienfeld, S., Uhlemann, E. M., Schmid, R., Krämer, R. & Burkovski, A. (1997).** Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**, 291-297.
- Martinac, B., Adler, J. & Kung, C. (1990).** Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* **348**, 261-263.
- Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahm, H. & Eggeling, L. (1997).** Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnology Bioengineering*, 168-180.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. & Sahm, H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl Environ Microbiol* **55**, 684-688.
- Mikusova, K., Slayden, R. A., Besra, G. S. & Brennan, P. J. (1995).** Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2484-2489.
- Minnikin, D. E., Dobson, G., Parlett, J. H., Goodfellow, M. & Magnusson, M. (1987).** Analysis of dimycocerosates of glycosylphenolphthiocerols in the identification of some clinically significant mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol* **6**, 703-707.
- Möker, N., Brocker, M., Schaffer, S., Krämer, R., Morbach, S. & Bott, M. (2004).** Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**, 420-438.
- Molinari, R. & Lara, F. J. (1960).** The lactic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum*. *Biochem J* **75**, 57-65.
- Molle, V., Kremer, L., Girard-Blanc, C., Besra, G. S., Cozzone, A. J. & Prost, J. F. (2003).** An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **42**, 15300-15309.
- Momose, H. & Takagi, T. (1978).** Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. *Agric Biol Chem*, 1911-1917.
- Morita, R. (1997).** *Bacteria in Oligotrophic Environments: Starvation Survival Lifestyle*. New York: Chapman & Hall.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. (2002).** Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587-593.
- Naclerio, G., Baccigalupi, L., Zilhao, R., De Felice, M. & Ricca, E. (1996).** *Bacillus subtilis* spore coat assembly requires *cotH* gene expression. *J Bacteriol* **178**, 4375-4380.
- Nampoothiri, K. M., Hoischen, C., Bathe, B., Mockel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H. & Eggeling, L. (2002).** Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 89-96.

- Nantapong, N., Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004).** Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**, 187-193.
- Nishio, Y., Nakamura, Y., Kawarabayasi, Y. & other authors (2003).** Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res* **13**, 1572-1579.
- Nottebrock, D., Meyer, U., Krämer, R. & Morbach, S. (2003).** Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 305-309.
- Nunez, M. F., Pellicer, M. T., Badia, J., Aguilar, J. & Baldoma, L. (2001).** The gene *yghK* linked to the *glc* operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease. *Microbiology* **147**, 1069-1077.
- Nunez, M. F., Kwon, O., Wilson, T. H., Aguilar, J., Baldoma, L. & Lin, E. C. (2002).** Transport of L-Lactate, D-Lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 824-829.
- Nunheimer, T. D., Birnbaum, J., Ihnen, E. D. & Demain, A. L. (1970).** Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl Microbiol* **20**, 215-217.
- O'Reilly, E. K. & Kreuzer, K. N. (2004).** Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 7149-7160.
- O'Toole, R., Smeulders, M. J., Blokpoel, M. C., Kay, E. J., Lougheed, K. & Williams, H. D. (2003).** A two-component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **185**, 1543-1554.
- O'Toole, R. & Williams, H. D. (2003).** Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **154**, 387-392.
- Palmieri, L., Berns, D., Krämer, R. & Eikmanns, B. (1996).** Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch Microbiol*, 48-54.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1998).** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1-34.
- Peter, H., Burkovski, A. & Krämer, R. (1998a).** Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **273**, 2567-2574.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Kramer, R. & Morbach, S. (1998b).** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* **180**, 6005-6012.
- Peters, J. E., Thate, T. E. & Craig, N. L. (2003).** Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol* **185**, 2017-2021.

- Peters-Wendisch, P. G., Kreutzer, C., Kalinowski, J., Patek, M., Sahn, H. & Eikmanns, B. J. (1998).** Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiology* **144** (Pt 4), 915-927.
- Peters-Wendisch, P. G., Schiel, B., Wendisch, V. F., Katsoulidis, E., Mockel, B., Sahn, 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*. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Polen, T., Rittmann, D., Wendisch, V. F. & Sahn, H. (2003).** DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1759-1774.
- Polen, T. & Wendisch, V. F. (2004).** Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 215-232.
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P. & Konings, W. N. (1991).** Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J Bacteriol* **173**, 6030-6037.
- Pritchard, G. G. (1971).** An NAD⁺-independent L-lactate dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*. *Biochim Biophys Acta* **250**, 25-34.
- Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G. & Daffe, M. (2000).** Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol Microbiol* **35**, 1026-1041.
- Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R. & Daffe, M. (2001).** Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**, 1365-1382.
- Putman, M., van Veen, H. W. & Konings, W. N. (2000).** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 672-693.
- Quail, M. A. & Guest, J. R. (1995).** Purification, characterization and mode of action of PdhR, the transcriptional repressor of the *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 519-529.
- Radmacher, E. (2004).** Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Radmacher, E., Stansen, K. C., Besra, G. S., Alderwick, L. J., Maughan, W. N., Hollweg, G., Sahn, H., Wendisch, V. F. & Eggeling, L. (2005).** Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*.
- Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R., Jr. & Husson, R. N. (2001).** The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol Rev*, 6119-6125.

- 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.
- Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2002).** Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in *Eubacteria* and *Archaea*. *Genome Res* **12**, 1507-1516.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V. F. & Krämer, R. (1997).** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur J Biochem* **247**, 572-580.
- Saier, M. H., Jr. (2000).** A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 354-411.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: 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.
- Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972).** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**, 407-477.
- Schluesener, D., Fischer, F., Kruij, J., Rogner, M. & Poetsch, A. (2005).** Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **5**, 1317-30.
- Schmidt, K. L., Peterson, N. D., Kustus, R. J., Wissel, M. C., Graham, B., Phillips, G. J. & Weiss, D. S. (2004).** A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 785-793.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 566-571.
- Schwarzer, A. & Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N Y)* **9**, 84-87.
- Seep-Feldhaus, A. H., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1991).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysI* gene involved in lysine uptake. *Mol Microbiol* **5**, 2995-3005.
- Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F. & Yokota, A. (2001).** H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**, 534-540.

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.

Shaw, K. J., Miller, N., Liu, X., Lerner, D., Wan, J., Bittner, A. & Morrow, B. J. (2003). Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**, 105-122.

Sheetz, M. P. & Singer, S. J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4457-4461.

Shiio, I., Otsuka, S. I. & Katsuya, N. (1962). Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. II. Metabolism of glucose. *J Biochem (Tokyo)* **52**, 108-116.

Shiio, I., Ôtsuka, S. I. & Katsuya, N. (1963). Cellular Permeability and Extracellular Formation of Glutamic Acid in *Brevibacterium flavum*. *The Journal of Biochemistry* **53**, 333-340.

Simic, P., Willuhn, J., Sahm, H. & Eggeling, L. (2002). Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3321-3327.

Sindelar, G. (2003). Globale Expressionsanalysen zur Charakterisierung der Lysin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. (1997). Proposal of a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 479-491.

Styrvoid, O. B. & Ström, A. R. (1991). Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J Bacteriol* **173**, 1187-1192.

Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R. & Kung, C. (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature*, 265– 268.

Sung, H. C., Tachiki, T., Kumagai, H. & Tochikura, T. (1984). Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium glutamicum*. *J Ferment Technol*, 371-376.

Sutcliffe, I. C. (1997). Macroamphiphilic cell envelope components of *Rhodococcus equi* and closely related bacteria. *Vet Microbiol* **56**, 287-299.

Takinami, K., Yoshii, H., Yamada, Y., Okada, H. & Kinoshita, K. (1968). Control of L-Glutamic Acid Fermentation by Biotin and Fatty Acid. *Amino Acid and Nucleic Acid Research* **183**, 120-160.

Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Gotker, S., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2002). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**, 362-367.

Thomas, J. P., Baughn, C. O., Wilkinson, R. G. & Shepherd, R. G. (1961). A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-l-butanol). *Am Rev Respir Dis* **83**, 891-893.

Tindall, K. R. & Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**, 6008-6013.

Trötschel, C., Kandirali, S., Diaz-Achirica, P., Meinhardt, A., Morbach, S., Krämer, R. & Burkovski, A. (2003). GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 738-742.

Udaka, S. (1960). Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *J Bacteriol* **79**, 745-755.

Uy, D., Delaunay, S., Germain, P., Engasser, J. M. & Goergen, J. L. (2003). Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J Biotechnol* **104**, 173-184.

van der Heide, T., Stuart, M. C. & Poolman, B. (2001). On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *Embo J* **20**, 7022-7032.

Von der Osten, C. H., Gioannetti, C. & Sinskey, A. J. (1989). Design for a defined medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol Lett*, 11-16.

Vrljic, M., Sahm, H. & Eggeling, L. (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **22**, 815-826.

Waddell, S. J., Stabler, R. A., Laing, K., Kremer, L., Reynolds, R. C. & Besra, G. S. (2004). The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *Mycobacterium tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds. *Tuberculosis (Edinb)* **84**, 263-274.

Walsh, C. T. (1989). Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J Biol Chem*, 2393-2396.

Wang, X., Bogdanov, M. & Dowhan, W. (2002). Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. *Embo J* **21**, 5673-5681.

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.

Wendisch, V. F. (2003). Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* **104**, 273-285.

Winnen, B., Felce, J. & Saier, M. H. J. (2005). Genomic analyses of transporter proteins in *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebacterium efficiens*. In *Handbook on Corynebacterium glutamicum*. Edited by L. Eggeling & M. Bott. Boca Raton, USA: CRC Press.

Xia, Z. X. & Mathews, F. S. (1990). Molecular structure of flavocytochrome b2 at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **212**, 837-863.

Zhang, N., Torrelles, J. B., McNeil, M. R., Escuyer, V. E., Khoo, K. H., Brennan, P. J. & Chatterjee, D. (2003a). The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol Microbiol* **50**, 69-76.

Zhang, W., Bogdanov, M., Pi, J., Pittard, A. J. & Dowhan, W. (2003b). Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition. *J Biol Chem* **278**, 50128-50135.

Zilhao, R., Naclerio, G., Henriques, A. O., Baccigalupi, L., Moran, C. P., Jr. & Ricca, E. (1999). Assembly requirements and role of CotH during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 2631-2633.

Zilhao, R., Serrano, M., Isticato, R., Ricca, E., Moran, C. P., Jr. & Henriques, A. O. (2004). Interactions among CotB, CotG, and CotH during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* **186**, 1110-1119.

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.

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

VII. ANHANG

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle A1: Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Wachstum in An- und Abwesenheit von L-Glutamat.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	+ Glutamat ⁴	
			- Glutamat	
(1955855-1956103)	1952	hypothetisches Protein	0,5	
(3160237-3160608)	362	hypothetisches Protein	0,5	
(511085-511201)	979	hypothetisches Protein	0,5	
NCgl0142	540	putative 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase I	0,5	
NCgl0170	3774	hypothetisches Protein	0,5	
NCgl0234	641	3,4-Dioxygenase, beta-Untereinheit	0,5	
NCgl0369	842	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter-Superfamilie	0,5	
NCgl0457	961	putative Proteintranslokase	0,4	
NCgl0523	1029	Betalinaldehyd-Dehydrogenase/Oxidoreduktase	0,4	
NCgl0939	1553	Threonin-Dehydratase	0,5	
NCgl1109	1744	ATP-abhängige RNA-Helikase	0,5	
NCgl1709	3784	hypothetisches Protein	0,5	
NCgl1894	2065	hypothetisches Protein	0,5	
NCgl2268	3065	putative Fructose-2,6-bisphosphatase	0,4	
NCgl2316	3721	hypothetisches Protein	0,4	
NCgl2811	307	putatives Membranprotein	0,4	
NCgl2862	377	Zwei-Komponenten-System, Kinase	0,4	

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A2: Ergänzung zu Tabelle 4. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter Biotin-Mangel (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	Biotin – Mangel ⁴	
			Biotin – Überschuss	
NCgl0095	479	hypothetisches Protein	0,5	
NCgl0520	1024	ribosomales Protein L15 (<i>rpI</i> O)	0,4	
NCgl2820	317	hypothetisches Protein	0,5	
NCgl2866	383	Thioldisulfid-Isomerase oder Thioredoxin	0,4	
(2996809-2997021)	190	hypothetisches Protein	2,0	

Tabelle A2 (ff): Ergänzung zu Tabelle 4. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter Biotin-Mangel (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	Biotin – Mangel ⁴	
			Biotin – Mangel	Biotin – Überschuss
(3470325-3470678)	3093	hypothetisches Protein		2,5
NCgl0963	1583 1584	Na ⁺ /Prolin-, Na ⁺ /Panthothenat-Symporter		2,1
NCgl1025	1648	ADP-Ribose-Pyrophosphatase		2,1
NCgl1885	2050	putative Permease (Kobalt-Permease-Unterfamilie)		2,0
NCgl2034	2241	Mar-ähnlicher Regulator		2,0
NCgl2513	2836	SAM-abhängige Methyltransferase		2,2

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A3: Ergänzung zu Tabelle 5. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 in Anwesenheit von Ethambutol (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	+ Ethambutol ⁴	
			+ Ethambutol	- Ethambutol
(1609842-1610192)	2406	hypothetisches Protein		0,5
(1793483-1793644)	2801	hypothetisches Protein		0,5
(2888165-2888362)	66	hypothetisches Protein		0,5
NCgl0245	662	2-Isopropylmalat-Synthase (<i>leuA</i>)		0,5
NCgl0275	701	putatives regulatorisches Protein (<i>whiB4</i>)		0,5
NCgl0360	831	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein(<i>sdhA</i>)		0,5
NCgl0377	854	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein		0,4
NCgl0489	3775	ribosomales Protein L23 (<i>rplD</i>)		0,5
NCgl0491	3777	ribosomales Protein S19 (<i>rpsS</i>)		0,5
NCgl0492	3778	ribosomales Protein L22 (<i>rplV</i>)		0,5
NCgl0493	992	ribosomales Protein S3 (<i>rpsC</i>)		0,5
NCgl0495	994	ribosomales Protein L29 (<i>rpmC</i>)		0,5
NCgl0510	1011	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, ATPase		0,4
NCgl0512	1013	sekretierte Oxidoreduktase		0,4
NCgl0516	1018	ribosomales Protein L6 (<i>rplF</i>)		0,5
NCgl0774	1347	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein		0,4
NCgl0795	1377	Citrat-Synthase (<i>gltA</i>)		0,5
NCgl0798	1381	integrales Membranprotein		0,5
NCgl0856	1451	Glycinbetain-Transporter (<i>betP</i>)		0,5
NCgl1160	1808	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpE</i>)		0,5
NCgl1162	1810	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpH</i>)		0,5

Tabelle A3 (ff): Ergänzung zu Tabelle 5. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 in Anwesenheit von Ethambutol (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<u>+ Ethambutol</u> ⁴ <u>- Ethambutol</u>
NCgl1163	1811	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpA</i>)	0,5
NCgl1170	1818	putative Methylmalonyl-CoA-Epimerase	0,5
NCgl1337	2632	putative sekretierte Hydrolase	0,5
NCgl1368	2596	Acetyltransferase	0,4
NCgl1589	3267	putatives Membranprotein	0,5
NCgl1610	66235	hypothetisches Protein	0,5
NCgl1626	3620	Pantothenatmetabolismus, Flavoprotein	0,4
NCgl1876	2041	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein (<i>gluB</i>)	0,4
NCgl1929	2111	putatives sekretiertes oder Membranprotein	0,5
NCgl1930	2112	putatives sekretiertes oder Membranprotein	0,5
NCgl2111	2334	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>qcrC</i>)	0,5
NCgl2115	65535	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>ctaC</i>)	0,5
NCgl2119	3687	Cobinamid-Kinase/Cobinamidphosphat-Guanylyltransferase	0,4
NCgl2434	3480	hypothetisches Protein	0,4
NCgl2480	2881	Succinyl-CoA:Acetat-Coenzyme A-Transferase (<i>actA</i>)	0,4
NCgl2553	69134	Phosphotransferase-System, Untereinheit IIC (<i>ptsS</i>)	0,4
NCgl2632	90	Acetyl-CoA-Acetyltransferase	0,5
NCgl2787	281	Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO)	0,4
NCgl2961	3444	Prolin-/Ectoin-Carrier (<i>proP</i>)	0,4
NCgl0383	858 3547	hypothetisches Protein	2,5
NCgl0394	878	ABC-Transportsystem, Permease	2,2
NCgl0768	1337	ATP-bindendes Protein der Zellteilung (<i>ftsE</i>)	2,0
NCgl0785	1362	Rpf-Protein-Vorstufe (<i>rpf1</i>)	2,0
NCgl0841	1431	Trypsin-ähnliche Serin-Protease	2,0
NCgl0928	1541	putative Esterase	2,1
NCgl1174	1822	aliphatisches Sulfonat-ABC-Transportsystem (<i>ssuC</i>)	2,2
NCgl2033	2240	ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	2,1
NCgl2034	2241	Mar-ähnlicher Regulator	2,2
NCgl2805	299	putatives sekretiertes Protein	2,3
NCgl2912	1898	putatives sekretiertes Protein	2,0

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A4: Ergänzung zu Tabelle 6. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 25 h nach Zugabe von Ethambutol (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	0h	2h	4h	6h	8h	10h	15 h	25 h
NCgl0076	456	hypothetisches Protein	0,7	1,6	1,6	2,4	3,0*	3,1	n.a.	3,0
NCgl0359	830	Succinat-Dehydrogenase, Membrananker (sdhC)	1,1	1,1	0,8	0,6	0,8	*0,5	*0,4	0,6
NCgl0383	858 3547	hypothetisches Protein	1,0	1,5	2,3	*2,8	*2,4	*2,4	*13	1,3
NCgl0509	1010	putatives Membranprotein	1,1	*0,6	*0,5	*0,4	*0,5	*0,5	3,0	2,2
NCgl0785	1362	Rpf-Protein-Vorstufe (rpf1)	1,0	2,3	1,7	*2,0	*1,9	*2,6	*4,8	4,2
NCgl0841	1431	Trypsin-ähnliche Serin-Protease	0,7	1,3	2,7	*3,2	2,5	24,5	1,0	0,4
NCgl0888	1491	Demethylmenaquinone-Methyltransferase	1,1	1,4	1,7	2,1	*5,8	5,1	1,0	2,0
NCgl0933	1546	anionen-spezifische Porin-Vorstufe	1,1	1,6	1,7	*2,8	*9,4	4,7	1,4	7,3
NCgl1368	2596	Acetyltransferase	1,0	0,6	*0,4	*0,4	*0,9	2,0	*3,7	2,0
NCgl1589	3267	putatives Membranprotein	1,0	0,8	0,5	*0,4	*0,5	*0,4	*0,3	0,2
NCgl1624	3617	putative ABC transporter, Permease	1,0	0,9	0,7	0,7	0,6	*0,5	*0,3	0,2
NCgl1626	3620	Pantothenatmetabolismus, Flavoprotein	1,0	0,7	0,4	*0,3	0,4	*0,2	1,0	0,6
NCgl1876	2041	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein (gluB)	1,0	0,6	*0,5	*0,5	0,9	0,8	*1,1	1,0
NCgl1916	2094	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	1,1	0,6	*0,5	*0,4	0,5	0,6	1,0	1,1
NCgl1917	2095	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	1,2	0,7	0,4	*0,3	0,4	0,6	1,0	1,0
NCgl2027	2233	SAM-abhängige Methyltransferase	0,5	*0,7	1,0	1,7	1,4	1,2	1,1	1,4
NCgl2031	2238	putative ABC uptake system, ATPase	0,5	*0,7	0,9	0,9	0,8	0,7	0,9	1,1
NCgl2108	2329 2330	Zellwand-assoziierte Hydrolase	0,9	2,1	*2,0	2,0	*2,1	*2,0	*4,6	6,7
NCgl2119	3687	Cobinamid-Kinase/Cobinamidphosphat-Guanylyltransferase	1,1	0,8	0,4	*0,3	0,3	0,2	0,1	0,1
NCgl2517	2832	Zwei-Komponenten-System, Kinase (phoS)	0,9	*1,5	1,9	*2,0	*2,6	1,7	*1,0	0,8

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A5: Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Zugabe von Penicillin G.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<u>+ Penicillin</u> ⁴ <u>- Penicillin</u>
NCgl0159	560	putative Acetolactat-Synthase	0,5
NCgl0377	854	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein	0,5
NCgl0382	3544	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein	0,4
NCgl0429	926	Translationsinhibitor, YjgF-Familie	0,5
NCgl0483	3550	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Permease	0,5
NCgl0510	1011	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, ATPase	0,5
NCgl0511	1012	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, Permease	0,4
NCgl0512	1013	hypothetisches Membranprotein	0,5
NCgl0639	1173	putatives Eisen-reguliertes Lipoprotein	0,5
NCgl0798	1381	integral Membranprotein	0,5
NCgl1625	3618	hypothetisches Protein	0,5
NCgl1626	3619 3620	Pantothenatmetabolismus, Flavoprotein	0,5
NCgl1646	3347	putative sekretierte Hydrolase	0,4
NCgl2439	3472	Nichthäm-Ferritin	0,4
NCgl2970	3458	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	0,4
NCgl0933	1546	anionen-spezifische Porin-Vorstufe	2,0
NCgl1383	2578	Hydrolase der alpha/beta-Superfamilie	2,2
NCgl2560	3742	Neuraminidase	2,7

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A6: Ergänzung zu Tabelle 7. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Zugabe von Tween40 (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<u>+ Tween40</u> ⁴ <u>- Tween40</u>
(1340543-1340725)	2791	hypothetisches Protein	0,5
(1564146-1564469)	2360	hypothetisches Protein	0,5
(1609842-1610192)	2406	hypothetisches Protein	0,4
(1793483-1793644)	2801	hypothetisches Protein	0,5
(1812016-1812174)	3349	hypothetisches Protein	0,5
(2888165-2888362)	66	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0360	831	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein (<i>sdhA</i>)	0,4
NCgl0361	832	Succinat-Dehydrogenase, Fe-S-Protein (<i>sdhB</i>)	0,5

Tabelle A6 (ff): Ergänzung zu Tabelle 7. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Zugabe von Tween40 (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	+ Tween40 ⁴	
				- Tween40
NCgl0377	854	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein		0,4
NCgl0381	3543	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein		0,4
NCgl0382	3544	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein		0,4
NCgl0410	902	hypothetisches Protein		0,5
NCgl0445	944	niederaffiner P _i -Transporter (<i>pitA</i>)		0,5
NCgl0481	3548	hypothetisches Protein		0,4
NCgl0482	3549	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase		0,4
NCgl0483	3550	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Permease		0,4
NCgl0484	3551	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem		0,5
NCgl0486	3776	ribosomales Protein S10 (<i>rpsJ</i>)		0,4
NCgl0490	3555	ribosomales Protein L2 (<i>rplB</i>)		0,4
NCgl0491	3777	ribosomales Protein S19 (<i>rpsS</i>)		0,4
NCgl0492	3778	ribosomales Protein L22 (<i>rplV</i>)		0,4
NCgl0494	993	ribosomales Protein L16 (<i>rplP</i>)		0,4
NCgl0495	994	ribosomales Protein L29 (<i>rpmC</i>)		0,4
NCgl0500	1000	ribosomales Protein L24 (<i>rplX</i>)		0,5
NCgl0510	1011	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, ATPase		0,4
NCgl0511	1012	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, Permease		0,4
NCgl0512	1013	sekretierte Oxidoreduktase		0,4
NCgl0517	1020	ribosomales Protein L18 (<i>rplR</i>)		0,5
NCgl0518	1022	ribosomales Protein S5 (<i>rpsE</i>)		0,5
NCgl0520	1024	ribosomales Protein L15 (<i>rplO</i>)		0,5
NCgl0537	1045	fragwürdiger ORF		0,4
NCgl0538	1047	ribosomales Protein S11 (<i>rpsK</i>)		0,5
NCgl0539	1048	ribosomales Protein S4 (<i>rpsD</i>)		0,4
NCgl0541	1050	ribosomales Protein L17 (<i>rplQ</i>)		0,4
NCgl0636	1169	putatives Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase		0,5
NCgl0644	1179	putatives Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase		0,5
NCgl0670	1211	Acetyl-CoA-Carboxylase (<i>accBC</i>)		0,4
NCgl0678	1223	AccD1-Protein (<i>accD1</i>)		0,5
NCgl0760	1325	sekretiertes Antigen (<i>psp2</i>)		0,5
NCgl0773	1346	putatives Protein mit Siderophor-Interaktion		0,5
NCgl0778	1351	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Permease		0,5
NCgl0779	1352	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase		0,5
NCgl0798	1381	putatives integrales Membranprotein		0,5

Tabelle A6 (ff): Ergänzung zu Tabelle 7. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Zugabe von Tween40 (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	+ Tween40 ⁴	
				- Tween40
NCgl0834	1421	ribosomales Protein L28 (<i>rpmB</i>)		0,5
NCgl1131	1774	putative sekretierte Hydrolase		0,4
NCgl1170	1818	putative Methylmalonyl-CoA-Mutase, beta-Untereinheit		0,4
NCgl1263	2736	3-Isopropylmalat-Dehydratase, kleine Untereinheit (<i>leuD</i>)		0,4
NCgl1288	2705	putatives sekretiertes Protein		0,5
NCgl1289	2703	putatives sekretiertes Protein		0,5
NCgl1290	2699	hypothetisches Protein		0,5
NCgl1305	2672	fragwürdiger ORF		0,4
NCgl1337	2632	putative sekretierte Hydrolase		0,5
NCgl1471	2410	Methylmalonyl-CoA-Mutase, große Untereinheit (<i>mcmB</i>)		0,4
NCgl1472	2411	Methylmalonyl-CoA-Mutase, kleine Untereinheit (<i>mcmA</i>)		0,5
NCgl1490	2436	putatives Membranprotein		0,4
NCgl1588	3268	putatives sekretiertes Protein		0,4
NCgl1609	3599	konserviertes hypothetisches Protein		0,5
NCgl1610	66235	hypothetisches Protein		0,5
NCgl1626	3619 3620	Pantothenatmetabolismus, Flavoprotein		0,4
NCgl1656	3359	hypothetisches Protein		0,5
NCgl1766	3676	putatives sekretiertes Protein		0,5
NCgl1834	1986	Myoinositol-1/4-Monophosphatase (<i>suhB</i>)		0,5
NCgl1860	2020	Phosphofruktokinase (<i>pfkB</i>)		0,4
NCgl1876	2041	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein (<i>gluB</i>)		0,5
NCgl2139	3232	Threonin-Synthase (<i>thrC</i>)		0,5
NCgl2373	2998	Zucker-Permease		0,4
NCgl2376	3002	fragwürdiger ORF		0,5
NCgl2377	3004	putatives Zucker-ABC-Transportsystem , ATP-bindendes Protein		0,4
NCgl2504	2850	hypothetisches Protein		0,4
NCgl2539	2809	putatives Mangan-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein		0,5
NCgl2930	1918	Indol-3-glycerolphosphat-Synthase/ Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (<i>trpCF</i>)		0,5
NCgl2931	1919	Tryptophan-Synthase, beta-Untereinheit (<i>trpB</i>)		0,5
NCgl2932	1920	Tryptophan-Synthase, alpha-Untereinheit (<i>trpA</i>)		0,5
(1366244- 1366244)	2754	hypothetisches Protein		2,7
(1372415- 1372723)	2745	hypothetisches Protein		2,5
NCgl0060	435	Magnesium-Transportprotein		2,0

Tabelle A6 (ff): Ergänzung zu Tabelle 7. Veränderung der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Zugabe von Tween40 (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	+ Tween40 ⁴	
			- Tween40	
NCgl0383	858	hypothetisches Protein	2,5	
NCgl0623	1152	putatives sekretiertes Protein	2,4	
NCgl0689	1235	Dehydrogenase, N-terminales Fragment	2,0	
NCgl0689	1236	Dehydrogenase, N-terminales Fragment	2,2	
NCgl0725	1281	Ribosomen-assoziiertes Protein Y	2,2	
NCgl0917	1527	hypothetisches Protein	2,7	
NCgl0944	1559	Permease, Uniporter-Symporter-Antiporter-Superfamilie	2,2	
NCgl0966	1586	hypothetisches Protein	2,0	
NCgl0985	1605	fragwürdiger ORF	2,0	
NCgl0986				
NCgl1075	1703	Sigma-Faktor E (<i>sigE</i>)	2,1	
NCgl1077	1705	konserviertes hypothetisches Protein	2,0	
NCgl1249	2756	konserviertes hypothetisches Protein	2,2	
NCgl1251	2750	putatives ATP/GTP-Bindeprotein	2,8	
NCgl1252	2749	konserviertes hypothetisches Protein	2,7	
NCgl1254	2744	hypothetisches Protein	2,2	
NCgl1316	2659	universelles Stressprotein (<i>uspA1</i>)	2,0	
NCgl1382	2579	konserviertes hypothetisches Protein	2,0	
NCgl1485	2428	putative Nucleosiddiphosphat-Zucker-Epimerase	2,0	
NCgl1578	2548 3578	Transkriptionsregulator, tetR-Familie	2,5	
NCgl1844	2000	Sigma-Faktor B (<i>sigB</i>)	2,0	
NCgl2034	2241	putativer Transkriptionsregulator	2,3	
NCgl2327	2935	ATP-abhängige Clp-Protease, proteolytische Untereinheit 2 (<i>clpP2</i>)	2,3	
NCgl2328	2936	ATP-abhängige Clp-Protease, proteolytische Untereinheit 1 (<i>clpP1</i>)	2,3	
NCgl2352	2969	putatives Dipeptid-/Oligopeptid-/Nickel-ABC-Transportsystem, Permease	2,0	
NCgl2360	2978	Cystathionin-gamma-Synthase (<i>metB</i>)	2,0	
NCgl2517	2832	Zwei-Komponenten-System, Kinase (<i>phoS</i>)	2,7	
NCgl2713	193	putatives Transportprotein	2,4	
NCgl2715	195	Sulfat-Adenylyltransferase, große Untereinheit (<i>cysN</i>)	2,4	
NCgl2803	297	putatives sekretiertes Protein	2,8	
NCgl2805	299	putatives sekretiertes Protein	2,8	
NCgl2839	341	Sporulationsprotein	2,3	
NCgl2912	1898	putatives Membranprotein	2,0	

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A7: Gene mit signifikant erhöhten (≥ 2) oder gesenkten ($\leq 0,5$) DNA-Verhältnissen beim Vergleich der Genome von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 2262.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<i>C. glutamicum</i> 2262 ⁴
			<i>C. glutamicum</i> 13032
NCgl0105	495	Transkriptionsregulator, DeoR-Familie	0,5
NCgl0122	517	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0124	519	hypothetisches Membranprotein	0,4
NCgl0170	3774	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0267	690	hypothetisches Protein	0,4
NCgl0347	804	Glycosyltransferase der Zellwand-Synthese	0,3
NCgl0348	809	ISCg17	0,1
NCgl0349	812	hypothetisches Membranprotein	0,3
NCgl0354	823	Acetyltransferase	0,3
NCgl0632	1165	Transkriptionsregulator, GntR-Familie	0,5
NCgl0671	1212	Thiosulfat-Sulphurtransferase (<i>thtR</i>)	0,5
NCgl0673	1215	hypothetisches Protein	0,4
NCgl0674	1217	putative Acyltransferase (<i>wbpC</i>)	0,4
NCgl0675	1218 1219	Nukleotid-bindendes Protein	0,5
NCgl0677	1221 1222	AccD2-Protein (<i>dtsR2</i>)	0,5
NCgl0678	1223	AccD1-Protein (<i>accD1</i>)	0,5
NCgl0679	1224	Biotin-(Acetyl-CoA-Carboxylase)-Ligase (<i>birA</i>)	0,5
NCgl0680	1225	hypothetisches Membranprotein	0,5
NCgl0681	1226	putative Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, ATPase (<i>purK</i>)	0,4
NCgl0682	1227	K ⁺ -Transporter (<i>kup</i>)	0,4
NCgl0684	1230	putative Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, katalytische Untereinheit (<i>purE</i>)	0,4
NCgl0686	1232	hypothetisches Protein	0,4
NCgl0687	1233	Nitrilotriacetat-Monooxygenase (<i>ntaA</i>)	0,4
NCgl0688	1234 2806	ISCg5b	0,4
NCgl0689	1235	Dehydrogenase, N-terminales Fragment	0,4
NCgl0690	1238	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0691	1239	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0693	1241	hypothetisches Membranprotein	0,5
NCgl0694	1242	putatives Zucker-ABC-Transportsystem, Permease	0,5
NCgl0695	1243	putatives Zucker-ABC-Transportsystem, Permease	0,5
NCgl0696	1244	hypothetisches Protein	0,4

Tabelle A7 (ff): Gene mit signifikant erhöhten (≥ 2) oder gesenkten ($\leq 0,5$) DNA-Verhältnissen beim Vergleich der Genome von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 2262.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<i>C. glutamicum</i> 2262 ⁴
			<i>C. glutamicum</i> 13032
NCgl0697	1245	extrazelluläres Solut-Bindeprotein	0,5
NCgl0701	1250	hypothetisches Protein	0,1
NCgl0702	1252	hypothetisches Protein	0,3
NCgl0939	1553	Threonin-Dehydratase (<i>tdcB</i>)	0,3
NCgl0978	1598	hypothetisches Membranprotein	0,3
NCgl1001	1621	hypothetisches Protein	0,5
NCgl1003	1623	Aldo-/Keto-Reduktase	0,5
NCgl1021	1091	ISCg1a	0,4
	1644		
	3021		
NCgl1134	1779	hypothetisches Protein	0,4
NCgl1463	2399	hypothetisches Protein	0,4
NCgl1518	2476	ISCg13a	0,4
NCgl1611	3604	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1617	3613	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1626	3619	Pantothenatmetabolismus, Flavoprotein	0,2
NCgl1627	3621	hypothetisches Protein	0,3
NCgl1633	3626	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1644	3342	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1646	3347	putative sekretierte Hydrolase	0,2
NCgl1649	3352	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1664	3370	ISCg23	0,3
NCgl1670	3385	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1675	3390	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1679	3397	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1683	3401	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1685	3404	hypothetisches Membranprotein	0,2
NCgl1688	3409	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1689	3410	ATPase mit Chaperon-Aktivität, ATP-bindende Untereinheit	0,2
NCgl1692	3413	hypothetische Helikase	0,2
NCgl1693	3415	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1705	3250	Stress-sensitives Restriktionssystem	0,5
NCgl1708	3428	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1708	3628	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1711	3629	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1713	3632	hypothetisches Protein	0,2

Tabelle A7 (ff): Gene mit signifikant erhöhten (≥ 2) oder gesenkten ($\leq 0,5$) DNA-Verhältnissen beim Vergleich der Genome von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 2262.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<i>C. glutamicum</i> 2262 ⁴
			<i>C. glutamicum</i> 13032
NCgl1715	3635	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1718	3639	hypothetisches Membranprotein	0,1
NCgl1720	3642	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1721	3643 3644	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1726	3650	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1736	3657	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1737	3659	hypothetisches Membranprotein	0,1
NCgl1746	3664	hypothetisches Protein	0,3
NCgl1747	3665	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1748	3666	periplasmatische Serinprotease	0,2
NCgl1749	3667	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1752	3670	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1753	3671	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1754	3672	hypothetisches Protein	0,1
NCgl1760	3674	hypothetisches Membranprotein	0,1
NCgl1761	3675	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1766	3676	putatives sekretiertes Protein	0,2
NCgl1767	3678	hypothetisches Protein	0,2
NCgl1771	1956	nicht charakterisiertes Protein	0,5
NCgl1807	132	ISCg8	0,3
NCgl2361	2979	putatives Eisen-ABC-Transportsystem, ATPase	0,4
NCgl2378	3006	Glycosyltransferase (<i>int3</i>)	0,4
NCgl2380	3007	Transkriptionsregulator	0,5
NCgl2407	3514	hypothetisches Membranprotein	0,5
NCgl2408	3513	hypothetisches Protein	0,4
NCgl2451	2919	hypothetisches Protein	0,4
NCgl2457	2912	ISCg21	0,5
NCgl2458	2910	putatives sekretiertes Protein	0,4
NCgl2664	131	hypothetisches Membranprotein	0,2
NCgl2667	134	Zwei-Komponenten-System, Kinase	0,2
NCgl2689	160	Transkriptionsregulator	0,3
NCgl2694	166	putative 2-Polyprenylphenol-Hydroxylase	0,4
NCgl2705	179	hypothetisches Protein	0,5
NCgl2706	181 182	hypothetisches Protein	0,3
NCgl2720	201	hypothetisches Protein	0,5

Tabelle A7 (ff): Gene mit signifikant erhöhten (≥ 2) oder gesenkten ($\leq 0,5$) DNA-Verhältnissen beim Vergleich der Genome von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* 2262.

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	$\frac{C. glutamicum 2262}{C. glutamicum 13032}$ ⁴
NCgl2907	1892	hypothetisches Membranprotein	0,2
NCgl2965	3452	hypothetisches Membranprotein	0,2
NCgl2966	3453	putative Hydroxymethylpyrimidin-/Phosphomethylpyrimidin-Kinase	0,3
NCgl2969	3456	Prolin-/Ectoin-Carrier	0,4
NCgl0919	2447	ISCg3a	2,0
NCgl2418	3494 3500	putative Transposase	2,2
NCgl0995	1617	hypothetisches Membranprotein	4,0

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A8: Ergänzung zu Tabelle 8. Vergleich der Genexpression von *C. glutamicum* 2262 und der nicht-produzierenden Mutante 2226-NP nach Temperaturschock (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	$\frac{2262 - P}{2262 - NP}$ ⁴
(442531-442695)	895	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0482	3549	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase	0,5
NCgl0630	1162	Methylcitrat-Synthase (<i>prpC2</i>)	2,4
NCgl0802	1388	Fettsäure-Synthase	2,2
NCgl0960	1579	Allophanat-Hydrolase, Untereinheit 2	2,1
NCgl0962	1582	Protein B der Lactam-Verwertung	2,4
NCgl0963	1583 1584	Na ⁺ /Prolin-, Na ⁺ /Panthothenat-Symporter	2,7
NCgl1915	2092	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	2,4
NCgl2819	316	putativer Transkriptionsregulator	2,2

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

Tabelle A9: Ergänzung zu Tabelle 12. Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	$\frac{L - Lactat}{Pyruvat}$ ⁴
(2165352-2165582)	2168	hypothetisches Protein	0,5
(436432-436641)	886	hypothetisches Protein	0,5

Tabelle A9 (ff): Ergänzung zu Tabelle 12. Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	L-Lactat ⁴ Pyruvat
NCgl0017	3311	Typ C-Cytochrom-Biosyntheseprotein	0,5
NCgl0361	832 833	Succinat-Dehydrogenase, Fe-S-Protein (<i>sdhB</i>)	0,4
NCgl0412	905	putatives Eisen-ABC-Transportsystem, Permease	0,4
NCgl0413	906	periplasmatisches Eisen-Bindeprotein	0,5
NCgl0414	909	Uroporphyrinogen-III-Synthase	0,5
NCgl0440	937	putative Serinprotease	0,5
NCgl0445	944	niederaffiner P _i -Transporter (<i>pitA</i>)	0,5
NCgl0468	976	ribosomales Protein L10 (<i>rplJ</i>)	0,5
NCgl0509	1010	putatives Membranprotein	0,5
NCgl0510	1011	putatives Kobalt-ABC-Transportsystem, ATPase	0,5
NCgl0627	1160	Methylnitritase (<i>prpD2</i>)	0,4
NCgl0630	1162	Methylcitrat-Synthase (<i>prpC2</i>)	0,4
NCgl0670	1211	Acetyl-CoA-Carboxylase (<i>accBC</i>)	0,5
NCgl0694	1242	putatives Zucker-ABC-Aufnahmesystem, Permease	0,5
NCgl0695	1243	putatives Zucker-ABC-Aufnahmesystem, Permease	0,5
NCgl0696	1244	hypothetisches Protein	0,5
NCgl0706	1258	hypothetisches Protein	0,4
NCgl0709	1261	Rhamnosyl-Transferase	0,5
NCgl0786	1365	Kälteschock-Protein	0,5
NCgl0835	1424	Sulfat-Permease oder verwandter Transporter der Uniporter-Symporter-Antiporter-Superfamilie	0,5
NCgl0836	1425	Transkriptionsregulator, ArsR-Familie	0,5
NCgl0838	1428	ribosomales Protein L32 (<i>rpmF</i>)	0,5
NCgl0988	1608	GTP-Bindeprotein	0,5
NCgl1062	1688	Permease aromatischer Aminosäuren (<i>aroP</i>)	0,5
NCgl1094	1722	Homocystein-Methyltransferase (<i>metE</i>)	0,4
NCgl1132	1775	Arginyl-tRNA-Synthetase (<i>argS</i>)	0,5
NCgl1139	1783	Nitrat-Reduktase, gamma-Untereinheit (<i>narI</i>)	0,5
NCgl1140	1784	Nitrat-Reduktase, delta-Untereinheit (<i>narJ</i>)	0,5
NCgl1141	1785	Nitrat-Reduktase, beta-Untereinheit (<i>narH</i>)	0,5
NCgl1142	1786	Nitrat-Reduktase, alpha-Untereinheit (<i>narG</i>)	0,4
NCgl1143	1787 1788	putatives Nitrat/Nitrit-Transportsystem (<i>narK</i>)	0,5
NCgl1149	1795	Molybdopterin-Biosyntheseprotein (<i>moeA3</i>)	0,5
NCgl1159	1807	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (<i>atpB</i>)	0,5

Tabelle A9 (ff): Ergänzung zu Tabelle 12. Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	L - Lactat ⁴ Pyruvat
NCgl1168	1816	putative Integrase	0,5
NCgl1169	1817	hypothetisches Protein	0,4
NCgl1303	2677	SAM-abhängige Methyltransferase	0,5
NCgl1337	2632	putative sekretierte Hydrolase	0,4
NCgl1338	2631	Acyltransferase	0,5
NCgl1444	2376	putatives System der Plasmid-Erhaltung	0,4
NCgl1490	2436	putatives Membranprotein	0,5
NCgl1508	2461	Cytochrom-aa3-Oxidase (<i>ctaA</i>)	0,5
NCgl1625	3618	hypothetisches Protein	0,5
NCgl1626	3619 3620	Pantothenatmetabolismus, Flavoprotein	0,5
NCgl1627	3621	hypothetisches Protein	0,5
NCgl1703	3248	5-Cytosin-Methyltransferase (<i>cgIIIM</i>)	0,5
NCgl1709	3784	hypothetische Oxidoreduktase	0,4
NCgl1874	2038	tRNA-Methylthiotransferase (<i>miaB</i>)	0,4
NCgl1876	2041	Glutamat-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein (<i>gluB</i>)	0,5
NCgl1916	2094	putatives Peptid-ABC-Aufnahmesystem, Permease	0,5
NCgl1976	2167	ribosomales Protein S16 (<i>rpsP</i>)	0,5
NCgl2059	2268	putatives sekretiertes Protein	0,4
NCgl2109	2332	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>qcrB</i>)	0,4
NCgl2110	2333	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>qcrA</i>)	0,4
NCgl2111	2334	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>qcrC</i>)	0,4
NCgl2112	2335 3792	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>ctaE</i>)	0,4
NCgl2115	3684 65535	Cytochrom-bc1-Komplex (<i>ctaC</i>)	0,5
NCgl2139	3232	Threonin-Synthase (<i>thrC</i>)	0,5
NCgl2247	3094	Malat-Synthase (<i>aceB</i>)	0,5
NCgl2329	2938	Prolyl-Isomerase (<i>tig</i>)	0,5
NCgl2422	3492	putative Arylsulfatase	0,5
NCgl2439	3472	Nichthäm-Ferritin	0,4
NCgl2782	276	Membran-assoziierte Phospholipid-Phosphatase	0,5
NCgl2789	283	putatives sekretiertes Protein (<i>psp5</i>)	0,5
NCgl2790	285	Glycerol-Kinase (<i>glpK</i>)	0,5
NCgl2877	399	Transkriptionsregulator, PadR-Familie	0,4
NCgl2925	1913	Tryptophan-spezifische Permease (<i>trpP</i>)	0,5

Tabelle A9 (ff): Ergänzung zu Tabelle 12. Gene mit veränderten mRNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	L-Lactat ⁴ Pyruvat
(1812016-1812174)	3349	hypothetisches Protein	2,3
(296831-297028)	700	hypothetisches Protein	2,3
(410550-410708)	853	hypothetisches Protein	2,7
NCgl0063	439	Mononukleotid-Transporter	2,0
NCgl0095	479	hypothetisches Protein	2,3
NCgl0138	534	hypothetisches Protein	2,3
NCgl0183	577	hypothetisches Protein	2,1
NCgl0328	777	putative NADH-Oxidase	2,3
NCgl0380	857	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein	2,2
NCgl0381	3543	putatives Häm-Transport-assoziiertes Membranprotein	2,1
NCgl0481	3548	hypothetisches Protein	2,2
NCgl0483	3550	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Permease	2,3
NCgl0610	1136	hypothetisches Protein	2,1
NCgl0636	1169	putatives Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase	2,1
NCgl0637	1170	putatives Cobalamin/Fe ³⁺ -Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Permease	2,5
NCgl0776	1349	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem	2,7
NCgl0778	1351	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Permease	2,1
NCgl0779	1352	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, ATPase	2,9
NCgl1022	1645 3326	Cystein-Sulfinat-Desulfurase/Cystein-Desulfurase	2,4
NCgl1024	1647	Quinolol-Synthetase A (<i>nadA</i>)	2,8
NCgl1025	1648	ADP-Ribose-Pyrophosphatase	2,8
NCgl1123	1760	hypothetisches Protein	2,3
NCgl1173	1821	Alkansulfonat-Monooxygenase (<i>ssuD1</i>)	2,1
NCgl1476	2416	hypothetisches Protein	2,0
NCgl1498	2449	Biosynthese-Protein eines Metall-Schwefel-Clusters	2,9
NCgl1648	3350	putative Proteinphosphatase	2,0
NCgl1654	3357	hypothetisches Protein	2,5
NCgl1975	2165	hypothetisches Protein	2,4
NCgl2001	2205	hypothetisches Protein	2,9
NCgl2028	2234	putative Hydroxypyruvat-Isomerase (<i>gip</i>)	2,5
NCgl2305	3709	hypothetisches Protein	2,0
NCgl2349	2964	fragwürdiger ORF	2,9

Tabelle A9 (ff): Ergänzung zu Tabelle 12. Gene mit veränderten RNA-Verhältnissen beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf 100 mM L-Lactat und auf 100 mM Pyruvat (mRNA-Spiegel zweifach verändert).

NCBI ¹	ORF ²	Annotation ³	<u>L - Lactat</u> ⁴ <u>Pyruvat</u>
NCgl2434	3480	hypothetisches Protein	2,2
NCgl2473	2890	Cystein-Synthase (<i>cysK</i>)	2,6
NCgl2716	196	Sulfatadenylyltransferase, kleine Untereinheit (<i>cysD</i>)	2,9
NCgl2722	203	hypothetisches Protein	2,4
NCgl2740	227	Flavohämoprotein (<i>hmp</i>)	2,9
NCgl2801	295	putative Metall-abhängige Membranprotease	2,3
NCgl2869	389	Kupfer-Chaperone	2,2
NCgl2941	1934	Transkriptionsregulator, ArsR-Familie	2,8
NCgl2943	1937	putative Nucleosiddiphosphat-Zucker-Epimerase	2,2
NCgl2970	3458	putatives Siderophor-ABC-Aufnahmesystem, Bindeprotein	2,6
NCgl2972	3460	hypothetisches Protein	2,0

Erläuterungen 1, 2, 3, 4 siehe Tabelle 4

2. Oligonukleotidsequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')*
Primer für die DNA-Sequenzierung und zum Nachweis der Integration von pK18mob	
M13-24F	TGTAACGACGGCCAGT
M13-24R	GGAAACAGCTATGACCAT
Primer zur Deletion von <i>NCgl1249</i> (Biomax 2756)	
NCgl1249del_L_fw	TGCTTGACCCTTGATCGGAT
NCgl1249del_L_rev	CCCATCCACTAACTTAAACAGAGTCTAAAGAGCAGTGA
NCgl1249del_R_fw	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTCCTTGTTTGTAACGCCA
NCgl1249del_R_rev	GCTGTTCAACGAGGAATACTATAACCA
Primer zur Deletion von <i>NCgl2713</i> (Biomax 193)	
NCgl2713del_L_fw	CCAGTCCGGCCCATCGACTGA
NCgl2713del_L_rev	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTCAACGAGACCATCTCCAGCGAAGTT
NCgl2713del_R_fw	CCCATCCACTAACTTAAACAGACGCCTGCAATGGCGAT
NCgl2713del_R_rev	GTGGAACCTTCTCGTGGGTCCGCAT
NCgl2713del_V_fw	TGAAGAACGGTCCGTGCAACAAGCA
NCgl2713del_V_rev	CGGCCTCAACGACATCGCACA
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0007</i> (Biomax 3301)	
NCgl0007int_fw	CATCACTTCCCCTGGTGTGGAC
NCgl0007int_rev	CTTACCAGCGCAGAGACAATGC
NCgl0007int_fw_proof	CCCTAATAAGAAACCTTTAGATCCCGC
NCgl0007int_rev_proof	CTGGCGGACGAAGAATCCGATG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0394</i> (Biomax 875)	
NCgl0394int_fw	ATCGCAGTTGGCTTCGGAGTG
NCgl0394int_rev	ATTGCGCAGGGTGTTCGGTTG
NCgl0394int_proof_fw	CAACGCTTATCGACGGCCACT
NCgl0394int_proof_rev	ATCCGTAGGGGTTGACGGTGA
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0599</i> (Biomax 1124)	
NCgl0599int_fw	GCTGTCCAAGTGTTCGTC
NCgl0599int_rev	ACCCGACCGAATACAAACAG
NCgl0599int_proof_fw	TGAATCCATCCCAGCCATTGTC
NCgl0599int_proof_rev	CACGAGGATGCTGCTCCACTA
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0816</i> (Biomax 1401)	
NCgl0816int_fw	GAGTATTTTCCGCGTCACGTC
NCgl0816int_rev	GACTGCGGATAACAACCATC
NCgl0816int_fw_proof	GTCGTTGAAGAGGAAGTTCAC
NCgl0816int_rev_proof	GTATAACCCAAACCCTGCC
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0821</i> (Biomax 1406)	
NCgl0821int_fw	CACCGAAGAAAACCGACAA
NCgl0821int_rev	AGATTCCTCCGTAGATTC
NCgl0821int_proof_fw	CAATGGTTATCCAGAAGTCTC
NCgl0821int_proof_rev	CCACTCTCCGTCACCGATAAAC

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')*
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0944</i> (Biomax 1559)	
NCgl0944int_fw	<u>T</u> TGGTCACCTTTGGCGTGTGG
NCgl0944int_rev	<u>G</u> ATGATTCCACCGTCACGCAG
NCgl0944int_proof_fw	<u>G</u> TGCGAAGCAGCAATCCC GTT
NCgl0944int_proof_rev	<u>G</u> GAAGTAGCTAAGCAGACGTAGG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0963</i> (Biomax 1583)	
NCgl0963int_fw	<u>T</u> GAATGTGTGGCGCATCATCGG
NCgl0963int_rev	<u>G</u> ATGCCGGTGATAGAGGAATTGGA
NCgl0963int_proof_fw	<u>C</u> GATGACAGCCAGCTAGTCTCA
NCgl0963int_proof_rev	<u>G</u> AAGACTCCACCGAAGGAGAG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl0986</i> (Biomax 1605)	
NCgl0986int_fw	<u>G</u> CTATTGTGGTTCTTGCATCGG
NCgl0986int_rev	<u>C</u> ACTTCCAACAGAGAGAACAGGG
NCgl0986int_proof_fw	<u>G</u> CCGCTATTGGTTCTGCGGTT
NCgl0986int_proof_rev	<u>A</u> TGCAGCCACCAGGATGACAG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl1026</i> (Biomax 1649)	
NCgl1026int_fw	GACAGATCATCATGGGCC
NCgl1026int_rev	GATCGGTCCCAGGTAAG
NCgl1026int_fw_proof	CCATCATGCCTTTCCAAAC
NCgl1026int_rev_proof	CTGCCAAGGATTCCAAAAG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl1174</i> (Biomax 1822)	
NCgl1174int_fw	<u>G</u> TCGCATGCCAACGCGTCCCTTCTA
NCgl1174int_proof_fw	<u>A</u> TGACTACAACCTTGACTCGCC
NCgl1174int_rev	<u>G</u> GCTGCAGGAATGATGATGGTC
NCgl1174int_proof_rev	<u>G</u> TTTCGGTAGCGGAAGGTGTG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl1221</i> (Biomax 2794)	
NCgl1221int_fw	<u>C</u> ATCGTTGTGGAAGGTACCGTCA
NCgl1221int_rev	<u>A</u> TTGATCACCGAGGCGTCTGCAG
NCgl1221int_proof_fw	<u>G</u> CCATGCGTATTATCAAGCG
NCgl1221int_proof_rev	<u>C</u> AACAACAGGGACGTGCTCA
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl1978</i> (Biomax 2170)	
NCgl1978int_fw	<u>G</u> AGTGCTGGTTGAAGATCGCAC
NCgl1978int_rev	<u>G</u> TCACTGCTTCAGGCAATGCG
NCgl1978int_fw_proof	<u>C</u> ATCATGGGTGCGCTCATC
NCgl1978int_rev_proof	<u>C</u> CAGTTTGAGTCCGTATCCG
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl2032</i> (Biomax 2239)	
NCgl2032int_fw	<u>G</u> GTATTTAGAAACCCGCTGG
NCgl2032int_rev	<u>C</u> ACATCACCAACAGCCATCAC
NCgl2032int_proof_fw	<u>G</u> TGGTGCTGTTTTTCAGG
NCgl2032int_proof_rev	<u>G</u> ACAGTGGCAGTAAAATCC

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')*
Primer zur Inaktivierung von NCgl2232 (Biomax 3112)	
NCgl2232int_fw	<u>T</u> ACTCATGCGGTTTCGTGAT
NCgl2232int_rev	<u>G</u> AACATTCTTGAACAGTGCC
NCgl2232int_proof_fw	<u>G</u> TCACCAAGTCAGATACCTCG
NCgl2232int_proof_rev	<u>G</u> AGAATCACCGCCGACAAC
Primer zur Inaktivierung von NCgl2303 (Biomax 3707)	
NCgl2303int_fw	<u>G</u> GCTTCTGCCTACGTGAA
NCgl2303int_rev	<u>C</u> GCAGTAGCAGTAAGAACGCTG
NCgl2303int_proof_fw	<u>C</u> TGCGTGATTTTCGGCGATT
NCgl2303int_proof_rev	<u>G</u> CGTAGAGGTAATCGCC
Primer zur Inaktivierung von NCgl2348 (Biomax 2962)	
NCgl2348int_fw	<u>G</u> TCACACTGCCACTTGCGCT
NCgl2348int_rev	<u>G</u> CATCAAGTCCGAATTGCTC
NCgl2348int_proof_fw	<u>C</u> ATCCGCATAAGGTGGTGC
NCgl2348int_proof_rev	<u>G</u> ATGACAGCACTGACAATGAGCAC
Primer zur Inaktivierung von NCgl2351 (Biomax 2968)	
NCgl2351int_fw	<u>C</u> ACTGGTTTGGTACCGATTCC
NCgl2351int_rev	<u>C</u> GAAGGTGGCAACAGAGGTAATA
NCgl2351int_proof_fw	<u>A</u> ACTGGATCCGCTGACC
NCgl2351int_proof_rev	<u>C</u> AACACGGACAGCTGCAAAATC
Primer zur Inaktivierung von NCgl2411 (Biomax 3507)	
NCgl2411int_fw	<u>C</u> TACGCAGGCCTTTCCTC
NCgl2411int_rev	<u>T</u> GCGATTTCTTGGCCTGC
NCgl2411int_proof_fw	<u>A</u> TGCTAAACATCGCACGCAA
NCgl2411int_proof_rev	<u>G</u> TAGATGCCGTGGTTTG
Primer zur Inaktivierung von NCgl2524 (Biomax 2824)	
NCgl2524int_fw	<u>T</u> CGCCAACATCACCTTTGAG
NCgl2524int_rev	<u>G</u> ATGGCACCGAAGGTAAATAC
NCgl2524int_proof_fw	<u>T</u> ATCAAGGGCACTCGCC
NCgl2524int_proof_rev	<u>T</u> TGGCTGCGACACCGAAGA
Primer zur Inaktivierung von NCgl2816 (Biomax 312)	
NCgl2816int_fw	<u>G</u> CAACGAGTTCCTCTCCACAATC
NCgl2816int_rev	<u>A</u> CAGGCCGATGAACACTAGGAG
NCgl2816int_proof_fw	<u>T</u> GACCATGAGGTTGGGCCAATC
NCgl2816int_proof_rev	<u>T</u> GCTGCTCCGACTTGGTAACC
Primer zur Inaktivierung von NCgl2828 (Biomax 329)	
NCgl2828int_fw	<u>C</u> CAAGGATATTGGGCATGCG
NCgl2828int_rev	<u>C</u> ACCAACCAGCACTTCACTC
NCgl2828int_fw_proof	<u>C</u> ACGTTGGCCATCATCG
NCgl2828int_rev_proof	<u>G</u> GCAAATGCGCTAAACGC

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')*
Primer zur Inaktivierung von <i>NCgl2839</i> (Biomax 341)	
NCgl2839int_fw	<u>CC</u> AGATACCGATTGTCCCTGGTCT
NCgl2839int_rev	GATGATTGTTTGGAGGAGCGT
NCgl2839int_proof_fw	<u>GT</u> GAAAGTGCCACCTGTTTGGA
NCgl2839int_proof_rev	<u>TC</u> AGTCCTCTTGAGACGGCT
Primer zur Überexpression von <i>NCgl2817</i>	
lldD_fw	AAGGAGATATAGAT <u>AT</u> TGGTGAAACGTCAACTGCC
lldD_rev	<u>T</u> TAAATCTCCGCCGCTGCAGAACGAGTT
Primer für reverse Transkriptase-Reaktionen und Kontroll-PCR	
NCgl2816int_proof_fw	<u>TG</u> ACCATGAGGTTGGGCAATC
NCgl2816int_proof_rev	<u>TG</u> CTGCTCCGACTTGGTAACC
lldD_fw	<u>AAGGAGATATAGATAT</u> TGGTGAAACGTCAACTGCC
lldD_rev	<u>T</u> TAAATCTCCGCCGCTGCAGAACGAGTT
RT-dnaE-fw	<u>TG</u> CCCTTCCGGCGATGTCCAA
RT-dnaE-rev	<u>CT</u> GGAACCATGTCGTCTTAGAG

* Das erste Nukleotid des Primers aus dem Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 (NC003450) ist unterstrichen. Komplementäre Sequenzen zur Konstruktion von *cross over*-PCR-Produkten sind fett hervorgehoben. Die bei Klonierungen von Genen ohne Ribosomen-Bindestelle an den Primer angefügte T7-10-Gen-Konsensussequenz (inklusive eines Spacers) ist grau unterlegt.

3. Vektorkarten

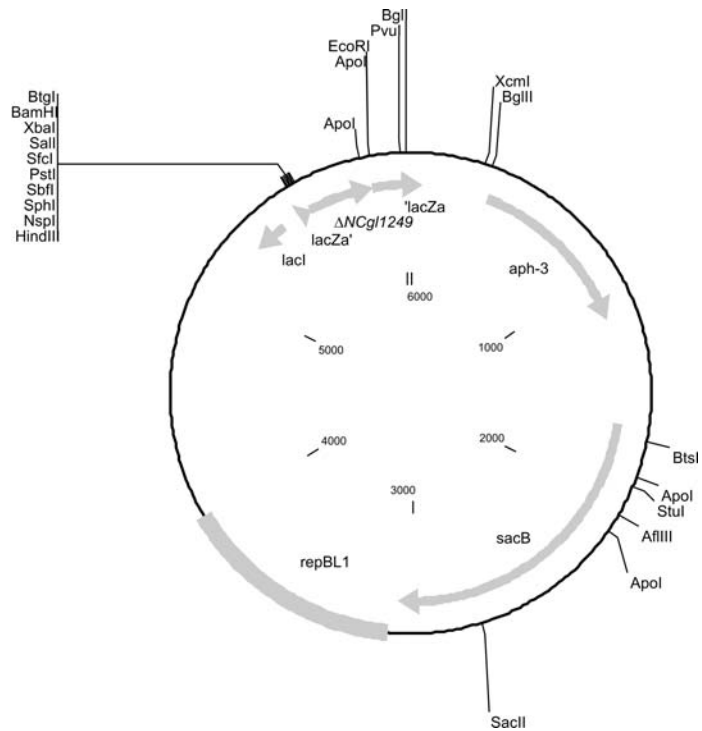


Abbildung A1: Plasmid pK19mobsacBΔNCgl1249 mit einem 252 bp-cross over-PCR-Fragment in der SmaI-Schnittstelle von pK19mobsacB, welches die NCgl1249-flankierenden Bereiche umfasst.

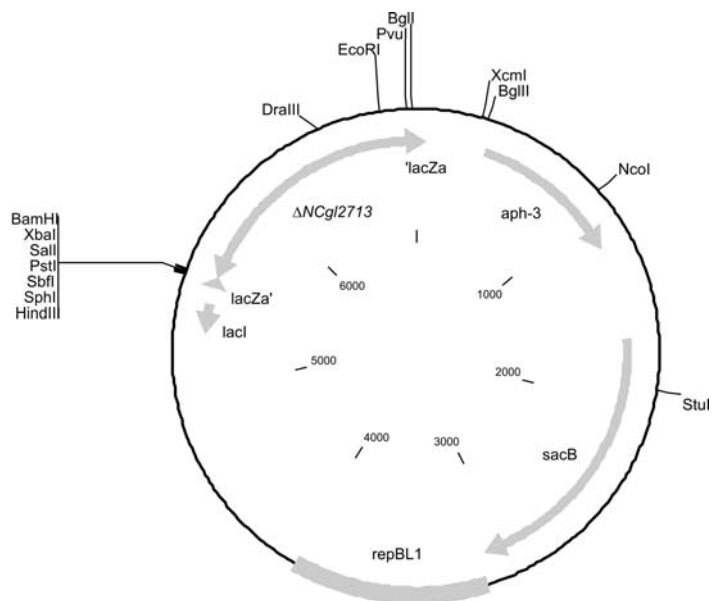


Abbildung A2: Plasmid pK19mobsacBΔNCgl2713 mit einem 828 bp-cross over-PCR-Fragment in der SmaI-Schnittstelle von pK19mobsacB, welches die NCgl2713-flankierenden Bereiche umfasst.

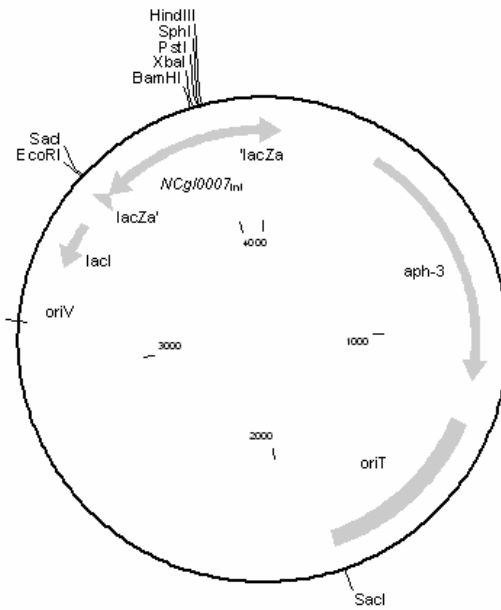


Abbildung A3: Plasmid pK18mobNCgI0007_{int} mit einem 332 bp-PCR-Fragment von NCgI0007 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

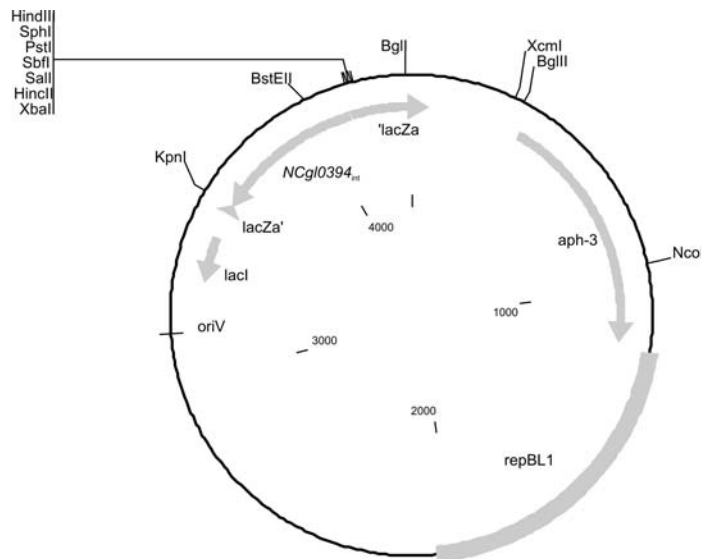


Abbildung A4: Plasmid pK18mobNCgI0394_{int} mit einem 495 bp-PCR-Fragment von NCgI0394 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

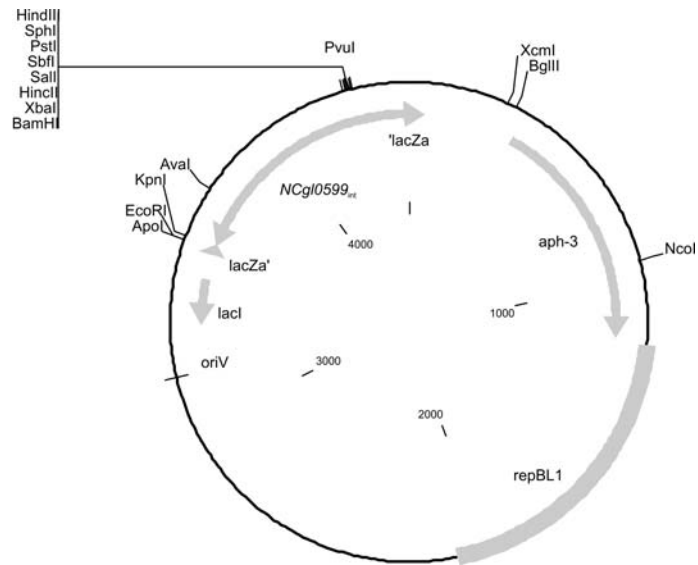


Abbildung A5: Plasmid pK18mobNCgI0599_{int} mit einem 644 bp-PCR-Fragment von NCgI0599 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

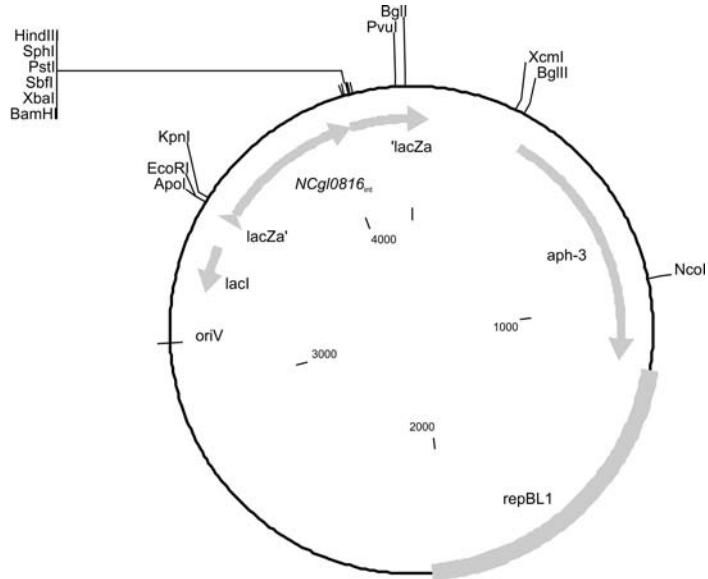


Abbildung A6: Plasmid pK18mobNCgI0816_{int} mit einem 474 bp-PCR-Fragment von NCgI0816 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

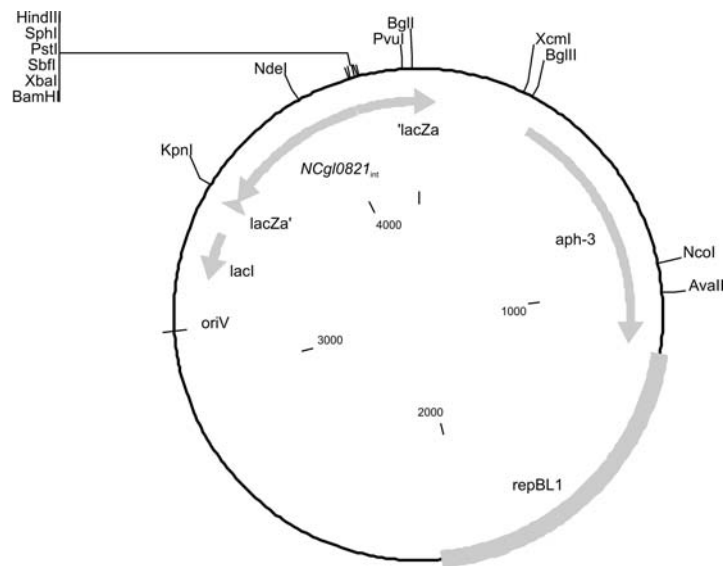


Abbildung A7: Plasmid pK18mobNCgI0821_{int} mit einem 485 bp-PCR-Fragment von NCgI08214 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

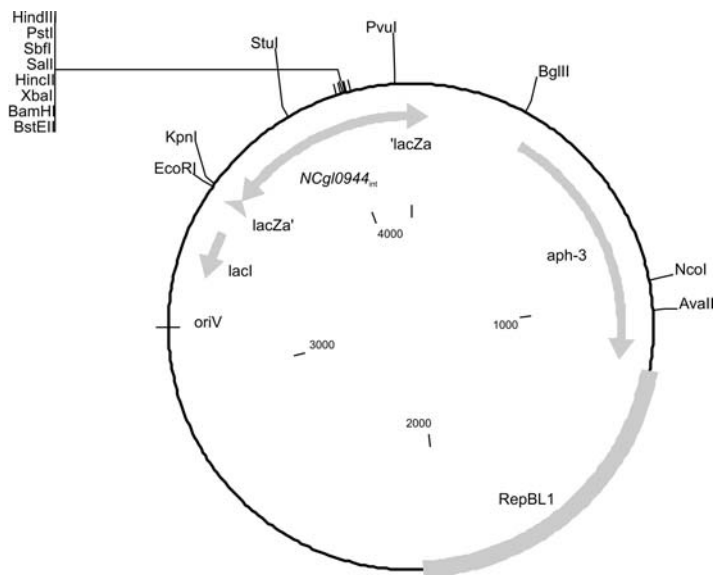


Abbildung A8: Plasmid pK18mobNCgI0944_{int} mit einem 426 bp-PCR-Fragment von NCgI0944 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

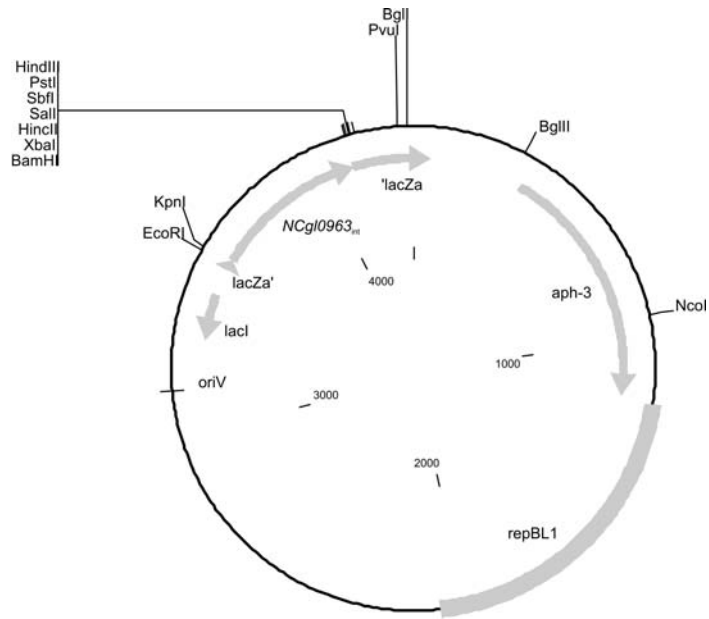


Abbildung A9: Plasmid pK18mobNCgI0963_{int} mit einem 509 bp-PCR-Fragment von NCgI0963 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

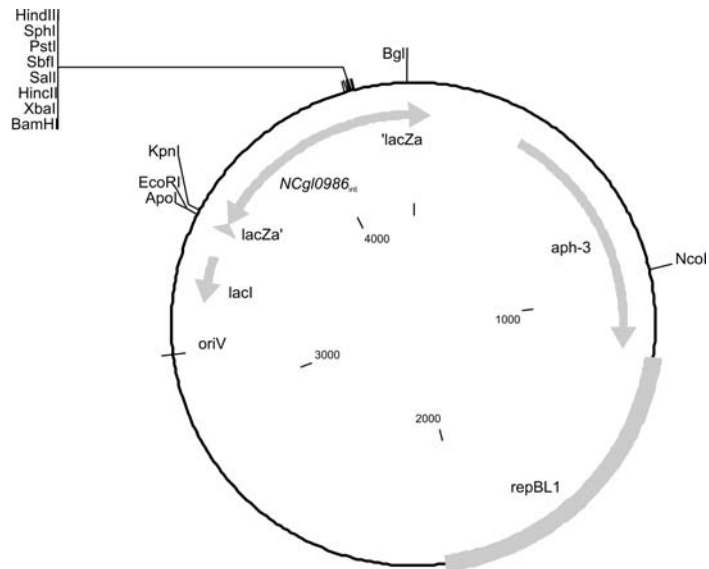


Abbildung A10: Plasmid pK18mobNCgI0986_{int} mit einem 540 bp-PCR-Fragment von NCgI0986 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

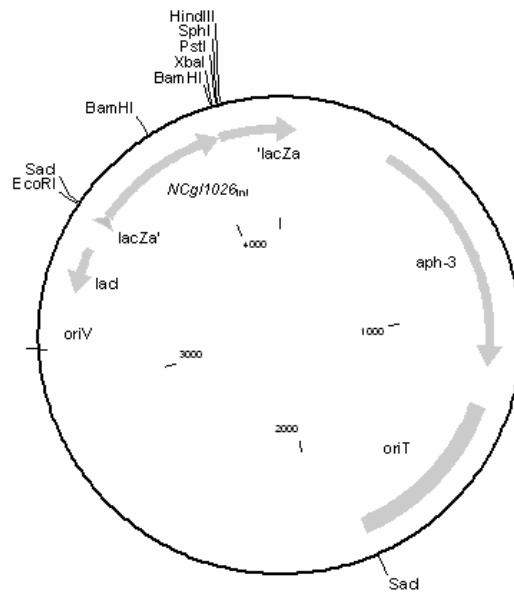


Abbildung A11: Plasmid pK18mobNCg11026_{int} mit einem 4495 bp-PCR-Fragment von NCg11026 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

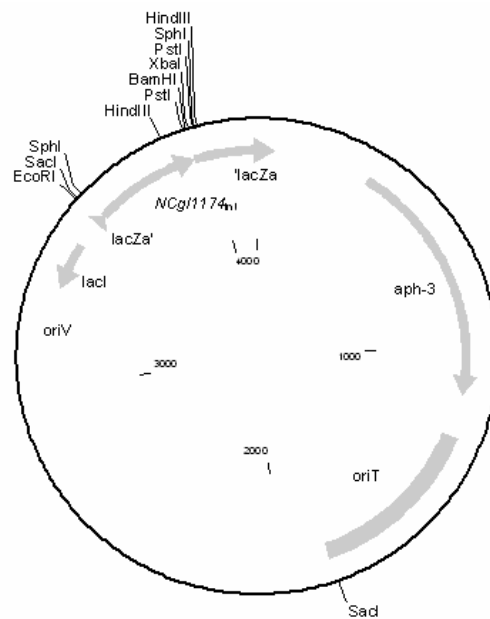


Abbildung A12: Plasmid pK18mobNCg1174_{int} mit einem 342 bp-PCR-Fragment von NCg1174 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

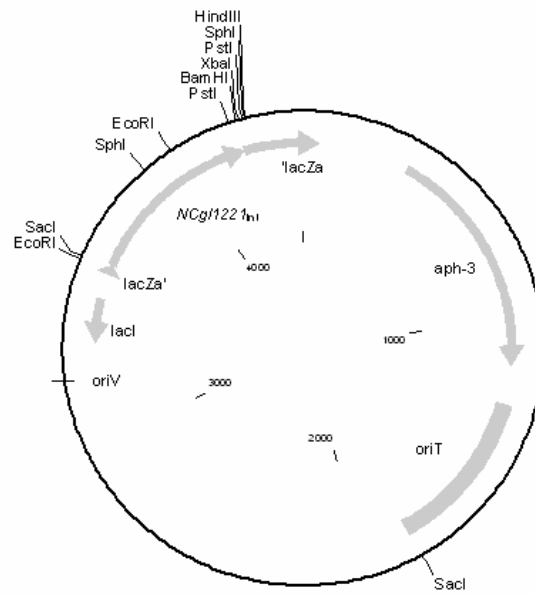


Abbildung A13: Plasmid pK18mobNCg1221_{int} mit einem 610 bp-PCR-Fragment von NCg1221 in der *Sma*I-Schnittstelle von pK18mob.

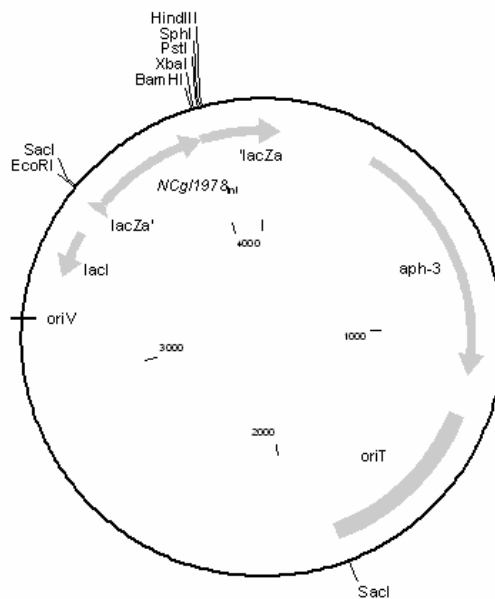


Abbildung A14: Plasmid pK18mobNCg1978_{int} mit einem 373 bp-PCR-Fragment von NCg1978 in der *Sma*I-Schnittstelle von pK18mob.

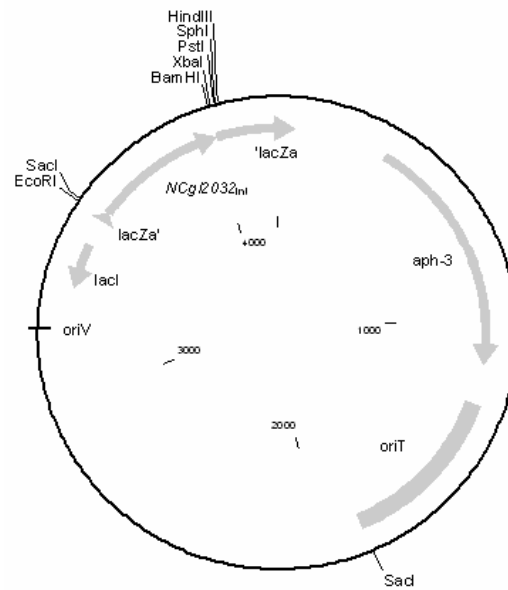


Abbildung A15: Plasmid pK18mobNCgI2032_{int} mit einem 439 bp-PCR-Fragment von NCgI2032 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

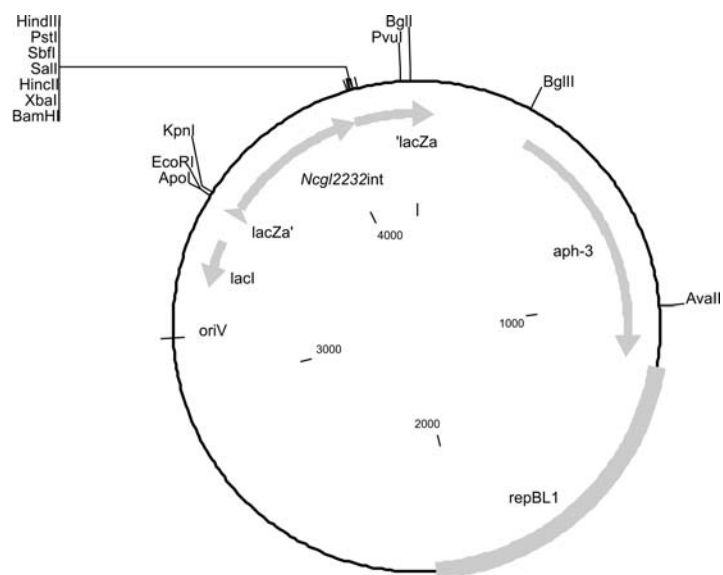


Abbildung A16: Plasmid pK18mobNCgI2232_{int} mit einem 468 bp-PCR-Fragment von NCgI2232 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

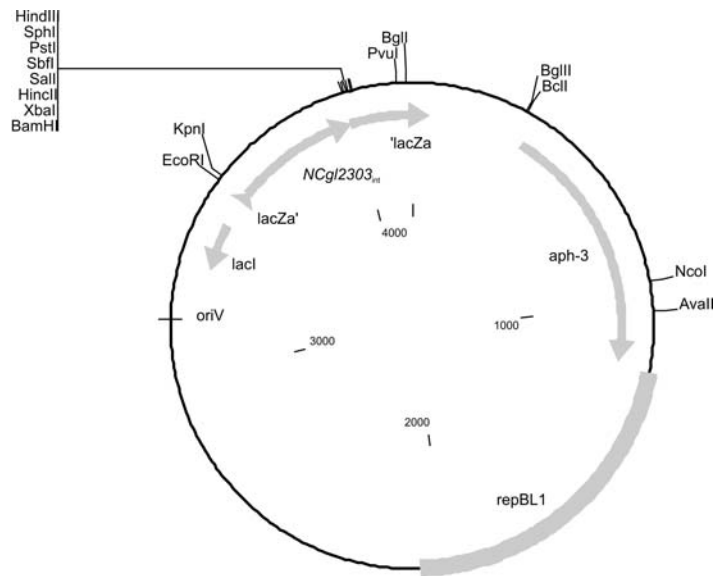


Abbildung A17: Plasmid pK18mobNCgI2303_{int} mit einem 400 bp-PCR-Fragment von NCgI2303 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

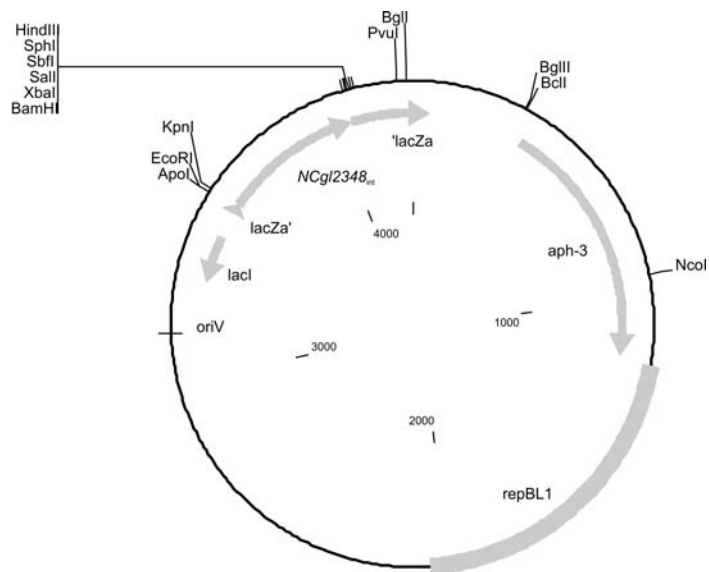


Abbildung A18: Plasmid pK18mobNCgI2348_{int} mit einem 458 bp-PCR-Fragment von NCgI2348 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

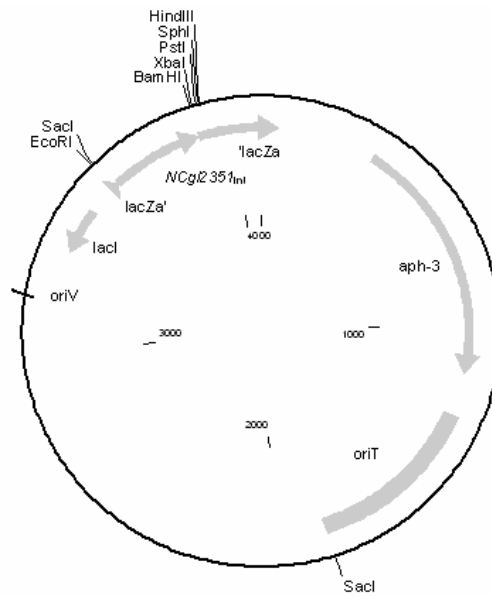


Abbildung A19: Plasmid pK18mobNCgl2351_{int} mit einem 295 bp-PCR-Fragment von NCgl2351 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

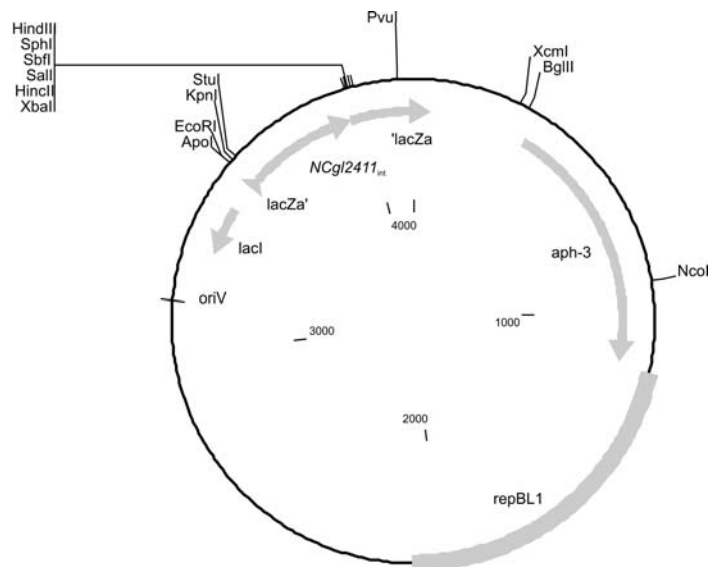


Abbildung A20: Plasmid pK18mobNCgl2411_{int} mit einem 349 bp-PCR-Fragment von NCgl2411 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

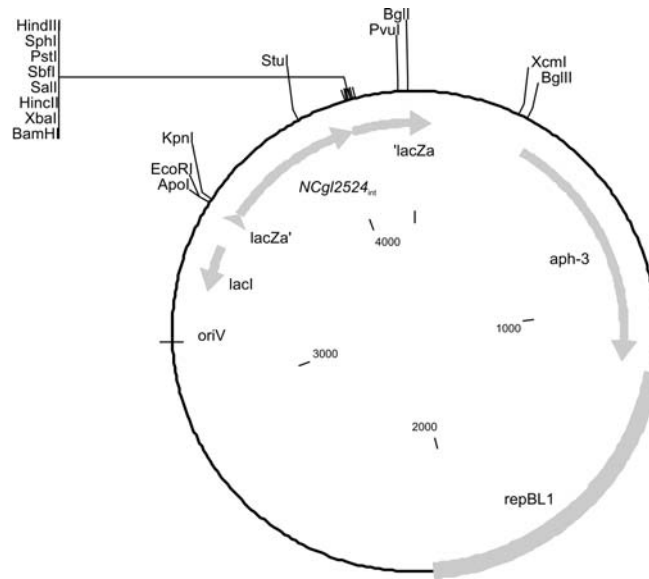


Abbildung A21: Plasmid pK18mobNCgl2524_{int} mit einem 464 bp-PCR-Fragment von NCgl2524 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

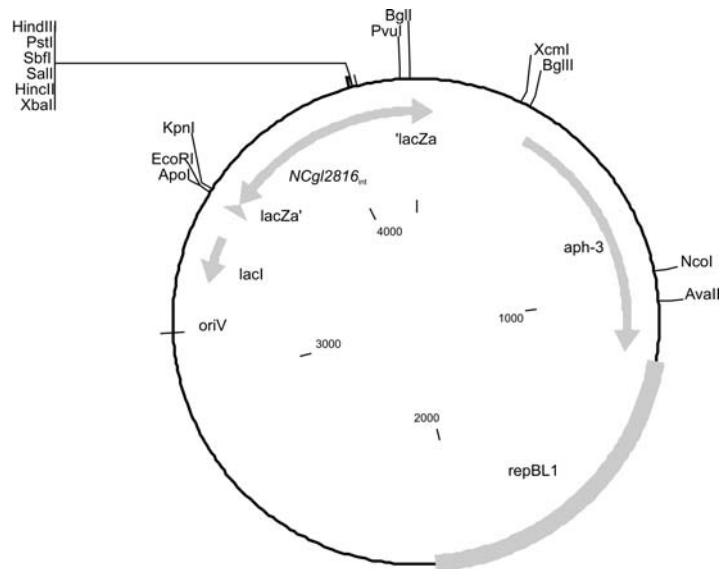


Abbildung A22: Plasmid pK18mobNCgl2816_{int} mit einem 468 bp-PCR-Fragment von NCgl2816 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

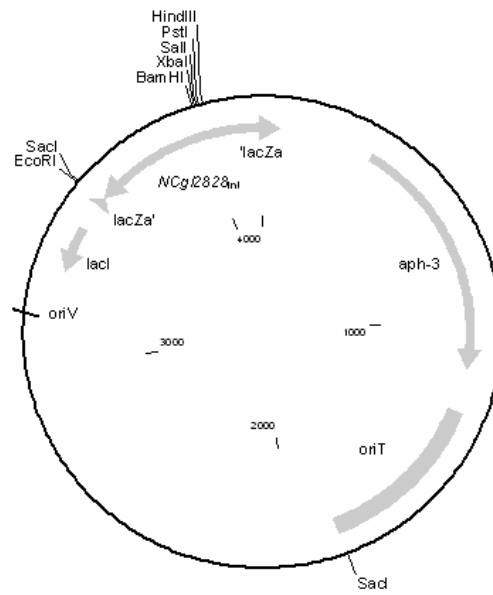


Abbildung A23: Plasmid pK18mobNCgl2828_{int} mit einem 369 bp-PCR-Fragment von NCgl2828 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

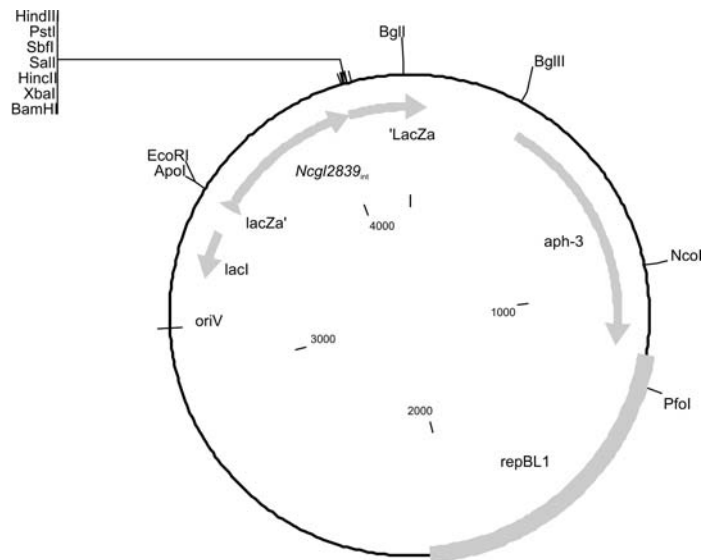


Abbildung A24: Plasmid pK18mobNCgl2839_{int} mit einem 472 bp-PCR-Fragment von NCgl2839 in der SmaI-Schnittstelle von pK18mob.

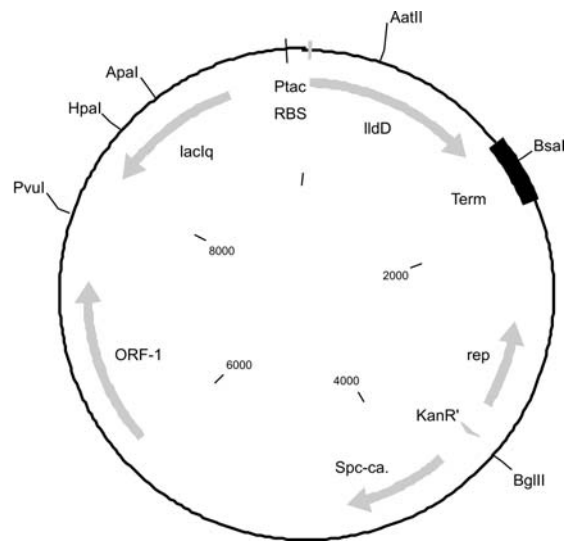


Abbildung A25: Plasmid pEKEx3-*ildD* mit einem 1286 bp-PCR-Produkt von *ildD* mit Ribosomen-Bindestelle des T7-10-Gens in der *Sma*I-Schnittstelle von pEKEx3.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, für seine anregenden Diskussionen und für das Interesse am Fortgang der Arbeit.

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

Mein besonderer Dank gilt den Herren Dr. Lothar Eggeling und PD Dr. Volker F. Wendisch, die durch ihre engagierte Unterstützung und konstruktive Kritik einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Jean-Louis Goergen möchte ich mich für die produktive Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme als Gast im *Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, Frankreich)* bedanken.

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

Ebenso möchte ich Tino, Georg und Christian für die Einführung in die von ihnen am Institut etablierte DNA-Chip-Technik danken.

Natalie Peters danke ich für ihre engagierte Arbeit im Rahmen ihres Praktikums und ihrer Diplomarbeit.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Biotechnologie und insbesondere den Arbeitsgruppen Wendisch und Eggeling danke ich für die freundliche Aufnahme, die gute Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Bei Andrea, Eva, Roland, Christian, Tanja, Andreas, Axel, Daniel und allen anderen, die da waren oder noch sind, bedanke ich mich vor allem nicht nur für die gemeinsame Zeit im Labor und im Büro sondern auch bei Sport und Bier.

Auch meinen Freunden außerhalb von Jülich und meiner Familie möchte ich für die vielen gemeinsamen Jahre und ihr Verständnis, dass ich nicht so oft bei ihnen sein konnte, danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Martin, der mich während meines Studiums, Diplomarbeit und Doktorarbeit liebevoll unterstützt und immer wieder ermutigt hat.